

Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima srebrvim nitratom i bakrovim sulfatom na amilografske pokazatelje pšeničnog brašna

Živić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:549682>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



image not found or type unknown

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ana Živić

**UTJECAJ INAKTIVACIJE AMILOLITIČKIH ENZIMA SREBROVIM
NITRATOM I BAKROVIM SULFATOM NA AMIOLOGRAFSKE
POKAZATELJE PŠENIČNOG BRAŠNA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologije prerade žitarica
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija proizvodnje i prerade brašna
Tema rada: je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 27. svibnja 2020.
Mentor: prof. dr. sc. *Marko Jukić*
Pomoć pri izradi:

UTJECAJ INAKTIVACIJE AMILOLITIČKIH ENZIMA SREBROVIM NITRATOM I BAKROVIM SULFATOM NA AMILOGRAFSKE POKAZATELJE PŠENIČNOG BRAŠNA

Ana Živić, 0113138824

Sažetak: Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj otopina različitih koncentracija srebrovog nitrata (AgNO_3) i bakrovog sulfata (CuSO_4) na amilografske pokazatelje pšeničnog brašna i odrediti njihov inaktivacijski potencijal na amilolitičke enzime. Uzorak pšenice niske amilolitičke aktivnosti podvrgnut je kvašenju da bi se potaknulo klijanje odnosno da bi se dobio uzorak s visokom amilolitičkom aktivnošću. Brašno proklijale pšenice podvrgnuto je amilografskom ispitivanju na Brabenderovom Mikro Visko-Amilografu uz korištenje vode, otopine AgNO_3 u koncentracijama od 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 5 mM i otopine CuSO_4 u koncentracijama od 5 mM, 10 mM, 20 mM i 50 mM.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se povećanjem koncentracije dodanih otopina AgNO_3 i CuSO_4 proporcionalno povećavaju početna temperatura želatinizacije ($^{\circ}\text{C}$), temperatura maksimuma ($^{\circ}\text{C}$), maksimalna viskoznost (BU), opadanje viskoznosti (BU) i reasocijacijska vrijednost (BU). Potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postignuta je s dodatkom 5 mM otopine AgNO_3 i 20 mM otopine CuSO_4 čime je dokazana puno veća učinkovitost AgNO_3 . Otopina CuSO_4 , osim što inaktivira amilolitičke enzime, ima i direktan utjecaj na granule škroba i stabilnost škrobne paste te uzrokuje veću likvefakciju i manji intenzitet retrogradacije u odnosu na otopinu AgNO_3 .

Ključne riječi: Pšenično brašno, inhibicija amilolitičkih enzima, amilografska svojstva

Rad sadrži: 34 stranice
1 tablica
18 slika
43 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | | |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> | predsjednik |
| 2. | prof. dr. sc. <i>Marko Jukić</i> | član-mentor |
| 3. | izv. prof. dr. sc. <i>Jasmina Lukinac Čačić</i> | član |
| 4. | doc.dr. sc. <i>Kristina Mastanjević</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 30. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technology
Subdepartment of grain processing technologies
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Technology of flour production and processing
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on May 27, 2020.
Mentor: Marko Jukić, PhD, full prof.
Technical assistance: .

INFLUENCE OF AMYLOLYTIC ENZYME INACTIVATION BY SILVER NITRATE AND COPPER SULFATE ON AMYLOGRAPHIC QUALITY PARAMETERS OF WHEAT FLOUR

Ana Živić, 0113138824

Summary: The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of silver nitrate (AgNO_3) and copper sulphate (CuSO_4) solutions on the amylographic parameters of wheat flour and to determine their inactivation potential on amylolytic enzymes. A sample of wheat with low amylolytic activity was subjected to germination to obtain a sample with high amylolytic activity. Sprouted wheat flour was subjected to amylographic evaluation on a Brabender Micro Visco-Amylograph using water, AgNO_3 solution at concentrations of 0.5 mM, 1 mM, 2 mM and 5 mM and CuSO_4 solution at concentrations of 5 mM, 10 mM, 20 mM and 50 mM.

Based on the obtained results, it can be concluded that by increasing the concentration of added solutions of AgNO_3 and CuSO_4 , all amylographic parameters increase proportionally (beginning of gelatinization ($^{\circ}\text{C}$), peak temperature ($^{\circ}\text{C}$), peak viscosity (BU), breakdown viscosity (BU), and setback (BU). Complete inactivation of amylolytic enzymes was achieved with the addition of 5 mM AgNO_3 solution and 20 mM CuSO_4 solution thus proving much higher efficiency of AgNO_3 . CuSO_4 solution, in addition to inactivating amylolytic enzymes, also has a direct effect on starch granules and the stability of starch paste, as well as greater liquefaction and less intensive retrogradation compared to a solution of AgNO_3 .

Key words: wheat flour, amylolytic enzyme inhibition, amylographic properties

Thesis contains: 34 pages
1 table
18 figures
43 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|--|--------------|
| 1. | Daliborka Koceva Komlenić, PhD, full prof. | chair person |
| 2. | Marko Jukić, PhD, full prof. | supervisor |
| 3. | Jasmina Lukinac Čačić, PhD, assoc. prof. | member |
| 4. | Kristina Mastanjević, PhD, assist. prof. | stand-in |

Defense date: September 30, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se svojem mentoru prof. dr. sc. Marku Jukiću na velikoj pomoći, savjetima, uloženom vremenu i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također, veliko hvala tati Ivanu i mami Evi što su mi omogućili da budem tu gdje jesam i bili glavni poticaj i oslonac tijekom studiranja. Hvala Vam za svaku riječ pohvale, ali i kritike. Veliko hvala i sestri Ivani koja mi je živeći zajedno uvijek bila na raspolaganju, veselila se sa mnom, ali me i tješila kada ništa nije bilo po planu. Također hvala mome zaručniku Luki što je uvijek vjerovao i bio uz mene kada mi je to najviše trebalo. Hvala i prijateljima koji su mi studentske dane učinili iznimno zabavnim i nezaboravnim.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PŠENICA	4
2.1.1. Struktura pšeničnog zrna	4
2.1.2. Kemijski sastav pšeničnog zrna	6
2.2. PŠENIČNI ŠKROB	8
2.2.1. Građa škrobne granule	8
2.2.2. Želatinizacija i retrogradacija škroba	10
2.3. PŠENIČNI ENZIMI.....	12
2.3.1. Amilolitički enzimi.....	14
2.3.2. Proteolitički enzimi	15
2.3.3. Ostali enzimi	16
2.3.4. Uloga iona kalcija na aktivnost i stabilnost enzima	16
2.3.5. Inaktivacija enzima	17
2.4. METODE MJERENJA AMILOLITIČKE AKTIVNOSTI.....	18
2.4.1. Metoda broja padanja po Hagberg-Pertenu	19
2.4.2. Mikro Visko-Amilograf	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. ZADATAK.....	22
3.2. MATERIJAL I METODE	22
3.2.1. Materijali	22
3.2.2. Određivanje reoloških svojstava Mikro Visko-Amilografom	22
3.2.3. Statistička obrada rezultata	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	33

1. UVOD

Pšenica (rod *Triticum*) je najvažnija žitarica koja se koristi u prehrani ljudi te je svrstana u porodicu trava (*Poaceae*). Pšenično zrno sastoji se od tri osnovna dijela: ovojnice ili omotača (sastoji se od plodne i sjemene ovojnice), klice i endosperma koji čini najveći dio ukupne mase zrna. Najveći dio endosperma čini škrob koji se nalazi u obliku škrobnih granula koje su građene od dva tipa polisaharida: amiloze i amilopektina. Amiloza i amilopektin građeni su od jedinica α -D-glukoze, a razlikuju se po stupnju polimerizacije i razgranatosti. Amiloza je gotovo nerazgranata, dok je amilopektin razgranata molekula (Wieser i sur., 2020). Enzimi koji hidroliziraju škrob nazivaju se amilolitički enzimi. Pšenično brašno od amilolitičkih enzima (amilaza) sadrži α i β -amilazu. U neprokljalom zrnu pšenice enzimi su prisutni u malim količinama i neaktivni su tijekom pogodnih uvjeta skladištenja brašna i pšenice, a aktiviraju se povećanjem udjela vode. Klijanjem pšenice raste aktivnost mnogih enzima što može imati negativne učinke na daljnju preradu i proizvodnju proizvoda na bazi brašna (Kruger i Reed, 1988).

Poznavanje amilolitičke aktivnosti u pšeničnom brašnu je vrlo važno jer količina amilolitičkih enzima igra važnu ulogu tijekom proizvodnje kruha i pekarskih proizvoda. Djelovanjem amilaza u pšeničnom brašnu nastaju dekstrini koji omogućuju kvascima kontinuiran rad tijekom fermentacije i ranih faza pečenja što rezultira boljim volumenom i boljom teksturom sredine kruha. Također dolazi do intenzivnijeg posmeđivanja kore kruha zbog dekstrinacije škroba (Van Oort, 2010).

Zagrijavanjem škroba uz dovoljno vode dolazi do otapanja škroba, odnosno želatinizacije i stvaranja škrobne paste. Tijekom želatinizacije dolazi do povećanja viskoznosti i upravo je to svojstvo važno za određivanje amilolitičke aktivnosti pomoću Mikro Visko-Amilografa i metodom broja padanja po Hagberg-Pertenu. Amilolitički enzimi razgrađuju škrob na manje dijelove što rezultira manjom viskoznosti škrobne paste koja je indikator povećane amilolitičke aktivnosti.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj različitih koncentracija srebrovog nitrata i bakrovog sulfata kojima se vrši inaktivacija amilolitičkih enzima na amilografske pokazatelje pšeničnog brašna.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PŠENICA

Danas se žitarice uzgajaju na gotovo 60 % poljoprivrednih površina u svijetu i pripadaju najvažnijim kulturama. Najviše se koriste za prehranu ljudi, ali i za hranu za životinje, industrijske proizvode te proizvodnju obnovljive energije. Osim pšenice, u žitarice spadaju i raž, ječam, zob, riža, proso, sirak, kukuruz, pšenoraž, krupnik i heljda (Wieser i sur., 2020).

Botanički gledano, rod pšenica (*Triticum*) pripada porodici trava (*Poaceae*). Najznačajnije vrste za proizvodnju brašna su meke vrste pšenice *Triticum aestivum* i *Triticum compactum* i tvrda vrsta *Triticum durum* (Kljusurić, 2000).

Triticum aestivum je meka vrsta pšenice. Naziva se i obična pšenica jer je najviše raširena. Koristi se za dobivanje krušnog brašna i proizvodnju pekarskih proizvoda. Sadržaj proteina ovisan je o sorti, *Triticum aestivum* ih sadrži u prosjeku od 11 – 13 %. *Triticum compactum* je meka vrsta pšenice iz koje se dobiva brašno za proizvodnju lisnatog tijesta, vafla i kolača. *Triticum durum* sadrži oko 18 % proteina, znatno više od *Triticum aestivum*. Velike su tvrdoće i staklaste su strukture zbog visokog udjela proteina. Ova vrsta pšenice nije pogodna za proizvodnju kruha i pekarskih proizvoda jer daje neelastično i čvrsto tijesto prilikom zamjesa. Koristi se u proizvodnji tjestenine (Đaković, 1980).

Mljevenjem očišćene pšenice dobiva se pšenično brašno pri čemu se omotač odvaja od endosperma te se mljevenjem endosperma dobiva brašno. Moguće je dobiti brašno s većim ili manjim udjelom omotača u brašnu, ovisno o stupnju izmeljavanja (Kljusurić, 2000).

2.1.1. Struktura pšeničnog zrna

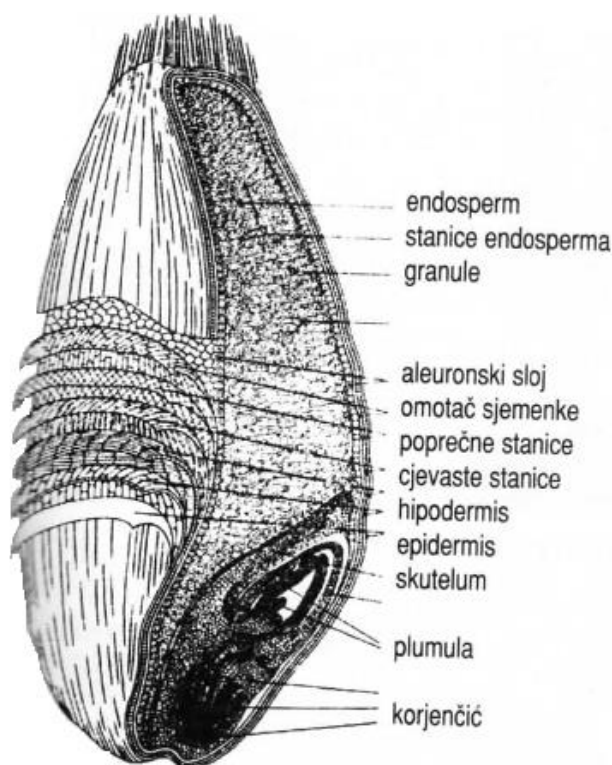
Zrno je plod pšenice, ovalnog oblika s uzdužnom brazdom usječenom u endosperm. Ovisno o vrsti i sorti, veličina zrna pšenice može varirati. Prosječno, dužina može biti od 4,2 do 8,6 mm, širina 1,6 do 4,0 mm, a debljina varira od 1,5 do 3,8 mm. Trbušna, leđna i bočna strana zrna jasno se razlikuje. Struktura pšeničnog zrna prikazana je na **Slici 1** i sastoji se od tri osnovna dijela: ovojnice ili omotača, klice i endosperma (čini oko 86 % ukupne mase zrna) (Kljusurić, 2000).

Omotač zrna čini od 6 do 26 % ukupne mase zrna, a sastoji se od plodne (vanjski dio) i sjemenske ovojnice (unutrašnji dio) ispod kojih je aleuronski sloj. Sadrži vlakna netopljiva u vodi da bi zaštitio klicu i endosperm od vanjskih uvjeta. Kemijski sastav omotača je složen, no osnovu

čine celuloza (polimer sastavljen od glukoze) te pentozani (polimer sastavljen od ksiloze i arabinoze) koji su čvrsto povezani s proteinima (Cornell, 2003.)

Klica predstavlja najmanji dio ukupne mase zrna (1,4 – 3,8 %). Građena je od embrijske osi i skuteluma (spremišta hrane). Skutelum je spojen s embrijskom osi ispod pulmule i prema endospermu. Gornji dio embrijske osi formira mladu biljčicu kada sjeme proklija, a donji dio embrijske osi se sastoji od primarnog korjenčića. Bogata je vitaminima: riboflavinom, vitaminom E te tiaminom. Sadrži i ksantofile s tragovima karotena. Tijekom prerade, zbog svojih mehaničkih svojstava, lako se odvađa od čestica endosperma (Ugarčić-Hardi, 1999.).

Najveći dio ukupne mase zrna čini endosperm. Sastoji se unutarnjeg dijela ili jezgre koja je bogata škrobom i vanjskog dijela ili aleuronskog sloja. Škrob se u endospermu nalazi u obliku škrobnih granula koje su obavijene proteinskim omotačem. Iz škrobnog endosperma se dobiva brašno čija kakvoća ovisi o njegovom sastavu. Iako botanički gledano aleuronski sloj pripada endospermu, tijekom mljevenja završava u mekinjama. U usporedbi s škrobnim endospermom, aleuronski sloj je bogat proteinima i mineralnim tvarima (Jelača, 1972.)



Slika 1 Uzdužni presjek zrna pšenice (Kljusurić, 2000.)

2.1.2. Kemijski sastav pšeničnog zrna

Kemijski sastav pšeničnog zrna iznimno je važan jer pšenica predstavlja kulturu koja se intenzivno uzgaja kao glavni izvor hrane. Mljevenjem se iz zrna pšenice dobiva brašno, glavni sastojak proizvodnje kruha i ostalih pekarskih proizvoda, ali i tjestenine i mnogih drugih proizvoda, te na taj način pšenica predstavlja glavni izvor hranjivih sastojaka većini svjetske populacije (Šramková, 2009). Prosječan kemijski sastav pšeničnog zrna prikazan je u **Tablici 1**.

Tablica 1 Prosječni kemijski sastav pšeničnog zrna (Wieser i sur., 2020)

SASTOJAK	UDIO (%)
Škrob	58,2
Vlakna	13,3
Šećeri	0,6
Voda	12,7
Proteini	10,6
Lipidi	1,8
Minerali	1,7

Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su najzastupljenija skupina spojeva u pšeničnom zrnu i čine oko 70 – 75 % zrna. Polisaharidi (škrob, celuloza i pentozani) predstavljaju najvažnije sastojke dok šećera (monosaharida i oligosaharida) ima znatno manje (Wieser i sur., 2020).

Pšenica sadrži niske razine šećera (glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze i rafinoze). Najveća koncentracija monosaharida i oligosaharida je u klici (približno 250 mg/g) dok je škrobni endosperm siromašan šećerima (Wieser i sur., 2020). Ukupna količina šećera ovisi o mnogo faktora, ponajviše ovisi o sorti pšenice, dobi sjetve i uvjetima uzgoja. Povećanjem vlage dolazi do enzimske hidrolize škroba i u skladu s time i do povećanja udijela maltoze. Tijekom sazrijevanja zrna udio šećera se smanjuje polimerizacijom u škrob (Kljusurić, 2000).

Količina škroba sadržana u pšenici iznosi između 60 i 75 % ukupne mase osušenog zrna pšenice i predstavlja glavnu komponentu pšeničnog zrna (Belderok i sur., 2000).

Celuloza je polimer neprobavljiv u ljudskom organizmu i kao takva povoljno djeluje na probavni sustav. Ovojnica pšeničnog zrna je glavni izvor celuloze koja je građena od jedinica D-glukoze povezane β -(1,4)-glikozidnim vezama.

Pentozani su polisaharidi građeni od pentoze kao osnovne jedinice polimerizacije. Iako ih u pšenici nema u velikim količinama igraju važnu ulogu tijekom proizvodnje pekarskih proizvoda. Naime, njihova razgranata struktura omogućava im vezanje velikih količina vode. Vezanjem više vode usporava se starenje pekarskih proizvoda (Kljusurić, 2000).

Proteini

Proteini ili bjelančevine građeni su od aminokiselina povezanih peptidnom vezom. Upravo je specifičan raspored aminokiselina u molekuli proteina glavni razlog velike raznolikosti među proteinima (Cornell, 2003). O proteinima pšenice najviše ovise kvaliteta brašna i reološka svojstva tijesta i pekarskih proizvoda. Sadržaj proteina u pšenici kreće se u granicama od 10 do 18 % (računato na suhu tvar). Prema topljivosti u raznim otapalima pšenični proteini svrstani su u sljedeće skupine:

- albumini – topljivi u vodi,
- globulini – topljivi u 10 %-tnoj vodenoj otopini NaCl,
- glijadini – topljivi u 70 %-tnom etanolu i
- glutenini – topljivi u slabim kiselinama i lužinama (Šramková, 2009).

Albumini i globulini čine 25 % ukupnih proteina pšenice. Najveća količina nalazi se u sjemenom omotaču, aleuronskom sloju i klici dok škrobni endosperm sadrži znatno manje količine (Belderok i sur., 2000).

Glijadini i glutenini apsorbiraju određenu količinu vode i formiraju gluten (ljepak) i čine oko 75 % ukupnih proteina pšenice. Glijadini povećavaju rastezljivost tijesta dok glutenini čine tijesto elastičnim i omogućuje mu da zadrži mjehuriće plina koje stvara kvasac, te određuje vrijeme zamjesa tijesta (Simić i Žilić, 2018).

Lipidi

Lipidi su hidrofobni kemijski spojevi topljivi u nepolarnim organskim otapalima i netopljivi u vodi. Udio lipida u pšenici iznosi 1,5 – 2,5 %. Ovisno o kemijskoj strukturi, glavni lipidi pšenice mogu se svrstati u nepolarne lipide (jednostavni gliceridi koji čine oko 70 % ukupnih lipida) i polarne lipide (glikolipidi i fosfolipidi). Osim nabrojanih, u zrnu pšenice mogu se naći i male koncentracije slobodnih masnih kiselina, sterola, sfingolipida i dr. Klica i aleuronski sloj sadrže najveće koncentracije lipida u pšeničnom zrnu (Wieser i sur., 2020).

Vitamini i minerali

Zrno pšenice važan je izvor vitamina B kompleksa, vitamina A i vitamina E. Najviše ima nikotinamida, odnosno vitamina B₃ (5100 µg na 100 g cijelog pšeničnog zrna), zatim slijedi α-tokoferol, pantotenska kiselina, tiamin, piridoksin, riboflavin i folna kiselina dok je biotin prisutan samo u tragovima. Većina vitamina koncentrirana je u aleuronskom sloju i klici dok je endosperm relativno siromašan vitaminima.

Udio mineralnih tvari u pšeničnom zrnu iznosi 1,4 – 2,0 %. Kalija i fosfora ima najviše, a prisutni su i magnezij, kalcij, cink, željezo te bakar i selenij kao elementi u tragovima. Aleuronski sloj sadrži čak 61 % ukupnih minerala pšeničnog zrna (Wieser i sur. 2020).

2.2. PŠENIČNI ŠKROB

Škrob je polisaharid opće formule (C₆H₁₀O₅)_n. Nagomilavaju ga gotovo sve zelene biljke u svojim tkivima i organima u svrhu skladištenja glukoze. Škrob nastaje u kloroplastima u procesu fotosinteze djelovanjem svjetla. Primarni produkt fotosinteze je glukoza koja se zatim kondenzira u netopljivi škrob. Ovaj škrob se razgrađuje tijekom klijanja sjemenki i zrenja voća te služi kao glavni izvor ugljikohidrata i energije u ljudskoj prehrani (Eliasson, 2004).

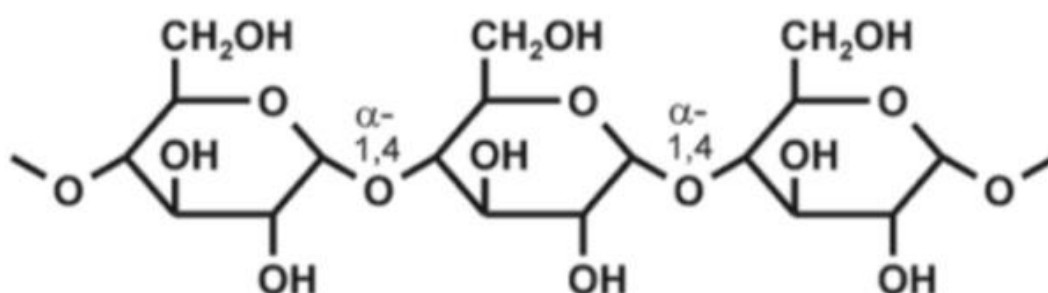
2.2.1. Građa škrobne granule

U pšeničnom zrnu škrob se nalazi u obliku škrobnih granula. Pšenica sadrži dva tipa škrobnih granula: velike (u obliku diska, veličine 25 – 40 µm) i male (sferične, veličine 5 – 10 µm). Male granule predstavljaju oko 88 % od ukupnog broja granula (Belderok i sur., 2000).

Obje vrste granula građena su od dva tipa polisaharida, amiloze i amilopektina, koji se razlikuju po stupnju polimerizacije i razgranatosti. Amiloze ima oko 25 % dok amilopektina ima oko 75 %. I amiloza i amilopektin građeni su od jedinica α-D-glukoze. Osim amiloze i amilopektina u škrobnoj granuli se umanjim količinama mogu naći i proteini, minerali, slobodne masne kiseline te lipidi (Wieser i sur., 2020).

Amiloza je ravnolančana molekula izgrađena od jedinica α-D-glukoze međusobno povezanih α-1→4 glikozidnim vezama (**Slika 2**). Osim toga, na mjestima grananja molekula amiloze sadrži bočne lance stupnja polimerizacije između 4 i 100 koji su povezani na glavni lanac α-1→6 glikozidnim vezama. Stupanj grananja raste s povećanjem molekulske mase. Učinkovitost

djelovanja egzo-enzima β -amilaze na hidrolizu ovisi o stupnju razgranatosti molekule. Ovisno o porijeklu amiloze moguće ju je hidrolizirati između 73 i 95 % pomoću enzima β -amilaze. Na topljivost molekula amiloze najviše utječe stupanj polimerizacije. Amiloza stupnja polimerizacije od 80 do 100 je teško topljiva, a topljivost se povećava u smjeru sniženja i povećanja stupnja polimerizacije. Pri višim koncentracijama otopljene molekule amiloze formiraju gel, dok pri nižim koncentracijama teže ka retrogradaciji (Walter, 1998.).

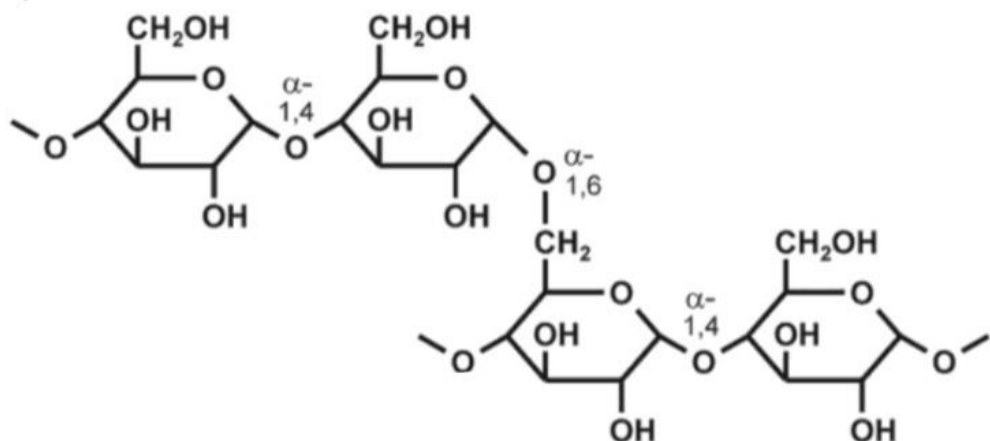


Slika 2 Struktura molekule amiloze (Wieser i sur., 2020)

Za razliku od amiloze koja je gotovo nerazgranata molekula, amilopektin je razgranati polimer u kojem su molekule glukoze povezane α -1 $\rightarrow$ 4 glikozidnim vezama u strukturu ravnog lanca te α -1 $\rightarrow$ 6 vezama na mjestima grananja (**Slika 3**). Sastoji se od nekoliko stotina lanaca gdje je svaki lanac sastavljen oko 20 – 25 jedinica α -D-glukoze. Molekulska masa amilopektina iznosi 10^7 – 10^9 i predstavlja jednu od najvećih molekula u prirodi (Buleon, 1998). Amilopektin je građen iz 3 tipa lanaca:

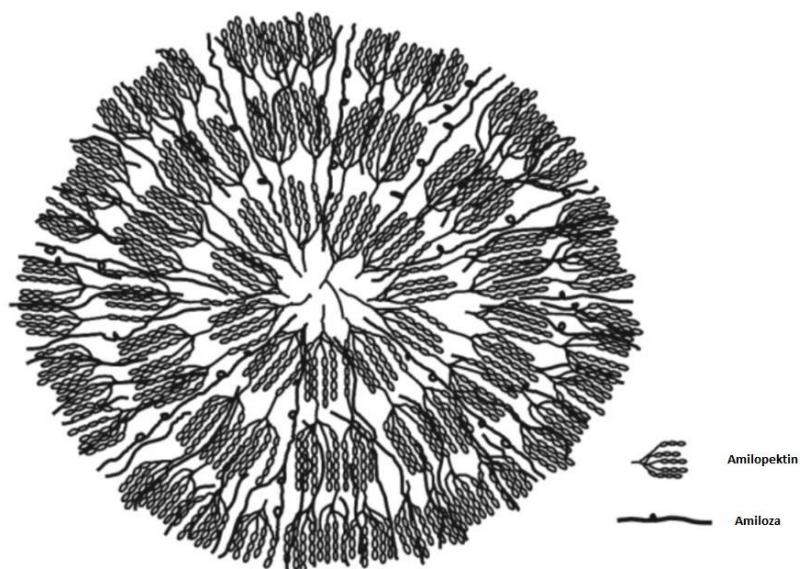
- A-lanci, ravnolančani dio u kojem su molekule glukoze povezane α -1 $\rightarrow$ 4 vezama;
- B-lanci, u kojima su molekule glukoze povezane α -1 $\rightarrow$ 4 i α -1 $\rightarrow$ 6 vezama i na sebi imaju jedan ili više A-lanaca;
- C-lanci sadrže reducirajući kraj molekule (Walter, 1998).

β -amilaza ne može cijepati mjesta grananja amilopektina budući da razgrađuje škrob polazeći od nereducirajućeg kraja i cijepa svaku drugu α -1 $\rightarrow$ 4 glikozidnu vezu. Pululunaza i izoamilaza su enzimi koji mogu cijepati α -1 $\rightarrow$ 6 veze pri čemu nastaju kraći linearni lanci (Walter, 1998).



Slika 3 Struktura molekule amilopektina (Wieser i sur., 2020)

Granule škroba imaju visok stupanj prostorne radijalne organizacije. U granulama škroba razlikuju se amorfna (neuređena) i pseudokristalna (uređena) područja. Njihovim izmjenjivanjem dolazi do stvaranja tzv. prstenova rasta. Amorfna područja čine amiloza i područja grananja amilopektina (B-lanci) dok pseudokristalična područja čine vanjski linearni lanci (A-lanci) amilopektina koji se nalaze paralelno jedan uz drugi i međusobno su povezani vodikovim vezama (**Slika 4**). Amorfna područja su podložnija djelovanju enzima (BeMiller i Whistler, 2009).

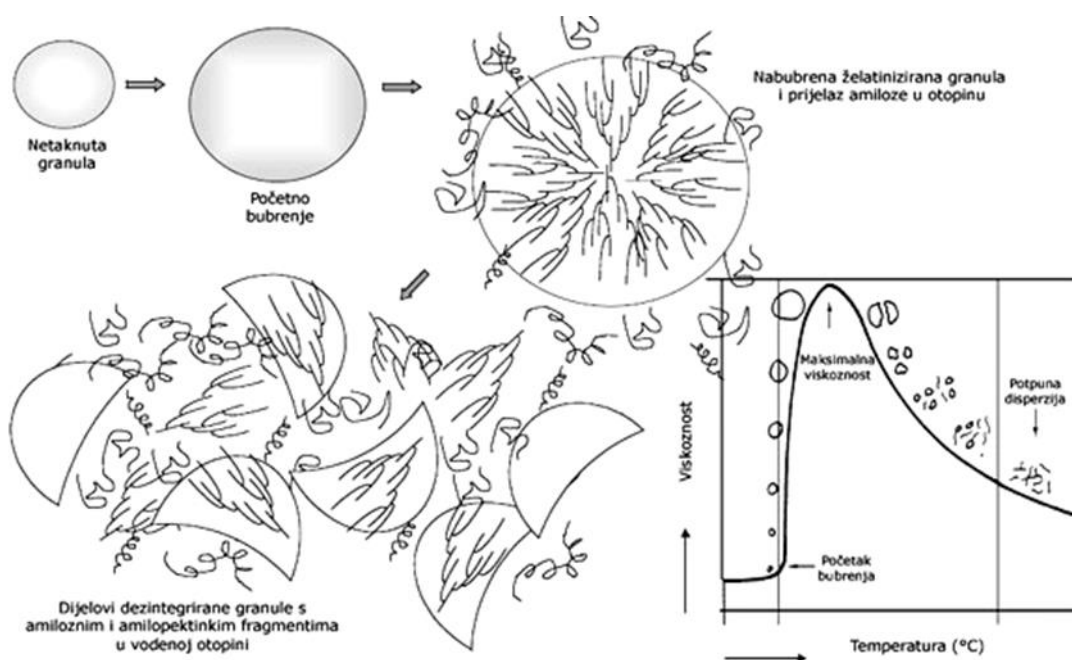


Slika 4 Shematski prikaz organizacije škrobne granule (BeMiller i Whistler, 2009)

2.2.2. Želatinizacija i retrogradacija škroba

Neoštećene škrobne granule nisu topive u hladnoj vodi (zbog jakih vodikovih veza među molekulama) no zagrijavanjem u dovoljnoj količini vode dolazi do pojave zvane želatinizacija.

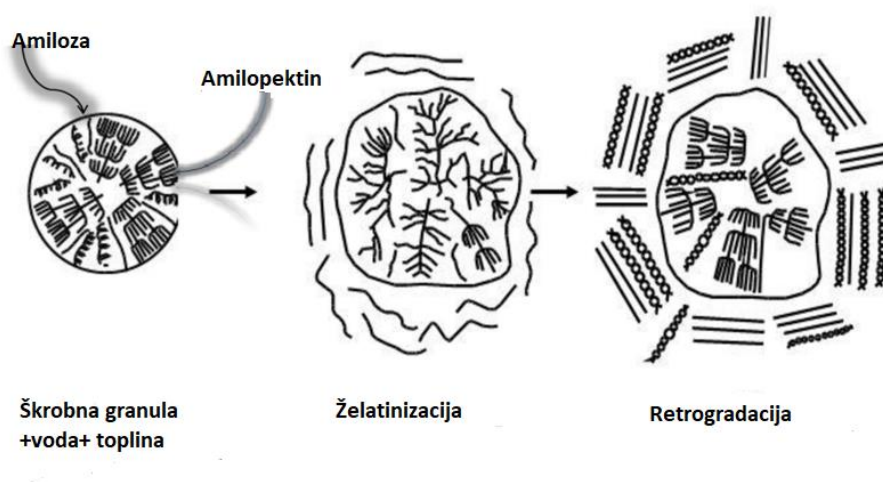
Svojstva želatinizacije i topljivost ovise o prirodi škroba, količini vode, intenzitetu miješanja te prisutnosti različitih tvari u otopini. Sam proces želatinizacije prikazan na **Slici 5** odvija se u nekoliko faza. Najprije dolazi do apsorpcije vode i bubrenja amorfnih područja škrobne granule, a zatim i narušavanja kristalnih područja. U ovoj fazi škrobna granula je još uvijek cjelovita. Nakon toga dio amiloze prelazi iz granule u vodu pri čemu dolazi do povećanja viskoznosti škrobne suspenzije i stvaranje gela, a granule postižu maksimalni volumen. Daljnjim povišenjem temperature dolazi do pucanja granula, njihove dezintegracije i likvefakcije suspenzije, a suspenzija postiže svoju konačnu viskoznost. Ovo rezultira stvaranjem škrobne paste koja se sastoji kontinuirane faze (otopljene amiloze i amilopektina) i diskontinuirane faze (neotopljeni dijelovi granule). Želatinizacijom škrob postaje potpuno podložan djelovanju amilolitičkih enzima. Hlađenjem paste dolazi do dodatnog povećanja viskoznosti. Želatinizacija pšeničnog škroba odvija se u temperaturnom rasponu od 52 °C do 85 °C (BeMiller i Whistler, 1996; Tester i sur., 2004).



Slika 5 Proces želatinizacije škroba (Tester i sur., 2004)

Kada se škrob u prisutnosti vode zagrije i nakon toga ohladi dolazi do povezivanja molekula amiloze i amilopektina vodikovim vezama, tj. želatinizirani sustav škrob/voda spontano prelazi u stanje s manjim sadržajem energije, odnosno uređenije stanje koje je termodinamički

mnogo stabilnije. Ovaj proces naziva se retrogradacija (**Slika 6**). Retrogradacija škroba praćena je nizom promjena kao što su porast viskoznosti, stvaranje gela, pojava neprozirnosti i mutnoće, izlučivanje vode iz paste te taloženje netopljivih škrobnih dijelova. Tijekom retrogradacije škroba molekule amilopektina međusobno se povezuju pomoću vanjskih kratkih lanaca dok se molekule amiloze povezuju u strukturu dvostruke uzvojnice. Za razliku od amilopektina, molekule amiloze imaju znatno veću tendenciju retrogradacije i odgovorne su za početnu tvrdoću škrobnog gela i ljepljivost (Wang i sur., 2015).

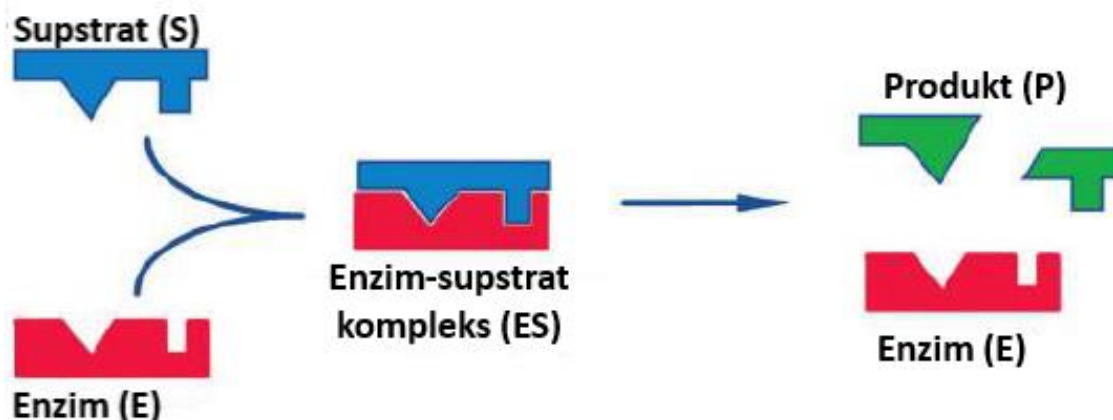


Slika 6 Retrogradacija škroba (Web 1)

2.3. PŠENIČNI ENZIMI

Enzimi su specifični proteini koji ubrzavaju (kataliziraju) kemijske reakcije snižavanjem Gibbsove slobodne energije aktivacije. Spajanjem enzima i supstrata stvara se novi reakcijski put s nižom energijom prijelaznog stanja od one kada se reakcija odvija bez enzima. U enzimskim reakcijama, supstrat je molekula prisutna na početku reakcije koju enzim pretvara u produkt. Enzimi su strogo specifični za svoje supstrate i stoga mogu katalizirati samo nekolicinu kemijskih reakcija (Van Oort, 2010).

Prvi korak u enzimskoj katalizi je stvaranje enzim-supstrat kompleksa (ES) gdje se supstrat veže na točno određeno mjesto enzima koje se naziva aktivno mjesto (**Slika 7**). Nakon toga enzim-supstrat kompleks se razgrađuje u produkt uz oslobađanje enzima koji iz reakcije izlazi nepromijenjen te se ponovno može povezati sa supstratom (Mathewson, 1998).



Slika 7 Shematski prikaz enzimske reakcije (Mathewson, 1998)

Kornbrust i sur. (2012) zaključili su da na enzimsku aktivnost utječu:

- koncentracija supstrata,
- koncentracija enzima,
- pH i temperatura,
- aktivitet vode (a_w),
- koncentracija kofaktora (neproteinske molekule, često metalni ioni) i koenzima (male organske molekule koje prenose kemijske skupine od jednog enzima do drugog)
- i inhibitori (tvari koje mijenjaju katalitičko djelovanje enzima i posljedično mogu usporiti ili zaustaviti katalizu).

U neprokljalom zrnu pšenice enzimi su prisutni u malim količinama i neaktivni su tijekom pogodnih uvjeta skladištenja brašna i pšenice. Aktiviraju se tek dodatkom vode. Klijanjem pšenice raste udio mnogih enzima što može imati negativne učinke na daljnju preradu i proizvodnju prehrambenih proizvoda (Kruger i Reed, 1988). Enzimi koji se nalaze u brašnu su:

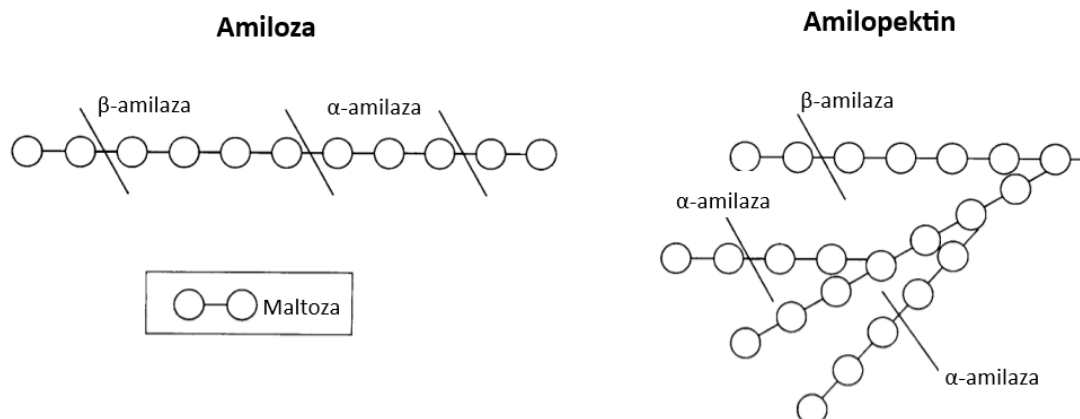
- amilolitički enzimi, odnosno enzimi koji razgrađuju ugljikohidrate i celulaze,
- proteolitički enzimi,
- esteraze (lipaze, fosfataze, fitaze),
- oksidaze (lipooksigenaze, polifenoloksidaze, peroksidaze, katalaze)
- i ostali enzimi pšenice (Kent i Evers, 1994).

2.3.1. Amilolitički enzimi

Pšenično brašno od amilolitičkih enzima (amilaza) sadrži α i β -amilazu. U normalnim uvjetima β -amilaze ima dovoljno, dok je količina α -amilaze vrlo mala. Klijanjem sjemena aktivnost α -amilaze se povećava, a aktivnost β -amilaze kontinuirano smanjuje (Goswami i sur., 1977).

α -amilaza (EC 3.2.1.1) je endo-enzim koji hidrolizira škrob nasumično razarajući α -1 $\rightarrow$ 4 glikozidne veze cijelom dužinom lanca. Kada se hidrolizira amiloza, α -amilaza nastavlja djelovati sve dok duljine lanca ne budu oko 10 – 12 jedinica glukoze. Nakon toga nastali fragmenti škroba ne mogu se dalje hidrolizirati α -amilazom. Rezultat djelovanja α -amilaze na škrob dobiva se smjesa kratkolančanih nerazgranatih molekula poznatih kao dekstrini, ali i većih fragmenata koji sadrže α -1 $\rightarrow$ 6 veze. Optimalno djelovanje ima pri pH = 5,5 – 5,6 i temperaturi od 71 °C, te je otporna na visoke temperature. U kombinaciji s β -amilazom, uz dovoljno vremena i povoljnih uvjeta, škrob je moguće gotovo u potpunosti hidrolizirati do maltoze, disaharida sastavljenog od dvije molekule glukoze. β -amilaza (EC 3.2.1.2) je egzo-enzim koji hidrolizira škrob razarajući svaku drugu α -1 $\rightarrow$ 4 vezu sa nereducirajućih krajeva škrobnih lanaca pri čemu nastaje maltoza. Optimalno djelovanje β -amilaze je kod pH = 4,5 – 5,8 i pri 62 °C. β -amilaza nije aktivna pri temperaturi preko 82 °C (pH = 5,9). Djelovanje α i β -amilaze na škrob prikazano je na **Slici 8**. Poput α -amilaze, ni β -amilaza ne može djelovati na α -1 $\rightarrow$ 6 glikozidnu vezu, tako da se hidrolizom amilopektina dobije maltoza i ostatak molekule amilopektina (od α -1 $\rightarrow$ 6 veze do reducirajućeg kraja polimera). Svaki puta kada α -amilaza razori škrobni lanac stvaraju se nova dva mjesta na kojima može djelovati β -amilaza. Upravo zbog toga α -amilaza u većoj mjeri određuje brzinu enzimske hidrolize škroba (Mathewson, 1998; Cauvain, 2015).

Količina amilolitičkih enzima igra važnu ulogu tijekom proizvodnje kruha i pekarskih proizvoda. Djelovanjem amilaza u pšeničnom brašnu nastaju dekstrini koji omogućuju kvascima kontinuiran rad tijekom fermentacije i ranih faza pečenja što rezultira boljim volumenom i boljom teksturom sredine kruha. Također dolazi do intenzivnijeg posmeđivanja kore kruha zbog dekstrinacije škroba. Upravo zato je bitno poznavanje amilolitičke aktivnosti. (Van Oort, 2010).



Slika 8 Djelovanje enzima α - i β - amilaze na škrob (Cauvain, 2015.)

Rakita i sur. (2015) su utvrdili da na aktivnost α -amilaze utječu klimatski uvjeti tijekom uzgoja pšenice, u najvećoj mjeri količina padalina. Uzorak pšenica berbe 2013. godine koju je karakterizirala prekomjerna količina padalina pokazuje višu razinu aktivnosti α -amilaze i niže vrijednosti viskoznosti škrobne paste od pšenice uzgojene u 2012. godini koju su karakterizirale visoke dnevne temperature s manjom količinom padalina.

Na amilolitičku aktivnost brašna utječu: vlažnost, pH, temperatura, koncentracija i vrsta enzima i specifična svojstva škrobnih granula. Dokazano je da će veće djelovanje amilolitičkih enzima biti ukoliko su škrobne granule oštećene tijekom mljevenja pšenice (Perten, 1964).

2.3.2. Proteolitički enzimi

Proteolitički enzimi, nazivaju se još i proteaze, proteinaze i peptidaze, kataliziraju hidrolizu peptidnih veza u proteinima. Najprije hidroliziraju proteine do manje složenih jedinica (polipeptida, peptida i sl.) koje se zatim hidroliziraju do aminokiselina, osnovne gradivne jedinice proteina. Kao i kod amilaza, klijanjem se znatno povećava sadržaj ovih enzima u pšeničnom zrnu (Jelača 1972).

Proteolitički enzimi imaju snažan utjecaj na kvalitetu tijesta i konačnog proizvoda budući da utječu na gluten i sposobnost formiranja mreže glutena. Poželjni su samo kod vrlo jakog brašna (jak i nedovoljno rastezljiv gluten). Proteolitički enzimi smanjuju vrijeme miješanja tijesta, poboljšavaju obradivost tijesta i zadržavanje plinova, poboljšavaju teksturu sredine i kore kruha te poboljšavaju boju i aromu (Van Oort, 2010).

2.3.3. Ostali enzimi

Lipaze hidroliziraju esterske veze triglicerida dajući mono- i diacilglicerole, slobodne masne kiseline, a u nekim slučajevima i glicerol (Van Oort, 2010).

Lipoksigenaze u najvećoj količini nalaze se u pšeničnoj klici. Uz prisustvo kisika iz zraka katalizira oksidaciju nezasićenih masnih kiselina pri čemu nastaju peroksidi. Nastali peroksidi mogu razoriti ksantofile i karotenoide brašna, a time i utjecati na bijeljenje brašna. Ovo svojstvo lipoksigenaze je poželjno u slučaju brašna za bijeli kruh, dok je kod brašna od tvrde pšenice, koje je žute boje, nepoželjno (Cornell i Hoveling, 2019).

Fitaze kataliziraju hidrolizu fitinske kiseline dajući inozitol i slobodne ortofosfate (Jukić i Koceva Komlenić, 2018).

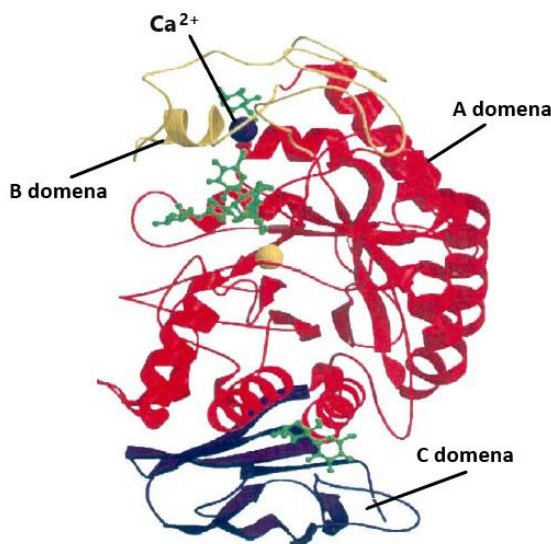
2.3.4. Uloga iona kalcija na aktivnost i stabilnost enzima

Ioni kalcija (Ca^{2+}) imaju važnu ulogu u strukturi α -amilaze. Naime, α -amilaze su metaloenzimi koji sadrže ione kalcija i sastavljene su od tri domene: A, B i C (**Slika 9**). Domene su dijelovi unutar jednog polipeptidnog lanca koje imaju svoju trodimenzionalnu strukturu i u proteinu obavljaju zasebnu funkciju. Domena A je najveća, domena B nalazi se između domena A i C i vezana je na domenu A disulfidnom vezom, a domena C čija je funkcija nepoznata povezana je s domenom A jednostavnim polipeptidnim lancem. Aktivno mjesto nalazi se u dugoj pukotini smještenoj između karboksilnog kraja A i B domene. Ion kalcija (Ca^{2+}) također je smješten između domene A i B i djeluje kao stabilizator trodimenzionalne strukture te kao alosterički aktivator (Souza i Magalhaes, 2010).

Količina iona kalcija u enzimu može varirati od jedan do deset, no samo jedan kalcijev ion po molekuli enzima je dovoljan za normalnu aktivnost i stabilnost enzima. Kalcij uzrokuje stabilnost konformacije α -amilaze, pojačava termostabilnost enzima te je uključen tijekom vezanja supstrata s enzimom. Upravo je toplinska stabilnost α -amilaze posljedica prisutnosti iona kalcija koji se povezuje s ostacima lizina. Tijekom toplinske inaktivacije prvo dolazi do reverzibilne disocijacije kalcijevih iona od nativnog enzima nakon čega slijedi nepovratna denaturacija na visokim temperaturama. Pri vrlo visokim koncentracijama kalcij pokazuje inhibitorni učinak na aktivnost enzima (Vengadaramana, 2013).

Dokazano je da etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) ima nepovratan učinak na aktivnost α -amilaze jer dolazi do gubitka Ca^{2+} koji je sekvstriran heksadenatnim ligandom EDTA.

Dodavanjem Ca^{2+} moglo bi se nadoknaditi samo 14 % aktivnosti enzima. Zamjenom Ca^{2+} s Mg^{2+} i Na^+ nije došlo do značajnog poboljšanja enzimске aktivnosti što ukazuje na to da je kalcij važna komponenta za strukturu i funkciju enzima (Singh i Kayastha, 2014).



Slika 9 Struktura α -amilaze (Souza i Magalhaes, 2010)

2.3.5. Inaktivacija enzima

Za razliku od iona kalcija koji povoljno djeluje na aktivnost enzima (sličan učinak imaju i Mg^{2+} , Na^+ i K^+), ioni Ag^+ , Hg^{2+} i Zn^{2+} uzrokuju potpunu inhibiciju amilolitičkih enzima pri određenim koncentracijama. Ioni teških metala su nekonkurentni inhibitori (supstrat se veže na aktivno mjesto enzima, a inhibitor na neko drugo mjesto na enzimu) koji inhibiraju enzime reagirajući s tiolnim skupinama ili ostacima aktivnog mjesta. Inhibirajući učinak pokazali su i ioni: Fe^{3+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Al^{2+} i Mn^{2+} . Smatra se da inhibicija ionima Cu^{2+} , Co^{2+} i Ba^{2+} nastaje zbog konkurencije između navedenih egzogenih kationa i kationa povezanog s enzimom što rezultira smanjenom aktivnošću metaloenzima (Singh i Kayastha, 2014; Vengadaramana, 2013).

Promjena amilolitičke aktivnosti očituje se promjenom viskoznosti suspenzije škroba tijekom zagrijavanja, odnosno želatinizacije. Sermek-Marčec (2015) ispitivao je utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima srebrovim nitratom (AgNO_3) i stupnja oštećenosti škroba na ispitivanje uzoraka pšeničnog brašna pomoću Mikro Visko-Amilografa i metodom broja padanja prema Harberg-Pertenu. Dokazano je da dodatkom 0,5 mM AgNO_3 dolazi do povećanja maksimalne viskoznosti suspenzije škroba zbog inaktivacije amilolitičkih enzima koji razgrađuju škrob i

uzrokuju manji intenzitet želatinizacije. Povećanjem koncentracije srebrovog nitrata dolazi do daljnjeg povećanja maksimalne viskoznosti škrobne suspenzije.

Osim srebrovog nitrata, α -amilaza se može inaktivirati metalnim ionima kao što su živa i bakar te se njezina aktivnost može smanjiti uklanjanjem iona kalcija. Iako je dokazano njihovo djelovanje na inaktivaciju amilolitičkih enzima oni se komercijalno ne koriste za smanjivanje amilolitičke aktivnosti. Pri vrlo niskim koncentracijama živin klorid pokazuje manji učinak inaktivacije amilolitičkih enzima od srebrovog nitrata. Bakar je inhibitor i α i β -amilaze, ali je dokazana njegova niska učinkovitost kao inhibitora amilaza u proklijaloj pšenici (Meredith, 1970).

McDermott i Elton (1971) istražili su učinke mnogih površinski aktivnih tvari na aktivnost α -amilaze u brašnu. Od svih ispitivanih površinski aktivnih tvari, SSF (polioksietilen monostearat) i n-dodecilamin imali su najveći učinak na temperaturu želatinizacije škroba, ali samo u velikim količinama. Količine površinski aktivnih tvari potrebne da bi se postigla učinkovita inaktivacija α -amilaze u brašnu su previsoke da bi se mogle komercijalno koristiti, te bi imale štetan učinak na svojstva proizvoda.

Poznato je da SDS (natrij dodecil sulfat), anionski deterdžent, narušava strukturu proteina, odnosno enzima. Dokazano je da slabije djeluje na pšeničnu α -amilazu. Pri koncentraciji od 1 mM SDS-a nije došlo do denaturacije α -amilaze, te je nakon 24 sata izgubljeno samo 14 % aktivnosti (Singh i Kayastha, 2014).

α -amilazu moguće je inaktivirati i djelovanjem mikrovalova, odnosno djelovanjem visoke temperature. Brašno s visokom amilolitičkom aktivnošću izloženo mikrovalnoj energiji u pećnici (1,8 KW, 2450 MHz) nakon 60 sekundi pokazuje znatno manju amilolitičku aktivnost. Aref i sur. (1972) tretirali su brašno mikrovalovima pri temperaturi od 102 °C što je rezultiralo odgovarajućom inaktivacijom enzima i povećanjem viskoznosti škrobne suspenzije. Tretman mikrovalovima nije uzrokovao štetne učinke na glavne karakteristike brašna povezane s formiranjem tijesta osim što je došlo do gubitka vlage.

2.4. METODE MJERENJA AMILOLITIČKE AKTIVNOSTI

Većina enzima brašna ne stvara probleme tijekom proizvodnje proizvoda na bazi brašna i ne uzrokuju smanjenu kvalitetu takvim proizvoda. Jedina iznimka je količina α -amilaze čije se

prisustvo u brašnu najčešće dokazuje metodom broja padanja po Hagberg-Pertenu i Brabenderovim Mikro Visko-Amilografom (Atwell i Finnie, 2016).

2.4.1. Metoda broja padanja po Hagberg-Pertenu

Metoda broja padanja (AACCI metoda 56-81.03) daje podatke o aktivnosti α -amilaze u uzorku pšeničnog brašna i drugim mljevenim žitaricama. Metoda se oslanja na smanjenje viskoznosti škrobne paste uzrokovano djelovanjem α -amilaze i činjenicu da je pšenična α -amilaza aktivna tek iznad temperature želatinizacije pšeničnog škroba (Atwell i Finnie, 2016). Viskoznost predstavlja omjer napona i brzine smicanja i jednostavno može definirati kao unutrašnje koje djeluje na tekućinu, tj. djeluje kao otpor tečenju tekućina (Lovrić, 2003).

Uređaj po Hagbergu (**Slika 10**) se sastoji od poklopljene vodene kupelji, standardizirane miješalice viskozimetra, standardizirane kivete od specijalnog stakla i mjerača vremena. Određena količina brašna i vode stavlja se u kivetu koja se umeće u vodenu kupelj. Sadržaj se miješa i zagrijava te povećanjem temperature dolazi do želatinizacije škroba. Mjeri se likvefakcija škroba pomoću α -amilaze. Broj padanja izražava se u sekundama i predstavlja zbroj vremena potrebnog za miješanje i vremena za koje miješalica viskozimetra prijeđe određenu udaljenost kroz zagrijani škrobni gel koji se nalazi u fazi likvefakcije. Vrijednost broja padanja obrnuto je proporcionalna udjelu α -amilaze u uzorku (Atwell i Finnie, 2016; Jukić i Koceva Komlenić, 2018).



Slika 10 Uređaj po Hagbergu za određivanje broja padanja (Web 2)

Vrijednost broja padanja (FN) uvelike utječe na kvalitetu kruha i pekarskih proizvoda. Optimalna vrijednost iznosi između 200 i 300 sekundi. Ukoliko je FN ispod 150 sekundi, radi se o brašnu od proklijalih pšeničnih zrna gdje je aktivnost α -amilaze viska, a kruh od takvog

brašna imao bi ljepljivu sredinu. Pri FN većim od 350 sekundi aktivnost α -amilaze je mala, a kruh bi imao mrvljivu i suhu sredinu te manji volumen (Jukić i Koceva Komlenić, 2018).

2.4.2. Mikro Visko-Amilograf

Brabenderov Mikro Visko-Amilograf (MVAG) je naprednija verzija već prihvaćenog i u praksi dokazanog amilografa koji za razliku od njega koristi mnogo manju količinu uzorka (15 g), a moguće je i softverski regulirati brzinu zagrijavanja/hlađenja suspenzije. To je rotacijski viskozimetar čiji se princip rada zasniva na mjerenju viskoznosti suspenzije brašna i vodi pri zagrijavanju određenom brzinom u rotirajućoj posudi (**Slika 11**). Djelovanjem temperature i enzima dolazi do razgradnje škroba i povećanja viskoznosti. Nakon postizanja maksimalne viskoznosti dolazi do smanjenja viskoznosti uslijed pucanja opni zrnaca škroba. Najvažniji podatak očitavan iz amilograma je maksimalna viskoznost izražena u Brabenderovim jedinicama (BU) (Atwell i Finnie, 2016). Prisustvo α -amilaze u pšeničnom brašnu ima velik utjecaj na likvefakciju škrobne paste tijekom zagrijavanja. Ukoliko je aktivnost α -amilaze velika, maksimalna viskoznost biti će manja (Dapčević Hadnađev i sur., 2011). U radu Mariotti i sur. (2005) umjesto destilirane vode upotrijebili su 1 mM AgNO_3 koja se pokazala kao učinkovit inhibitor α -amilaze. Dobiveni rezultati pokazali su da sustav pripremljen s otopinom AgNO_3 ima znatno više vrijednosti maksimalne viskoznosti od sustava pripremljenog samo s destiliranom vodom.



Slika 11 Mikro Visko-Amilograf (Cauvain i Young, 2009)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj otopina različitih koncentracija srebrovog nitrata (AgNO_3) i bakrovog sulfata (CuSO_4) na amilografske pokazatelje pšeničnog brašna i odrediti njihov inaktivacijski potencijal na amilolitičke enzime.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Materijali

Uzorak pšenice niske amilolitičke aktivnosti podvrgnut je kvašenju da bi se potaknulo klijanje odnosno da bi se dobio uzorak s visokom amilolitičkom aktivnošću. Uzorak je 3 h bio potopljen u vodu te procijeđen i ostavljen u zatvorenoj komori još 24 h, nakon čega je bio podvrgnut sušenju na zraku kroz sljedeća 3 dana. Za potrebe daljnjih analiza pšenica je samljevena na laboratorijskom mlinu Perten 3100. Dobiveno pšenično brašno predstavljalo je uzorke s vrlo visokom amilolitičkom aktivnosti.

U svrhu inaktivacije amilolitičkih enzima pripremljene su otopine AgNO_3 u koncentracijama od 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 5 mM i otopine CuSO_4 u koncentracijama od 5 mM, 10 mM, 20 mM i 50 mM. Navedene otopine korištene su tijekom amilografskog ispitivanja na Brabenderovom Mikro Visko-Amilografu.

3.2.2. Određivanje reoloških svojstava Mikro Visko-Amilografom

Amilografsko ispitivanje je provedeno pomoću Mikro Visko-Amilografa (Brabender OGH, Duisburg, Njemačka). U mjernu posudu uređaja stavljalo se 15 g brašna (korigirano na 14% vlage) i 100 g vode odnosno otopina AgNO_3 i CuSO_4 različitih koncentracija. Mjerenje je provedeno prema sljedećim parametrima:

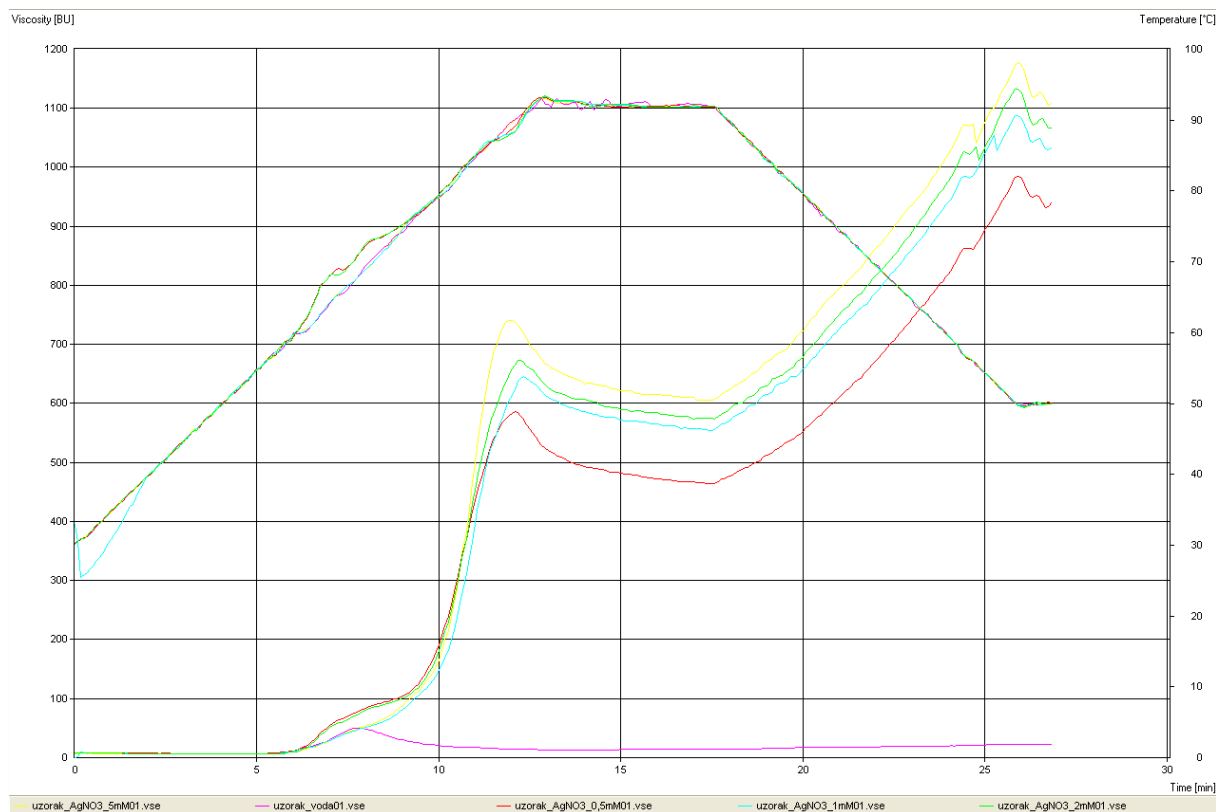
- broj okretaja: 250 min^{-1}
- mjerno područje: 300 cmg
- početna temperatura: 30°C
- brzina zagrijavanja: 5°C/min
- maksimalna temperatura: 92°C
- vrijeme zadržavanja na 92°C : 5 min
- hlađenje 5°C/min do 50°C
- vrijeme zadržavanja na 50°C : 1 min

Iz dobivene amilografske krivulje očitani su (**Slika 12 i 13**):

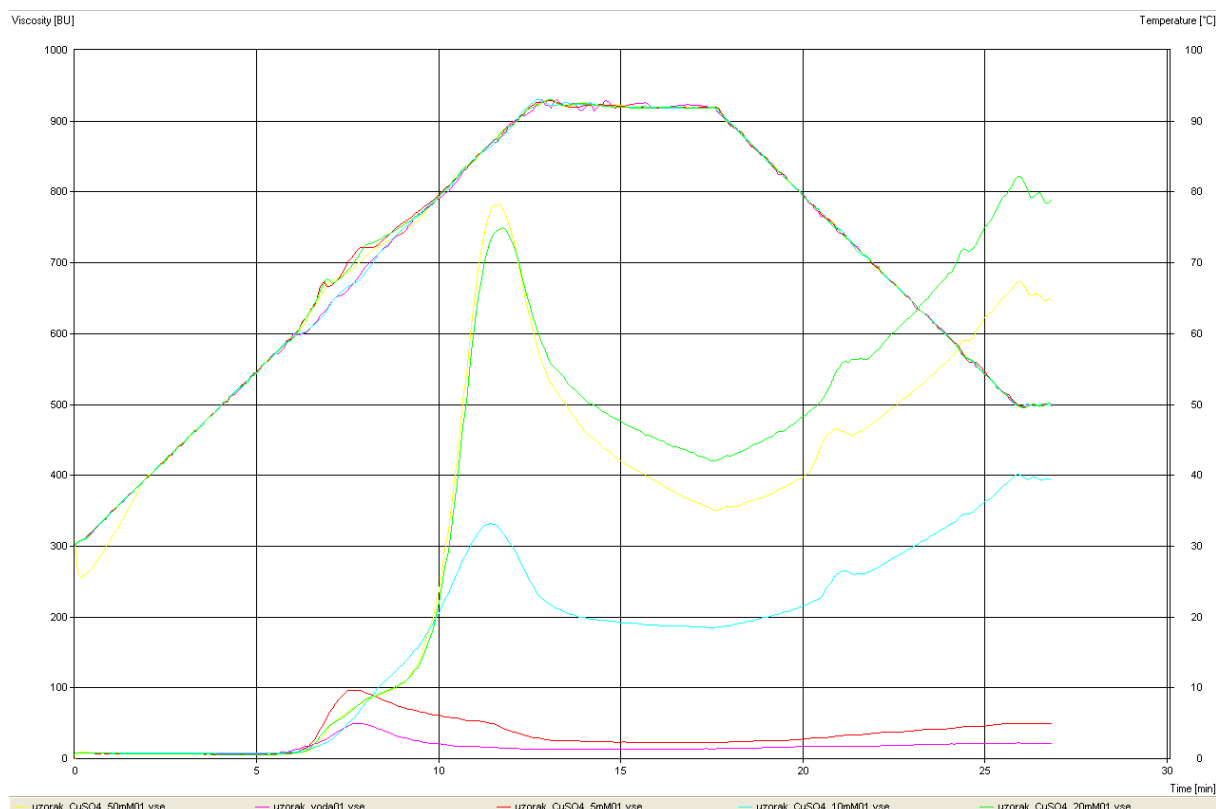
- A = početna temperatura želatinizacije (°C)
- B = temperatura maksimuma (°C)
- B = maksimalna viskoznost (BU)
- C = viskoznost na kraju zagrijavanja (BU)
- D = viskoznost na početku hlađenja (BU)
- E = viskoznost na kraju hlađenja (BU)

Iz navedenih vrijednosti izračunavaju se i sekundarni parametri:

- B-D = opadanje viskoznosti (BU)
- E-D = reasocijacijska vrijednost (BU)



Slika 12 Karakteristične amilografske krivulje nakon zamjene vode otopinama AgNO_3 (0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 5 mM)



Slika 13 Karakteristične amilografske krivulje nakon zamjene vode otopinama CuSO_4 (5 mM, 10 mM, 20 mM i 50 mM)

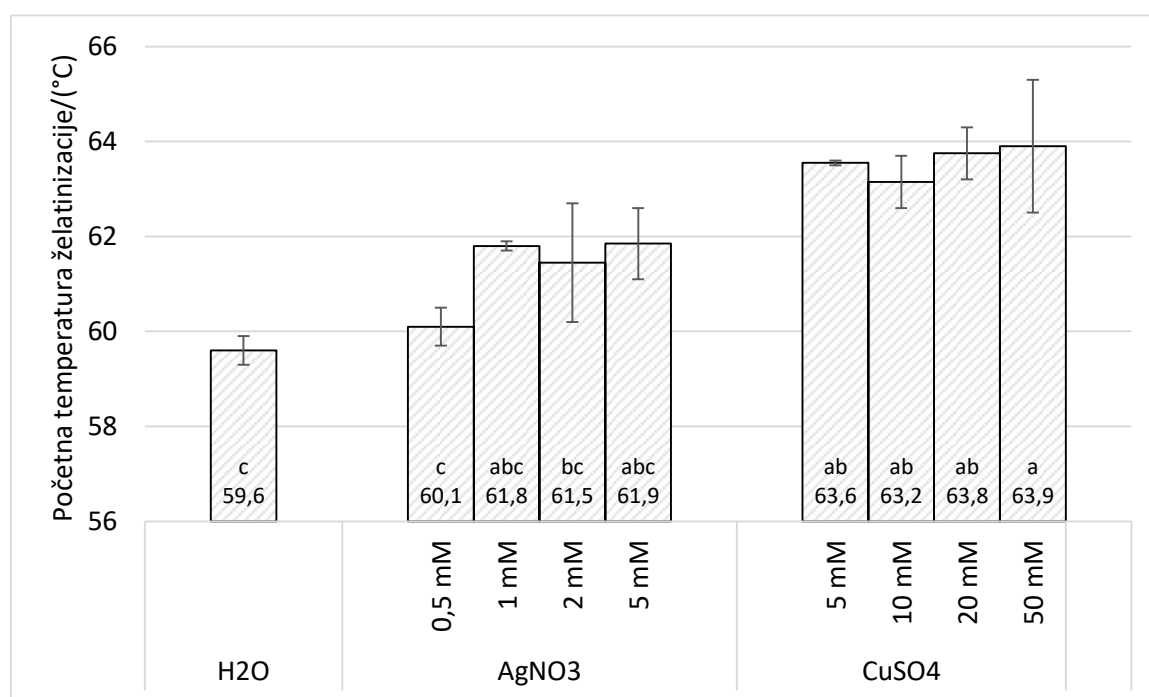
3.2.3. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Analiza varijance (one-way ANOVA) i Fisher-ov LSD test najmanje značajne razlike (engl. Least significant difference) provedeni su upotrebom programa Statistica 13.1 (Dell Inc., SAD) i Microsoft Office Excel 2016.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati inaktivacijski potencijal otopina AgNO_3 i CuSO_4 na amilolitičke enzime pšeničnog brašna. Amilografsko ispitivanje uzorka brašna s visokom amilolitičkom aktivnosti provedeno je standardno s vodom, ali i uz upotrebu različitih koncentracija AgNO_3 i CuSO_4 . Koncentracije otopina AgNO_3 iznosile su 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 5 mM. Koncentracije otopina CuSO_4 bile su 10x veće: 5 mM, 10 mM, 20 mM i 50 mM. Rezultati amilografskih ispitivanja prikazani su na **Slikama 14-18**.

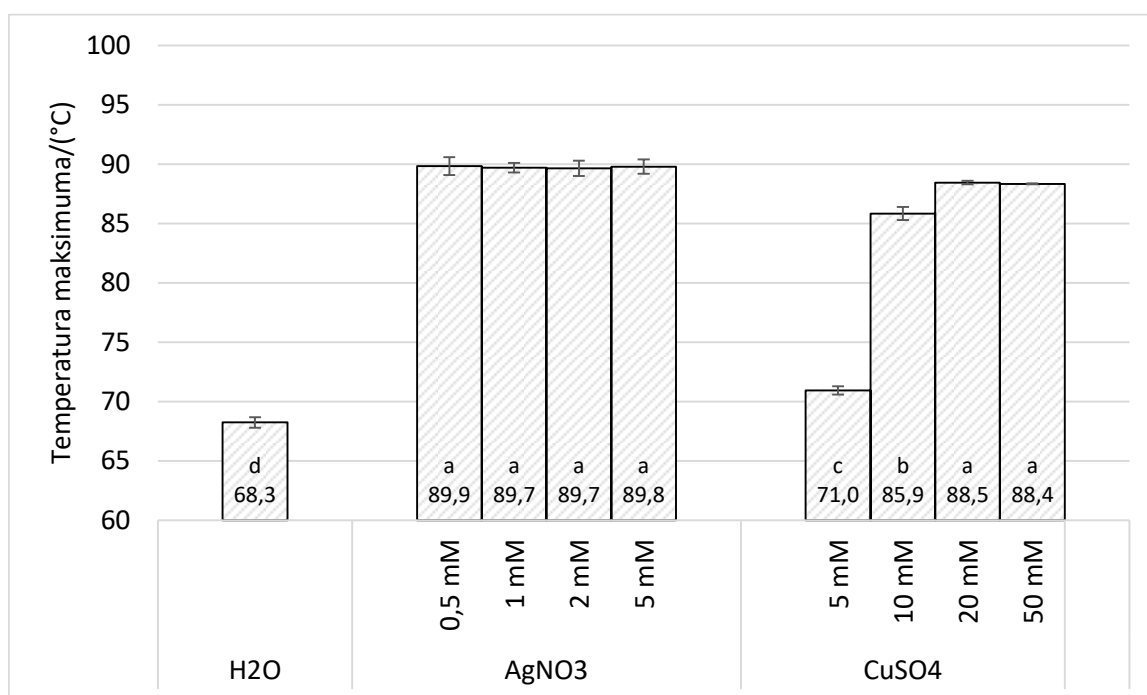
Zagrijavanjem suspenzije pšeničnog brašna i vode uz miješanje dolazi do povećanja viskoznosti zbog toga što škrobne granule apsorbiraju vodu i bubre. Početna temperatura želatinizacije predstavlja temperaturu na samom početku porasta viskoznosti tijekom zagrijavanja. Dodatkom različitih koncentracija AgNO_3 i CuSO_4 došlo je do povišenja početne temperature želatinizacije i to u većoj mjeri dodatkom CuSO_4 , no razlika u temperaturama nije velika (**Slika 14**).



Slika 14 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima na početnu temperaturu želatinizacije (prikazani podaci su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Fisher-ovom LSD testu najmanje značajne razlike)

Daljnijim zagrijavanjem suspenzije viskoznost se povećava do točke koja se zove maksimalna viskoznost. U ovoj točki je broj netaknutih škrobnih granula najveći i smatra se pokazateljem

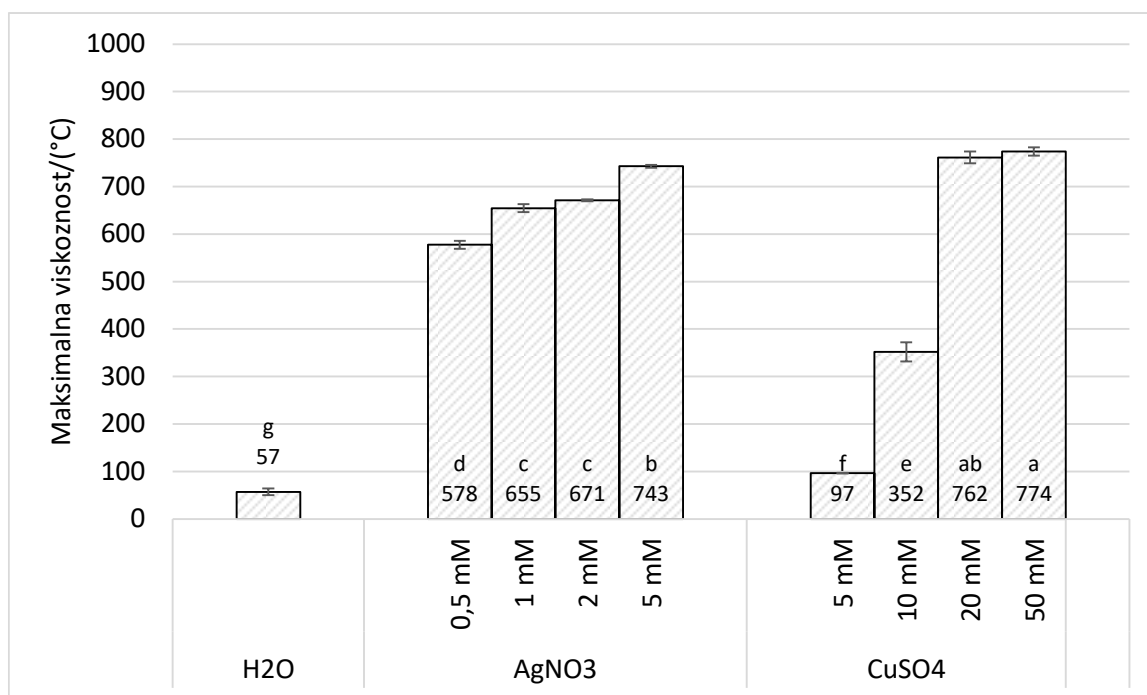
sposobnosti vezanja vode. Inaktivacijom amilolitičkih enzima pomoću različitih koncentracija AgNO_3 , čak i pri dodatku najmanje koncentracije (0,5 mM AgNO_3), došlo je do značajnog ($p < 0,05$) povišenja temperature maksimuma ($> 20^\circ\text{C}$). Za razliku od CuSO_4 gdje je povećanjem koncentracije otopine s 5 mM na 10 mM došlo do povišenja temperature maksimuma sa 71°C na $85,9^\circ\text{C}$, povećanje koncentracije otopine AgNO_3 nije utjecalo na daljnje povećanje temperature maksimuma. Razlike u temperaturama maksimuma između 20 mM i 50 mM CuSO_4 gotovo da i nema. Uspoređujući utjecaj otopina AgNO_3 i CuSO_4 vidljivo je da otopine AgNO_3 pri znatno nižim koncentracijama imaju veći utjecaj na povišenje temperature maksimuma od otopina CuSO_4 (Slika 15)



Slika 15 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima na temperaturu maksimuma (prikazani podaci su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Fisher-ovom LSD testu najmanje značajne razlike)

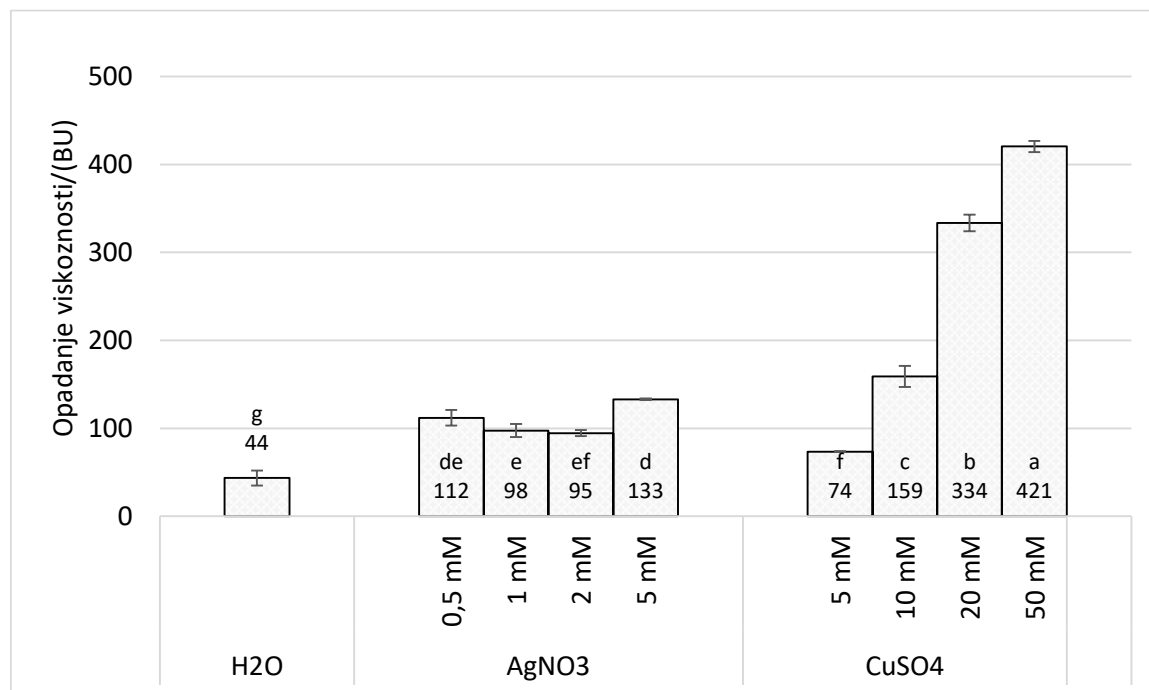
Na **Slici 16** prikazan je utjecaj različitih koncentracija otopina AgNO_3 i CuSO_4 na maksimalnu viskoznost. Maksimalna viskoznost suspenzije izražava se u Brabenderovim jedinicama (BU) i povezana je s amilolitičkom aktivnošću enzima. Ako je maksimalna viskoznost visoka, amilolitička aktivnost je niska, i obrnuto. Maksimalna viskoznost uzorka s dodatkom vode bila je vrlo mala i iznosila je 57 BU što ukazuje na izrazito visoku amilolitičku aktivnost u ovom

uzorku koja je osigurana kvašenjem pšeničnog zrna odnosno namjernim iniciranjem klijanja. Kada su umjesto vode korištene otopine AgNO_3 i CuSO_4 došlo je do rasta vrijednosti maksimalne viskoznosti što je dokaz inaktivacijskog djelovanja ovih otopina. Već u uzorku s dodatkom 0,5 mM AgNO_3 došlo je do naglog povećanja maksimalne viskoznosti koja je iznosila 578 BU. Povećanjem koncentracije otopine AgNO_3 došlo je do proporcionalnog povećanja maksimalne viskoznosti. Maksimalna viskoznost uzorka s najvećom koncentracijom (5 mM AgNO_3) iznosila je 743 BU. Uspoređujući uzorke s dodatkom različitih metala istih koncentracija (uzorak s dodatkom 5 mM AgNO_3 i uzorak s dodatkom 5 mM CuSO_4) vidljivo je da im se vrijednosti uvelike razlikuju. Maksimalna viskoznost uzorka s dodatkom 5 mM CuSO_4 iznosila je samo 97 BU, što je mnogo manje od maksimalne viskoznosti uzorka s dodatkom 5 mM AgNO_3 koja je iznosila 578 BU. Tek dodatkom 20 mM otopine CuSO_4 postigla se približno jednaka maksimalna viskoznost, odnosno približno jednak efekt na inaktivaciju amilolitičkih enzima.



Slika 16 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima na maksimalnu viskoznost (prikazani podaci su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Fisher-ovom LSD testu najmanje značajne razlike)

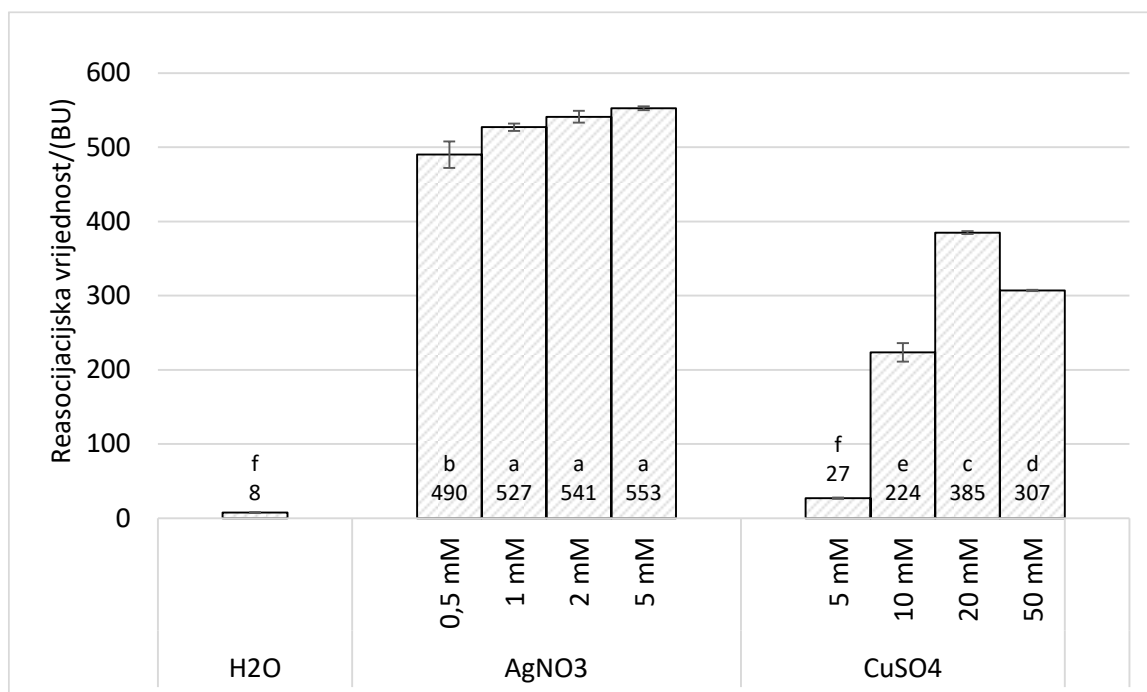
Može se zaključiti da se potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postiže dodatkom 5 mM otopine AgNO_3 ili 20 mM otopine CuSO_4 . Bhattacharya i Corke (1996) su u svom radu zaključili da se potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postiže već pri koncentracijama otopine AgNO_3 od 1mM.



Slika 17 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima na opadanje viskoznosti (prikazani podaci su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Fisher-ovom LSD testu najmanje značajne razlike)

Nakon postizanja maksimalne viskoznosti slijedi ubrzana razgradnja granula koja dovodi do pada viskoznosti. Parametar "opadanje viskoznosti" je indikator stabilnosti i što je to opadanje viskoznosti manje, veća je stabilnost škrobne paste. Uzorci s dodatkom različitih koncentracija AgNO_3 imaju veće opadanje viskoznosti od uzorka s dodatkom vode, te su im vrijednosti približno jednake, neovisno o koncentraciji. Kod uzoraka s dodatkom CuSO_4 svakim povišenjem koncentracije dolazi do povišenja opadanja viskoznosti, odnosno smanjenja stabilnosti škrobne suspenzije. U uzorku s dodatkom 5 mM CuSO_4 iznosi 74 BU, dok pri najvišoj koncentraciji (50 mM CuSO_4) iznosi 421 BU (**Slika 17**). Uzorci s dodatkom 20 i 50 mM otopine CuSO_4 imaju približno istu maksimalnu viskoznost kao i uzorci s dodatkom 5 mM otopine AgNO_3 , ali značajno veće vrijednosti opadanja viskoznosti. Mogući uzrok tomu je da otopina

CuSO_4 , osim što inaktivira amilolitičke enzime, ima i direktni utjecaj na granule škroba i stabilnost škrobne paste te uzrokuje veću likvefakciju u odnosu na otopinu AgNO_3 .



Slika 18 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima na reasocijacijsku vrijednost (prikazani podaci su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Fisher-ovom LSD testu najmanje značajne razlike)

Hlađenjem prethodno želatinizarnog uzorka dolazi do povećanja viskoznosti i formiranja gela. Parametar "reasocijacijska vrijednost" upravo se odnosi na retrogradaciju amiloznih lanaca. Iz rezultata prikazanih na **Slici 18** vidljivo je da dodatkom različitih koncentracija AgNO_3 i CuSO_4 dolazi do znatnog povišenja reasocijacijske vrijednosti, odnosno olakšava se retrogradacija amiloze i stvaranje škrobnog gela. Uzorci s dodatkom AgNO_3 imaju veće vrijednosti reasocijacijske vrijednosti, čak i pri nižim koncentracijama, od uzoraka s dodatkom CuSO_4 . Među uzorcima s dodatkom CuSO_4 najveću vrijednost reasocijacijske vrijednosti ima uzorak s dodatkom 20 mM CuSO_4 , no i dalje je ta vrijednost manja od onih kada je dodavan AgNO_3 . Iz ovoga se također može zaključiti da otopina CuSO_4 direktno utječe na svojstva škroba, a ne samo na amilolitičke enzime.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Zamjena vode otopinama AgNO_3 i CuSO_4 značajno utječe na parametre amilografske krivulje.
2. Povećanjem koncentracije dodanih otopina AgNO_3 i CuSO_4 proporcionalno se povećavaju: početna temperatura želatinizacije ($^{\circ}\text{C}$), temperatura maksimuma ($^{\circ}\text{C}$), maksimalna viskoznost (BU), opadanje viskoznosti (BU) i reasocijacijska vrijednost (BU).
3. Potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postiže se dodatkom 5 mM otopine AgNO_3 ili 20 mM otopine CuSO_4 čime je dokazana puno veća učinkovitost AgNO_3 .
4. Otopina CuSO_4 , osim što inaktivira amilolitičke enzime, ima i direktni utjecaj na granule škroba i stabilnost škrobne paste te uzrokuje veću likvefakciju i manji intenzitet retrogradacije u odnosu na otopinu AgNO_3 .

6. LITERATURA

- Aref MM, Noël JG, Miller H: Inactivation of Alpha-Amylase in Wheat Flour with Microwaves. *Journal of Microwave Power* 7(3):215-221, 1972.
- Atwell WA, Finnie S: *Wheat flour*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, SAD, 2016.
- Belderok B, Mesdag J, Donner DA: *Bread-making quality of wheat: a century of breeding in Europe*. Springer, New York, 2000.
- BeMiller JN, Whistler R: *Starch: Chemistry & Technology*. Third edition, Academic press Inc., SAD, 2009.
- BeMiller JN, Whistler R: Carbohydrates. U *Food Chemistry*, str. 191-204. Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
- Bhattacharya M, Corke H: Selection of desirable starch pasting properties in wheat for use in white salted or yellow alkaline noodles. *Cereal chemistry* 73(6):721-728, 1996.
- Buléon A, Colonna P, Planchot V, Ball S: Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23(2):85-112, 1998.
- Cauvain S: *Technology of Breadmaking*. Springer, Švicarska, 2015.
- Cauvain SP, Young LS: *The ICC Handbook of Cereals, Flour, Dough & Product Testing*. DEStech Publications Inc., Lancaster, Pennsylvania, SAD, 2009.
- Cornell H: The chemistry and biochemistry of wheat. U *Bread making: Improving quality*, str. 31-66. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 2003.
- Cornell H, Hoveling AW: *Wheat: Chemistry and Utilization*. CRC Press, New York, 2013.
- Dapčević Hadnađev T, Pojić M, Hadnađev M, Torbica A: The Role of Empirical Rheology in Flour Quality Control. U *Wide Spectra of Quality Control*, str. 335-360. InTech, Rijeka, 2011.
- Đaković LJ: *Pšenično brašno*. Zavod za izdavanje udžbenika, Novi Sad, 1980.
- Eliasson AC: *Starch in Food*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 2004.
- Gosswami AK, Jain MK, Paul B: α - and β -Amylases in seed germination. *Biologia Plantarum* 19:469-471, 1977.
- Jelača SL: *Hemija i tehnologija pšenice*. Jugoslavenski institut za prehrambenu industriju, Novi Sad, 1972.
- Jukić M, Koceva Komlenić D: Materijali s predavanja na kolegiju „Tehnologija proizvodnje i prerade brašna“. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2018.
- Kent NL, Evers AD: *Technology of cereals*. Elsevier Science Ltd, UK, 1994.
- Kljusurić S: *Uvod u tehnologiju mljevenja pšenice*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Metković, 2000.

- Kornbrust BA, Forman T, Matveeva: Application of enzymes in baking. U *Breadmaking: Improving quality*, str. 470-498. Woodhead Publishing Ltd, 2012.
- Kruger JE, Reed G: Enzymes and color. U *Wheat chemistry and technology*, Vol 1, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, SAD, 1988.
- Lovrić, T: *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, 2003.
- Mariotti M, Zardi M, Lucisano M, Pagani MA: Influence of the Heating Rate on the Pasting Properties of Various Flours. *Starch – Stärke* 57(11):564-572, 2005.
- Mathewson PR: *Enzymes*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, SAD, 1998.
- McDermott EE, Elton AH: Effect of Surfactants on the α -Amylase Activity of Wheat Flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 22:131-135, 1971.
- Meredith P: Effects of Amylases and Metals on the Pasting Properties of Wheat Flour, Determined by the Amylograph and by Hagberg's Falling-Number Method. *Cereal Chemistry* 47(5):483-491, 1970.
- Perten H: Application of the falling number method for evaluating alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry* 41:127-140, 1964.
- Rakita SM, Torbica AM, Dokić LJP, Tomić JM, Pojić MM, Hadnađev MS, Dapčević Hadnađev TR: Alpha-amylase activity in wheat flour and breadmaking properties in relation to different climatic condition. *Food and Feed Research* 42(2):91-99, 2015.
- Sermek-Marčec I: Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima i stupanj oštećenja škroba na amilografski profil pšeničnog brašna. *Diplomski rad*. Prehtambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Simić M, Žilić S: Proteini pšenice sa tehnološkog, nutritivnog i zdravstvenog aspekta. *Hrana i ishrana* 59(2):68-73, 2018.
- Singh K, Kayastha: α -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. *Food Chemistry* 162:1-4, 2014.
- Souza PM, Magalhaes PO: Application of microbial α -amylase in industry—a review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:850-861, 2010.
- Šramková Z, Gregová E, Šturdík E: Chemical Composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca* 2(1):115-138, 2009.
- Tester RF, Karkalas J, Qi X: Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship. *World's Poultry Science Journal* 60(2):186-195, 2004.
- Ugarčić-Hardi Ž: *Tehnologija proizvodnje i prerade brašna*, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 1999.

- Van Oort M: Enzymes in bread making. U *Enzymes in Food Technology*, str. 103-143. Blackwell Publishing Ltd., UK, 2010.
- Van Oort M: Enzymes in food technology-introduction. U *Enzymes in Food Technology*, str. 1-16. Blackwell Publishing Ltd., UK, 2010.
- Vengadaramana A: Industrial Important Microbial alpha-Amylase on Starch-Converting Process. *Scholars Academic Journal of Pharmacy* 2(3):209-221, 2013.
- Walter RH: *Polysaccharide association structures in food*. Marcel Dekker Inc., New York, SAD, 1998.
- Wang S, Li C, Copeland L, Niu Q, Wang S: Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14(5):568-585, 2015.
- Wieser H, Koehler P, Scherf KA: *Wheat-An Exceptional Crop*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 2020.
- Web 1: <http://www.food-info.net/uk/carbs/starch.htm> (31.8.2020.)
- Web 2: https://bastak.en.ec21.com/Falling_Number_5000_Enzyme_Meter--6048724_6048924.html (7.9.2020.)