Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima srebrovim nitratom i bakrovim sulfatom na broj padanja prema Hagberg-Pertenu

Topić, Matea

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:109:224819

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Matea Topić

UTJECAJ INAKTIVACIJE AMILOLITIČKIH ENZIMA SREBROVIM NITRATOM I BAKROVIM SULFATOM NA BROJ PADANJA PREMA HAGBERG-PERTENU

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 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 18, 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 2019./2020. održanoj 25. lipnja 2020.
Mentor:	prof. dr. sc. *Marko Jukić*

UTJECAJ INAKTIVACIJE AMILOLITIČKIH ENZIMA SREBROVIM NITRATOM I BAKROVIM SULFATOM NA BROJ PADANJA PREMA HAGBERG-PERTENU

Matea Topić, 0113140476

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj otopina različitih koncentracija srebrovog nitrata ($AgNO_3$) i bakrovog sulfata ($CuSO_4$) na vrijednosti broja padanja prema Hagberg-Pertenu (FN) i likvefakcijski broj (LN), odnosno utvrditi njihov inaktivacijski potencijal na amilolitičke enzime pšeničnog brašna. Uzorak brašna s visokom amilolitičkom aktivnošću dobiven je mljevenjem pšenice koja je prethodno bila podvrgnuta kvašenju kako bi se potaknulo klijanje. U svrhu inaktivacije amilolitičkih enzima pripremljene su otopine $AgNO_3$ i CuSO4 u različitim koncentracijama. Navedene otopine korištene su tijekom ispitivanja na uređaju za određivanje broja padanja prema Hagberg-Pertenu. Osim standardnog određivanja broja padanja sva mjerenja su provedena i na način da su uzorci prethodno hidratizirani tijekom 20 min prije provođenja ispitivanja kako bi se vidjelo da li hidratizacija ima utjecaj na izmjerene vrijednosti.
Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se povećanjem koncentracije dodanih otopina $AgNO_3$ i $CuSO_4$ proporcionalno povećava broj padanja, a smanjuje likvefakcijski broj. Potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postiže se dodatkom 2 mM otopine $AgNO_3$ ili 20 mM otopine $CuSO_4$ čime je dokazana puno veća učinkovitost $AgNO_3$. Nije bilo statistički značajne razlike između vrijednosti dobivenih standardnom metodom i metodom uz prethodnu hidratizaciju uzoraka. Za definiranje parametara kinetike ovisnosti broja padanja u ovisnosti o koncentraciji inhibicijske otopine uspješno se može primijeniti sigmoidalni model, a za definiranje parametara kinetike ovisnosti likvefakcijskog broja model eksponencijalnog pada prvog reda.

Ključne riječi:	Pšenično brašno, inhibicija amilaza, broj padanja, likvefakcijski broj
Rad sadrži:	35 stranica 6 tablica 12 slika 25 literaturnih referenci
Jezik izvornika:	Hrvatski

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

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

Datum obrane: 30. listopada 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, 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 18, 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 June 25, 2020.
Mentor:	*Marko Jukić*, PhD, full prof.

INFLUENCE OF AMYLOLYTIC ENZYME INACTIVATION BY SILVER NITRATE AND COPPER SULFATE ON HAGBERG-PERTEN FALLING NUMBER

Matea Topić, 0113140476

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 falling number (FN) and liquefaction number (LN), as well to determine their inactivation potential on wheat flour amylases. A flour sample with high amylolytic activity was obtained by grinding wheat that had previously been soaked in the water to encourage germination. In order to inactivate amylases, different concentrations of the solutions of $AgNO_3$ and $CuSO_4$ were prepared. These solutions were used during testing on Hagberg-Perten Falling number apparatus. In addition to the standard determination, all measurements were also performed with sample pre-hydration (20 min) to determine effect of hydration on the measured values.

Based on the obtained results, it can be concluded that increasing the concentration of added solutions of $AgNO_3$ and CuSO*4* proportionally increases the Falling number and the Liquefaction number. Complete inactivation of amylases was achieved with the addition of 2 mM $AgNO_3$ and 20 mM $CuSO_4$ thus proving much higher efficiency of $AgNO_3$. There was no statistical significant difference between the values obtained by the standard method and the method with prior hydration of the samples. The sigmoidal model can be successfully applied to define the parameters of the kinetics of the dependence between the Falling number and the concentration of the inhibition solution, and the first order model of the exponential decay can be successfully used to define the parameters of the liquefaction number kinetics.

Key words:	wheat flour, amylase inhibition, falling number, liquefaction number
Thesis contains:	35 pages 6 table 12 figures 25 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: October 30, 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Sadržaj

1. UVOD **1**
2. TEORIJSKI DIO **3**
2.1. PŠENICA 4
2.2. KEMIJSKI SASTAV ZRNA I BRAŠNA PŠENICE 7
2.2.1. Proteini *7*
2.2.2. Ugljikohidrati *8*
2.2.3. Lipidi *10*
2.2.4. Ostale komponente *10*
2.3. ENZIMI 10
2.3.1. Struktura i specifičnost enzima *11*
2.3.2. Mehanizam djelovanja enzima *11*
2.3.3. Utjecaji na aktivnost enzima *13*
2.4. AMILOLITIČKI ENZIMI 14
2.4.1. *Uloga iona kalcija na aktivnost α-amilaze* 16
2.4.2. *Inaktivacija α-amilaze* 16
2.5. MJERENJE AMILOLITIČKE AKTIVNOSTI METODOM BROJA PADANJA 18
3. EKSPERIMENTALNI DIO **20**
3.1. ZADATAK *21*
3.2. MATERIJALI *21*
3.3. METODE *21*
3.3.1. Određivanje broja padanja i likvefakcijskog broja *21*
3.3.2. Statistička obrada rezultata *22*
3.3.3. Modeliranje parametara broja padanja i likvefakcijskog broja *22*
4. REZULTATI I RASPRAVA **25**
5. ZAKLJUČCI **31**
6. LITERATURA **33**

1. UVOD

Pšenica je prava žitarica roda *Triticum* iz porodice trava. Prilagodljivost i visoki prinosi doprinijeli su njezinoj dominantnosti i rasprostranjenosti u svijetu. Međutim glavna prednost je glutenska proteinska frakcija pšeničnog brašna koja ima visokoelastična svojstva.

Zrno pšenice sastoji se od omotača, endosperma i klice. Najzastupljenije komponente pšeničnog brašna kojeg dobijemo mljevenjem zrna uključuju proteine, ugljikohidrate, lipide, mineralne tvari i vlakna. Prisutne proteine dijelimo na fiziološki aktivne (albumin i globulin) te rezervne bjelančevine (glijadin i glutenin). Ugljikohidrati zauzimaju do dvije trećine mase zrna od kojih je daleko najzastupljeniji škrob. Škrob se sastoji od amiloze i amilopektina, dvije frakcije polisaharida sastavljenih od jedinica α-D-glukoze povezanih α-1,4 i α-1,6 glikozidnim vezama. Zagrijavanjem škrobnih granula u vodi dolazi do želatinizacije škroba, a stajanjem i hlađenjem dolazi do ponovnog povezivanja molekula odnosno retrogradacije.

Enzimi su po kemijskom sastavu proteini. Prisutni su u svim živim bićima i neophodni su za normalno funkcioniranje organizama. Nazivamo ih biološkim katalizatorima jer ubrzavaju (bio)kemijske reakcije u organizmu na način da smanjuju energiju aktivacije. Od enzima prisutnih u pšeničnom brašnu u ovom radu koncentrirat ćemo se na amilolitičke enzime.

Amilolitičke enzime ubrajamo u grupu glikohidrolaza. To su enzimi koji hidroliziraju škrobne ugljikohidrate. Postoje četiri grupe enzima koji razgrađuju škrob: endoamilaze, egzoamilaze, enzimi koji hidroliziraju grananja i transferaze. α-amilaza je endoenzim što znači da nasumično cijepa α-1,4 glikozidne veze unutar molekule amiloze i amilopektina. Od egzoenzima važne su β-amilaza, glukoamilaza te α-glukozidaza koje hidroliziraju veze s nereducirajućeg kraja molekule.

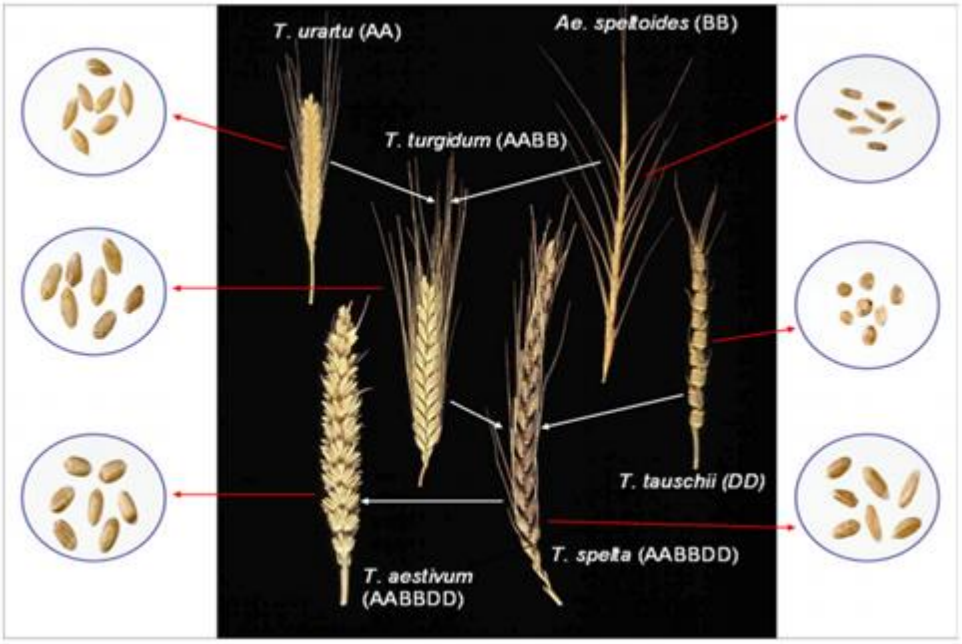
Za određivanje aktivnosti amilolitičkih enzima u brašnu pšenice jednostavnom i pouzdanom se pokazala metoda određivanja broj padanja FN (engl. *Falling Number*) koju su razvili Hagberg i Perten. Metoda se temelji na sposobnosti α-amilaze da provede likvefakciju želatiniziranog škroba. U ovom radu ispitan je utjecaj otopina različitih koncentracija srebrovog nitrata i bakrovog sulfata na intenzitet inaktivacije amilolitičkih enzima u pšeničnom brašnu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PŠENICA

Pšenica, riža i kukuruz su u odnosu na ostale žitarice tri najdominantnije žitarice prisutne na svjetskim oranicama (najveće zasijane površine i opseg proizvodnje). Pšenicom je zasijana gotovo jedna četvrtina obradivih površina i uzgaja se na svim kontinentima. Godišnja proizvodnje pšenice u svijetu se kreće oko 600 milijuna tona. Ključan je dio kulture i religije populacija diljem svijeta. Pšenica se koristi u ljudskoj prehrani gdje je neizostavna kao glavna krušarica, ishrani životinja kao stočna hrana te u industrijskoj preradi.

Prvi puta pšenica se uzgajala prije oko 10 000 godina kao dio „Neolitske revolucije". Ti najraniji kultivirani oblici bili su diploidne (genom AA) (einkorn) i tetraploidne (genom AABB) (emmer) pšenice. Einkorn i emmer razvili su se pripitomljavanjem prirodnih populacija. Krušna pšenica (*Triticum aestivum*) postoji samo u uzgoju, nastala je hibridizacijom emmera s divljom travom *Triticum Tauschii* (Shewry, 2009). Danas se pšenica prema broju kromosoma dijeli na diploidnu (2n = 24), tetraploidnu (2n= 28) gdje se ubraja *Triticum durum* i heksaploidnu (2n = 42) gdje spada *Triticum aestivum* (Kovačević i Rastija, 2014.).



Slika 1 Evolucija *Triticum aestivum* (Shewry, 2009.).

Danas je poznato oko 20 vrsta pšenice. U rodu *Triticum* gospodarsko značenje imaju vrste *Triticum aestivum* ssp. *vulgare* (obična ili meka pšenica) i *Triticum durum* (tvrda pšenica). Trenutno oko 95% pšenice koja se uzgaja u svijetu pripada heksaploidnoj krušnoj ili mekoj pšenici, a većina ostalih oko 5% čini tetraploidna tvrda pšenica.

Uz dovoljno vode i nutrijenata te kontrolu štetnika i patogena prinosi mogu biti do 10 tona po hektaru. Nedostatak nekih od faktora rezultat je da se globalni prinosi kreću oko 2,8 tona po hektaru. Najviše pšenice proizvode Kina, SAD i Rusija, dok su najveći prinosi u europskim zemljama (Shewry, 2009.).

Prilagodljivost i visoki prinosi su doprinijeli njezinoj raširenosti u svijetu, međutim sami nisu dovoljni da objasne dominaciju nad drugim žitaricama. Ključna prednost u odnosu na ostale žitarice umjerenog klimatskog pojasa su jedinstvena svojstva pšeničnog brašna. Tijesta iz pšeničnog brašna su specifična zbog glutenske proteinske frakcije koja ima viskoelastična svojstva koja onda omogućavaju preradu tijesta u kruh, tjesteninu i druge prehrambene proizvode. Pšenica sadrži esencijalne aminokiseline, minerale i vitamine, korisne fitokemikalije te vlakna kojima su posebno bogati proizvodi od cjelovitih žitarica. Karakteristično za pšenicu je i to da se proizvodi od pšenice vežu se uz celijakiju i necelijakijsku osjetljivost na gluten (Shewry, 2009.).

Pšenica je prava žitarica roda *Triticum* iz porodice trava. Sastoji se od žiličavog korijenovog sustava koji hranjivo i vodu dobavlja korijenovim dlačicama. Pšenica ima više primarnih korjenčića kao i sekundarnih korjenčića koji čine glavnu masu korijenovog sustava. Uz korijen tu je i stabljika koja se sastoji od nodija (koljenaca) i internodija (međukoljnaca). Stabljika je u nodiju pregrađena poprečnom pregradom gdje se križaju provodni snopići, a na tom dijelu se razvija list. Svaki nodij ima jedan list. Listovi su raspoređeni spiralno jer tako imaju bolji kontakt sa svjetlošću, a sastoje se od rukavca i plojke. Pšenica ima cvat u obliku klasa koji se sastoji od klasnog vretena na kojem su raspoređeni klasići.

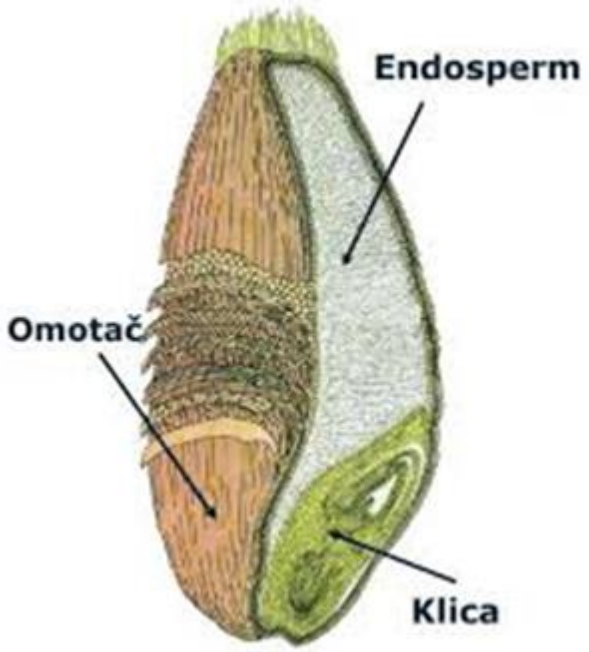
Plod pšenice naziva se zrno ili pšeno. To je jednosjemeni plod (*caryopsis*) s tankim omotačem ploda sraslim sa sjemenom. Zrno je izduženog oblika različite leđne (ispupčene) i trbušne strane na kojoj se nalazi dublja brazdica. Bradica koja se sastoji od dlačica se nalazi na vrhu zrna. Kod durum pšenice bradica i brazdica su slabije izražene nego kod mekih pšenica. U bazi zrna vidljiva je klica. Prave žitarice u koje ubrajamo i pšenicu imaju golo zrno jer ono ispada prilikom žetve iz pljevice (Kovačević i Rastija, 2014.).

Anatomska građa zrna pšenice

Zrno žitarica se sastoji od omotača, endosperma i klice. Omotač zrna sastoji se od vanjskog sloja perikarpa i unutrašnjeg perisperma. Ima višestruku ulogu: služi kao zaštita za unutarnje dijelove, upija vodu za vrijeme klijanja te omogućuje bubrenje zrna. Udio omotača u ukupnoj masi zrna pšenice iznosi 12-15%.

Endosperm obuhvaća najveći dio zrna (80-90%), a služi kao rezerva hranjive tvari za klijanje i nicanje. Periferni dio endosperma je auleuronski sloj od jednog sloja stanica koje sadržavaju aleuronska zrnca u kojima su proteini, ulja, pigment (ksantofil) i enzimi (amilaze). Unutarnji endosperm sastoji se od krupnih stanica koje su ispunjene škrobnim zrncima između kojih se nalaze rezervni proteini (glijadin i glutenin). Na osnovi razlika između škrobnih zrnaca moguće je utvrditi o brašnu koje žitarice se radi. Pšenica ima slojevita škrobna zrnca u obliku koncentričnih krugova srednje veličine.

Klica se nalazi u bazi zrna, a udio u masi zrna pšenice je 1,5-3%. U donjem dijelu klice nalazi se korjenčić klice iz kojeg se prilikom klijanja razvija primarni korijen, a iznad je stabalce klice koje je budući nadzemni dio biljke (Kovačević i Rastija, 2014.).



Slika 2 Anatomska građa zrna pšenice (Causgrove i sur.,2004.).

2.2. KEMIJSKI SASTAV ZRNA I BRAŠNA PŠENICE

Postoje razlike u kemijskom sastavu zrna i unutar iste biljne vrste uzgojene u različitim agroekološkim uvjetima (tip tla, vremenske prilike, klima, itd.). Većinu mase čini organska tvar, a najzastupljenije komponente su ugljikohidrati (škrob), proteini, lipidi, celuloza i mineralne tvari.

Tablica 1 Prosječan kemijski sastav zrna pšenice (%suhe tvari) uz 14% vode u zrnu (Kovačević i Rastija, 2014.).

Vrsta	Proteini	Ugljikohidrati	Masti	Celuloza	Mineralne tvari
Meka pšenica	12-16	64-76	2	2-3	2
Tvrda pšenica	16-25	60-67	2	2-3	2

Prerada zrna u brašno odnosno meljava može biti jednostavna, u tom slučaju se melje cijelo zrno, ili složena, prilikom koje se odvaja omotač, aleuronski sloj i klica, a melje endosperm. Što više dijelova zrna zadržimo to će brašno imati više vitamina, minerala i vlakana no bit će zahtjevnije za čuvanje. Koji ćemo tip pšeničnog brašna dobiti ovisi o finoći mljevenja, količini samljevenih dijelova zrna i upotrijebljenoj sorti pšenice (Kovačević i Rastija, 2014.).

Endosperm čini najveći dio zrna (80-90%), a najveći dio endosperma je škrob (80%). Brašno se dakle sastoji pretežno od škroba, iako i ostale komponente utječu na svojstva brašna. Od ostalih komponenti tu su proteini (9-14%), lipidi (1-3%), neškrobni ugljikohidrati (1-2%), mineralne tvari (0.5%) te voda (13-14%) (Whitehurst i Oort, 2010.).

2.2.1. Proteini

Proteini su organski spojevi važni za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Sadrže esencijalne aminokiseline koje je neophodno u organizam unijeti u dovoljnim količinama. Staklasta zrna imaju veće količine proteina u svim dijelovima od brašnastih zrna. Periferni dio endosperma je uvijek bogatiji proteinima od ostatka. Na količinu proteina imaju utjecaj klima i vremenske prilike područja na kojem se uzgaja pšenica te gnojidba dušikom.

Proteini u zrnu podijeljeni su prema topljivosti u vodi u dvije grupe: fiziološki aktivne i rezervne. U fiziološki aktivne proteine ubrajamo albumin (otapa se u vodi) i globulin (otapa se u otopini

NaCl). Ove proteine nalazimo u aleuronskom sloju i klici. Rezervnim proteinima pripadaju glijadin (otapa se u alkoholu) i glutenin (otapa se u lužinama). Sastavni su dio endosperma. Pšenica je specifična po tome sto sadrži podjednake količine glijadina i glutenina, a takav omjer se smatra idealnim. Prilikom mehaničke obrade u prisutnosti vode nastaje elastično-plastična masa poznatija kao gluten ili lijepak. Može nabubriti do 200% te daje tijestu svojstva koja su neophodna u pekarstvu jer daju proizvod koji je porozan i voluminozan. Gluten pšenice zbog idealnog omjera proteina i svojstava koje imaju smatra se najkvalitetnijim. Gluten je kvalitetan kad bubri, ne puca te je elastičan i postojan. Glijadin se ponaša kao viskozna tekućina dok se glutenin ponaša kao kohezivna elastična krutina. Količina vlažnog glutena u zrnu pšenice iznosi 16-50% (Kovačević i Rastija, 2014.).

Proteini glutena sadrže: glutaminsku kiselinu (u obliku glutamina u zrnu pšenice), prolin, hidrofobne aminokiseline i cistein. Glutamin i hidrofobne aminokiseline osiguravaju dovoljno vodikovih veza tijekom miješanja što pomaže prilikom stvaranju filma. Prolin narušava stvaranje α-zavojnice pa tako nastaje više β-nabranih ploča što daje glutenu potrebnu elastičnost. Sumpor iz aminokiseline cistein osigurava stvaranje disulfidnih mostova između i unutar proteinskih lanaca dajući proteinskoj mreži snagu. Sve ove aminokiseline zajedno omogućavaju brzo nastajanje filma koji daje pšeničnom tijestu karakterističnu visokoelastičnost i kapacitet zadržavanja plinova (Whitehurst i Oort, 2010.).

2.2.2. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati zauzimaju do dvije trećine mase zrna. Najveći dio je škrob, oko 90%, koji se nalazi u endospermu. Najkoncentriraniji je u sredini zrna, a koncentracija mu se smanjuje prema periferiji zrna. Od neškrobnih polisaharida važni su pentozani. Pentozani su građeni od pentoza šećera među kojima su najvažniji arabinoza i ksiloza te nešto heksoza šećera. Nalaze se u aleuronskom sloju i endospermu. Iako im je koncentracija u pšeničnom brašnu niska (2-3%) vrlo su važni u određivanju svojstava tijesta, kvalitete glutena zbog interakcija između proteina i pentozana i konačne kvalitete kruha. Imaju visoki kapacitet vezanje vode i do 10 puta više od svoje težine te su važni za ekonomičnost procesa. Ostalih 10% su topivi šećeri saharoza i maltoza koji se pretežno nalaze u klici (Whitehurst i Oort, 2010.).

Škrob je jedan od najčešćih ugljikohidrata koji se javljaju u prirodi i najvažniji je izvor nutrijenata za ljude i životinje. Skladišni je oblik energije za biljke gdje se nalazi u obliku granula. Kod pšenice

se nalazi u endospermu u obliku velikih lećastih i malih sfernih granula. Prisutna je razlika između velikih i malih granula u kemijskom sastavu. Male granule sadrže više lipida i imaju niži sadržaj amiloze dok velike škrobne granule imaju veći udio dugih amilopektinskih lanaca. Velike i male granule u pšenici isto tako imaju različito ponašanje u proizvodnji kruha (Vermeylen i sur., 2005.).

Nativne škrobne granule su netopive u hladnoj vodi, dok zagrijavanjem u vodi dolazi do istjecanja molekula amiloze iz škrobnih granula. Daljnjim zagrijavanjem iz molekule škroba izlaze još veće količine amiloze te amilopektin. Ovaj proces naziva se želatinizacija. U pšenici se događa na temperaturama između 52°C i 85°C. Nakon zagrijavanja, hlađenjem dolazi do ponovnog povezivanja u organiziranu kristalnu strukturu što se naziva retrogradacija. Molekule amiloze podložnije su retrogradaciji od molekule amilopektina.

Škrob se sastoji od molekula α-D-glukoze povezanih α-1,4 i α-1,6 glikozidnim vezama. Ove glikozidne veze su u α-konfiguraciji što omogućava polimerima škroba da formiraju spiralne strukture, što onda utječe na fizikalno-kemijska svojstva i osjetljivost na enzime. Škrob u zrnu pšenice se nalazi u dvije frakcije u obliku amiloze i amilopektina, a oba su homopolimerne molekule odnosno sastoje se od molekula α-D-glukoze.

Amiloza je linearni polimer sastavljena od jedinica α-D-glukoze koje su povezane α-1,4 glikozidnim vezama, a samo mali dio (~1%) povezan je α-1,6 glikozidnim vezama. Amilozna frakcija škroba se otapa u vodi. Udjel u ukupnoj masi škroba je 23-27%. Sastavljena je od 400 do 10000 glukoznih jedinica. Amorfna područja škrobnih granula građena su od amiloze i bočnih ogranaka amilopektina. Iako se navodi kao linearna molekula često je u obliku spirale unutar koje se nalaze atomi vodika. Može se smatrati hidrofobnom što joj omogućava da se veže za: slobodne masne kiseline, lipide, alkohole te jod. Tako može promijeniti svojstva škroba kao što su temperatura želatinizacije, viskoznost te retrogradacija (Whitehurst i Oort, 2010.).

Amilopektin je razgranati polimer u kojem je α-D-glukoza povezana α-1,4 glikozidnim vezama, a na mjestima grananja (~5%) α-1,6 glikozidnim vezama. Građen je od oko 100 000 glukoznih jedinica. Linearni lanci amilopektina čine kristalne slojeve škrobne granule. Amilopektin čini oko 70% granule škroba (Whistler i sur., 1984.).

2.2.3. Lipidi

Lipidi pšeničnog brašna su heterogena skupina spojeva koji se razlikuju po kemijskom sastavu i strukturi. Dijelimo ih na slobodne lipide i vezane lipide. Obe skupine sadrže polarne i nepolarne komponente. Polarne lipide dijelimo na glikolipide i fosfolipide. Nepolarni lipidi su uglavnom trigliceridi. Lipidi se u većini slučaja vežu za škrob te u manjoj mjeri za proteine. Lipidi koji se vežu na škrob tvore komplekse s hidrofobnom unutrašnjosti amiloznih α-uzvojnica tijekom želatinizacije. Tako vezani lipidi su nedostupni dok većina škroba nije želatinizirana. Polarni lipidi se uglavnom vežu za proteine. Uloga u stabilnosti tijesta očituje se u njihovom djelovanju s proteinima glutena što pozitivno utječe na zadržavanje plina (Whitehurst i Oort, 2010.). Masti se u zrnu žitarica nalaze u malim količinama od 2-4% mase zrna. Najviše masti nalazi se u klici. Prisutnost masti u brašnu otežava čuvanje jer može doći do oksidacije pa se klice prilikom meljave odstranjuju.

2.2.4. Ostale komponente

Celuloza je osnovna komponenta stanične stjenke i omotača zrna u kojem je zaslužna za mehaničku čvrstoću. Najviše mineralnih tvari (pepela) kao i celuloze nalazimo u omotaču zrna. Najzastupljenije mineralne tvari su fosfor, kalij, magnezij, kalcij, silicij, sumpor i natrij. Najveće koncentracije vitamina nalaze se u klici. Najviše ima provitamina A (karoten), vitamini B kompleksa (B1, B2), E (tokoferol), D i K vitamina.

2.3. ENZIMI

Enzimi koji se nalaze u žitaricama su: lipaza (razgrađuje masti), proteolitički enzimi (razgrađuju proteine) i amilolitički enzimi (razgrađuju škrobne ugljikohidrate). Enzimi su globularni proteini sačinjeni od 60 pa sve do 2500 aminokiselina. Prisutni su u svim živim bićima i neophodni za normalno funkcioniranje organizma. Kada enzimi ne bi bili prisutni reakcije u živim organizmima tekle bi presporo. Enzime nazivamo biološkim katalizatorima jer oni ubrzavaju (bio)kemijske reakcije te iz tih reakcija izlaze nepromijenjeni. Isto tako u reakcijama se ne troše pa nastavljaju katalizirati reakcije dok ima supstrata prevode ga u produkt. Enzimi su visokoselektivni za supstrat te kataliziraju samo određenu reakciju.

Enzimi mogu djelovati zajedno stvarajući metaboličke puteve u kojima jedan enzim uzima produkt drugog enzima kao supstrat. Isto tako više enzima može paralelno katalizirati istu reakciju. Sve to omogućava da se događaju složene biokemijske reakcije te dovoljno brzo zadovolje potrebe stanica (Whitehurst i Oort, 2010.).

2.3.1. Struktura i specifičnost enzima

Osnovne funkcije enzima definirane su kroz njihovu proteinsku strukturu. Svi proteini sastavljeni su od aminokiselina koje imaju amino (-NH2) i karboksilnu (-COOH) skupinu. Aminokiseline međusobno se razlikuju po bočnom lancu. Amino i karboksilna skupina su reaktivne te se mogu povezati peptidnom vezom i tako tvoriti dipeptide uz oslobađanje molekule vode. Povezivanjem 150 pa sve do 6 000 000 aminokiselina nastaju proteini. Aminokiseline povezane dipeptidnom vezom čine primarnu strukturu proteina. Proteini imaju još i sekundarnu i tercijalnu strukturu koja određuje kako protein odnosno enzim funkcionira te kvartarnu strukturu kao razinu strukture u kojoj su globularni proteini (Mathewson, 1998.).

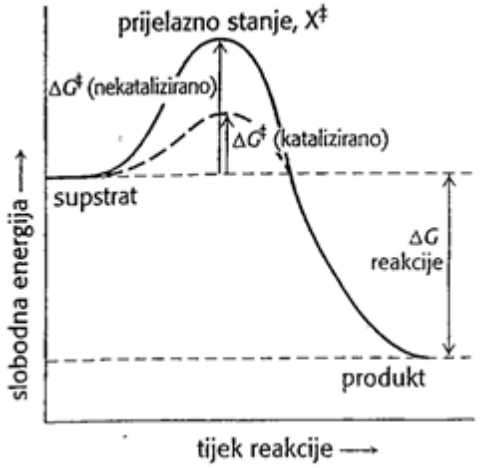
Najčešće se enzimi dijele prema reakciji koju kataliziraju na: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Jedno od najvažnijih svojstava enzima je njihova specifičnost. Postoje četiri tipa specifičnosti: apsolutna specifičnost (enzimi kataliziraju samo jednu reakciju), enzimi koji djeluju samo na molekule koje imaju specifičnu funkcionalnu grupu, enzimi koji djeluju na kemijske veze određene prirode i stereokemijska specifičnost.

2.3.2. Mehanizam djelovanja enzima

Enzimi mogu djelovati na nekoliko načina, ali svakim načinom smanjuju energiju aktivacije tako što smanjuju energetsku razliku između reaktanata (A,B) i prijelaznog stanja. Energija aktivacije je minimalna energija koju reaktanti moraju imati kako bi savladali aktivacijsku barijeru i formirali prijelazno stanje. Enzimi smanjuju aktivacijsku barijeru reakcije što omogućava da se reakcija odvija brže. Također se ubrzava i povratna reakcija te tako ravnoteža reakcije ostaje nepromijenjena (Whitehurst i Oort, 2010.).

Jedan od načina je snižavanje energije aktivacije na način da se stvara okruženje u kojem je prijelazno stanje stabilizirano, a to se može postići vezivanjem. Drugi način je smanjivanjem energije prijelaznog stanja bez da se deformira supstrat, stvarajući okoliš sa suprotnom

raspodjelom naboja od onoga kod prijelaznog stanja. Jedan od načina je i smanjivanje entropije reakcije dovođenjem supstrata u pravilnoj orijentaciji za reakciju.



Slika 3 Enzimi ubrzavaju reakcije snižavanjem slobodne energije aktivacije (Berg i sur., 2013.).

Posljednji način je omogućavanje alternativnog puta na način da se privremeno reagira sa supstratom tvoreći enzim-supstrat kompleks (ES). ES kompleks prolazi kroz transformaciju te se kasnije raspada na produkt (P) i oslobađa se enzim (E). Enzim je nepromijenjen te se može spojiti s novom molekulom supstrata (S). Kinetika enzimskih reakcija objašnjena je Michaelis-Mentenovim modelom. Prema Michaelis-Mentenovom modelu zanemariva količina ES kompleksa se vraća u reaktante, a povratna reakcija pretvorbe produkta u ES kompleks se ne događa. Mjerenje brzine enzimske reakcije provodi se u ustaljenom stanju, a tada su brzine nastajanja i raspadanja ES kompleksa jednake. Važnost Michaelis-Mentenove konstante (K_m) očituje se u tome što se može odrediti eksperimentalno i opisuje katalitičku snagu enzima. Enzimi mogu katalizirati i do nekoliko milijuna reakcija u sekundi.

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{K_2} E + P$$

Slika 4 Michaelis-Mentenova kinetička jednadžba (Mathewson, 1998.).

2.3.3. Utjecaji na aktivnost enzima

Uvjeti u kojima se enzimima smanjuju ili povećavaju aktivnost su temperatura, pH, koncentracija enzima, koncentracija supstrata te prisutnost bilo kojeg aktivatora ili inhibitora.

Svaki enzim ima određenu optimalnu pH-vrijednost pri kojoj mu je aktivnost maksimalna. Optimalna vrijednost može biti veći ili manji interval. Kod većine enzima optimalna je pH vrijednost u neutralnom ili slabo kiselom području. Ekstremno visoki ili niski pH mogu ih inaktivirati. Enzimskim reakcijama brzina raste s temperaturom do određenog maksimuma nakon tog naglo pada jer dolazi do toplinske denaturacije proteina enzima odnosno toplinske inaktivacije enzima. Alosterički efektori se vežu na alosteričko mjesto na enzimu, njihovim vezanjem dolazi do promjene konformacije enzima što se odražava na aktivno mjesto. Njihovim vezanjem enzim provodi pretvorbu supstrata u produkt sporije (inhibitori) ili brže (aktivatori). Mnogi enzimi zahtijevaju prisutnost kofaktora kako bi imali katalitičku funkciju. Takav aktivni kompleks naziva se holoenzim i sastoji se od apoenzima (sami enzim) plus kofaktor (metalni ion ili protetska skupina). Enzimi mogu vezati druge molekule osim supstrata i kofaktora koje ih najčešće inhibiraju ili ometaju katalitički proces.

Inhibitori enzima su tvari koje mijenjaju katalitičko djelovanje enzima te tako usporavaju ili u potpunosti zaustavljaju katalizu. Postoje ireverzibilni (nepovratni) i reverzibilni (povratni) enzimi. Postoje dva tipa reverzibilnih inhibitora, a to su konkurentni inhibitori i nekonkurentni inhibitori. Kad je riječ o konkurentnoj inhibiciji supstrat i inhibitor koji je kemijski sličan supstratu se natječu za aktivno mjesto na enzimu. Što je koncentracija supstrata u tom slučaju veća to je manja konkurentna inhibicija enzima inhibitorom. Nekonkurentni inhibitori djeluju tako da se vežu na ES kompleks, a EIS kompleks koji nastaje je neaktivan. Supstrat se veže na aktivno mjesto na enzimu, a inhibitor na drugo mjesto što znači da nema kompeticije između supstrata i inhibitora za enzim. Mogu reagirati i sa slobodnim enzimom i sa ES kompleksom i takav kompleks je neaktivan. Inhibicija se ne može nadvladati većom koncentracijom supstrata nego baš naprotiv, kad ima vise supstrata nastaje vise ES kompleksa na koji se onda vežu inhibitori (Whitehurst i Oort, 2010.).

Poznata je još Inhibicija viškom supstrata kad uz aktivni ES kompleks može nastati i ESS kompleks u kojem supstrat dovodi do konformacijske promjene katalitičkog mjesta enzima te enzim više ne može provoditi pretvorbu supstrata u produkt (inaktiviraju enzim). Mješovita inhibicija nalikuje nekonkurentnoj osim što EIS kompleks ima rezidualnu enzimatsku aktivnost kada enzim

proizvodi previše produkta, a taj produkt reagira kao negativna povratna informacija te stopira sintezu ili ju usporava. Ireverzibilni inhibitori se vežu kovalentnim vezama za aktivno mjesto enzima i tako inaktiviraju enzim (Whitehurst i Oort, 2010.).

2.4. AMILOLITIČKI ENZIMI

Amilaze na osnovu njihovih strukturnih i aminokiselinskih sličnosti ubrajamo u grupu glikohidrolaza (GH). Uz α-amilazu bitne su β-amilaza, glukoamilaza, α-glukozidaza, pululanaza i izoamilaza. To su enzimi koji hidroliziraju škrobne ugljikohidrate (Whitehurst i Oort, 2010.).

Zajednička svojstva ovih enzima su da:

- hidroliziraju α-1,4 glikozidne veze i/ili α-1,6 glikozidne veze te tako nastaju anomerni mono i oligosaharidi,
- posjeduju (β/α)8 ili TIM barrel strukturu,
- imaju četiri visoko konzervirane regije u primarnom slijedu koje sadrže aminokiseline koje tvore katalitička mjesta kao i neke esencijalne aminokiseline za održanje stabilnosti konzervirane TIM barrel topologije.



Slika 5 Prikaz (β/α)8 ili TIM barrel strukture (van der Maarel, 2002.)

U današnje vrijeme za hidrolizu škroba koriste se gotovo isključivo enzimi. Primjenjuju se u proizvodnji maltodekstrina, modificiranih škrobova, glukoznih i fruktoznih sirupa. Na enzime koji

razgrađuju škrob otpada oko 30% svjetske proizvodnje enzima. Enzimi koji razgrađuju škrob koriste se u mnoge svrhe u industriji kao što je proizvodnja odjeće, porculanskih deterdženata i kao sredstva protiv starenja pekarskih proizvoda. Postoje četiri grupe enzima koji razgrađuju škrob: endoamilaze, egzoamilaze, enzimi koji hidroliziraju grananja i transferaze.

Endoamilaze su enzimi koji mogu cijepati α-1,4 glikozidne veze koje se nalaze unutar lanaca amiloze i amilopektina. α-amilaza (EC 3.2.1.1) prisutna je i u biljkama i u životinjama te se komercijalno proizvodi pomoću *Bacillus subtilis*-a i srodnih organizama. Krajnji produkti hidrolize α-amilazom su oligosaharidi različitih dužina α-konfiguracije te dekstrini. Kada je amiloza hidrolizirana na dužinu od 10 do 20 glukoznih jedinica enzim više dobro ne naliježe na nju te α-amilaza ne može dalje razgraditi fragmente. α-amilaza ne hidrolizira α-1,6 glikozidnu vezu.

Od egzoenzima najpoznatija je β-amilaza (EC3.2.1.2) koja cijepa α-1,4 glikozidne veze s nereducirajućeg kraja molekule odcjepljujući po dvije molekule glukoze odnosno maltozu, a hidrolizom još nastaju dekstrini. U egzoenzime ubrajaju se i glukoamilaza (EC 3.2.1.3) i α-glukozidaza (EC 3.2.1.20) koje hidroliziraju α-1,4 glikozidne veze i α-1,6 glikozidne veze s nereducirajućeg kraja molekule odcjepljujući glukozu. Glukoamilaza i α-glukozidaza imaju različite preferencije za supstrat. α-glukozidaza najbolje djeluje na kratke maltooligosaharide dok glukoamilaza najbolje razgrađuje dugolančane polisaharide.

Enzimi koji hidroliziraju točke grananja cijepaju α-1,6 glikozidne veze. U njih ubrajamo izoamilaze (EC 3.2.1.68) i pululanazu tip I (EC 3.2.1.41). Najveća razlika između pululanaza i izoamilaza je ta što pululanaza hidrolizira α-1,6 glikozidne veze u pululanu i amilopektinu dok izoamilaza hidrolizira samo α-1,6 glikozidne veze u amilopektinu. Transferaze cijepaju α-1,4 glikozidne veze molekule donora i prenose dio donora na glikozidni akceptor stvaranjem nove glikozidne veze (van der Maarel, 2002.).

Amilaze mogu hidrolizirati samo oštećeni ili želatinizirani škrob. Količina oštećenog škroba ovisi o sorti pšenice i uvjetima mljevenja (Whitehurst i Oort, 2010.). Analizom brašna utvrđeno je da je raspodjela α-amilaze u zrnu pšenice slična raspodjeli pepela. Najviše koncentracije α-amilaze nalaze se u mekinjama, omotaču i klici. Postoji negativna korelacija između količine škroba i aktivnosti α-amilaze te pozitivna korelacija između količine proteina i aktivnosti α-amilaze. Najveće koncentracije β-amilaze nalaze se u endospermu gdje se sintetizira i veže za proteine glutena tijekom razvoja zrna. Pozitivna je korelacija između koncentracije proteina i β-amilaze (Every, 2002.)

2.4.1. Uloga iona kalcija na aktivnost α-amilaze

α -Amilaza je monomerni enzim što znači da je izgrađen od jednog jednostavnog polipeptidnog lanca koji sadrži kalcij. Polipeptidni lanac savijen je u tri domene odnosno ima trodimenzionalnu strukturu. Centralna ili katalitička domena A karakteristična je po (β/α)8 ili TIM barrel strukturi i kompleksnim petljama koje povezuju osam paralelnih β-niti obavijenih s osam α-zavojnica te strukture. Regije s petljama koje povezuju β-niti s pripadajućim α-zavojnicama su regije s najvećom strukturalnom raznolikosti. Regije s petljama na C-krajevima (β/α)8 barrel strukture su složenije od onih na N-krajevima te sadrže aktivne krajeve sa reziduama aminokiselina za vezanje supstrata odnosno Ca^{2+}. Mjesto za vezanje supstrata se nalazi stoga na rascjepu između (β/α)8 barrel-e i B-domene. B-domenom se naziva dugačka petlja koja spaja β-niti 3 (Aβ3) s α-zavojnicom 3 (Aα3). β-niti formiraju β-ploče. B-domena zaslužna je za specifičnost za supstrate te stabilnost enzima. C-Domena je sastavljena od β-niti te ima oblik ključa. Stabilizira katalitičku domenu tako što štiti hidrofobne rezidue A-domene od otapala (Huber i sur., 1995.).

α-amilaza je metaloenzim njen najčešći kofaktor je kalciji. Sve poznate amilaze sadrže strukturno mjesto za vezanje kalcija te je neophodan najmanje jedan kalcij po molekuli enzima. Povećanje aktivnosti α-amilaze u prisutnisti Ca^{2+} iona temelji se na njegovoj sposobnosti da reagira s negativno nabijenim aminokiselinama kao što su asparadinska i glutaminska kiselina. Što onda rezultira u povećanju stabilnosti te očuvanju aktivne konformacije enzima. Kalcij ima ulogu i u vezanju enzima za supstrat (Klang i sur.,2018.).

Klang i sur. (2018) su dokazali da je u svakom slučaju kalcij povećao aktivnost α-amilaze posebno kada su mu koncentracije bile povećane. Prisutnost kalcija poboljšava termostabilnost enzima što mu podiže ekonomsku vrijednost te produžuje vijek trajanja (Kayastha i Singh, 2014.). Isto tako vezanje Ca^{2+} na α-amilaze ima prednost u odnosu na katione kao što su Mg^{2+}, Na^{+} i Ba^{2+} koji samo djelomično aktiviraju α-amilazu nemjerljivo u usporedbi s kalcijem (L Al-Malkil i sur., 2009.).

2.4.2. Inaktivacija α-amilaze

Inaktivacija α-amilaze metalnim ionima kao što su Hg^{2+} , Zn^{2+}, Cd^{2+} i Cu^{2+} može biti zbog njihovog vezanja za katalitičke ostatke ili tako što mijenjaju Ca^{2+} na mjestu za vezanje supstrata.

L Al-Malki, Kumosani i Mohamed (2009) testirali su učinak različitih metalnih iona kao što su Ca^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Hg^{2+} i Cd^{2+} na aktivaciju odnosno inaktivaciju α-amilaze pšenice *Triticum aestivum*.

Analizu su napravili na DEAE-Sefaroznom kromatografu. Kruti ekstrakt nanesen je na kolonu. Frakcije kojima su provjeravali aktivnost alfa amilaze eluirane su s 0, 0,05, 0,1, 0,2 i 0,3 M NaCl, i nazvane su α-amilaza AI, AII, AIII, AIV i AV prema redoslijedu eluiranja. Ca^{2+} je imao aktivirajući učinak na sve osim na AII. Zn^{2+} i Hg^{2+} djelomično su inaktivirale sve osim AIV na koju nisu imale utjecaja. Ni^{2+} pokazao je aktivirajući učinak na AI, a na ostale inaktivirajući. Cd^{2+} aktivirao je AII, AIV I AV dok je imao jak inaktivirajući učinak na AI I AII.

Klang i sur. (2018) proučavali su učinak (Ca^{2+}, Na^{+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} i K^{+}) s 1 i 5 mM koncentracijom te EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina) s 1 i 40 mM koncentracijom na aktivnost α-amilaze iz proklijalog bijelog i žutog brašna kukuruza te bijelog i žutog brašna batata. Na^{+} na koncentraciji od 1mM djeluje kao aktivator u dva od četiri slučaja dok na koncentraciji od 5mM djeluje kao inhibitor u tri od četiri slučaja. Mg^{2+} i Fe^{2+} imaju na svim koncentracijama inhibitorni učinak u tri od četiri slučaja. Cu^{2+} ima jak inhibitorni učinak na obje koncentracije u sva četiri slučaja jer je bakrov sulfat sol teškog metala koja denaturira proteinske strukture. Kalcij se pokazao kao aktivator u sva četiri slučaja. EDTA je pokazala jak inhibitorni učinak već na koncentraciji od 1 mM. Takav ishod se može objasniti time da je EDTA kelatizirajući agent odnosno djeluje tako da tvori komplekse s metalnim ionima u ovom slučaju s kalcijem koji se nalazi u α-amilazi i neophodan je za njenu aktivnost.

Teški metali inaktiviraju enzime nekompetitivnom inhibicijom tako što reagiraju s tiolnom grupom ili aktivnim mjestom na enzimu. Ag^{+}, Hg^{2+} i Zn^{2+} dokazano inhibiraju aktivnost α-amilaze (Kayastha i Singh, 2014). Ispitivan je dodatak različitih koncentracija srebra u normalno brašno, brašno proklijale pšenice, brašno tretirano ultrazvukom te pareno brašno. Amilolitička aktivnost mjerena je metodom broja padanja po Hagberg-Pertenu (FN) i amilografom. Metodom FN Dokazano je da su koncentracije od 3 μeq po gramu srebra nedovoljne da bi u potpunosti inaktivirale α-amilazu. Iako je u nekom brašnu bolje inaktivirana nego u drugima. Parena i proklijala brašna su pokazala da je došlo do veće inaktivacije α-amilaze već kod 5 μeq po gramu u odnosu na druga. Dok su sva brašna imala maksimum pri 35 μeq po gramu odnosno najviše se α-amilaze inaktiviralo. Veće koncentracije kao što je 100 μeq po gramu nisu inaktivirale veće količine α-amilaze. Za razliku od FN metode, amilograf je pokazao da je srebro učinkovitiji inhibitor pri nižim koncentracijama za α-amilazu (Meredith, 1970).

Meredith (1970) je u istraživanju inaktivacije bakrom i živom dobio da je bakrov sulfat nedovoljno učinkovit inhibitor α-amilaze kod brašna od proklijale pšenice dok je kod brašna tretiranog

ultrazvukom drastično smanjio FN vrijednost. Imao je mali modificirajući učinak na normalno brašno kao i živin klorid koji je takav učinak imao pri nižim koncentracijama. Živin klorid je pokazao znatan inhibirajući učinak kod 6 μeq po gramu.

2.5. MJERENJE AMILOLITIČKE AKTIVNOSTI METODOM BROJA PADANJA

Za određivanje aktivnosti amilolitičkih enzima u brašnu pšenice značajnim su se pokazale viskozimetrijske metode. Među njima, jednostavnom i pouzdanom se pokazala metoda određivanja broj padanja odnosno FN (engl. *Falling Number*) koju su razvili Hagberg i Perten. Metoda broja padanja po Hagberg-Pertenu standardizirana je metoda za određivanje aktivnosti enzima α-amilaze (AACC 56-81B, ICC 107/1, ISO / DOS 3093). Metoda utvrđuje aktivnost α-amilaze koristeći brašno kao nativni supstrat. Odnosno aktivnost α-amilaze u proizvodima koji sadrže škrob. Ova metoda koristi se i za proučavanje učinaka dodatka srebrovih, bakrovih te živinih soli u brašno (Perten, 1964.).

Metoda se temelji na sposobnosti α-amilaze da provede likvefakciju želatiniziranog škroba. Odnos broja padanja i aktivnosti α-amilaze može se iskazati kao linearna funkcija prevođenjem vrijednosti broja padanja (FN) u likvefakcijski broj (LN). Prevođenje se provodi prema formuli (1).

$$LN = \frac{6000}{FN-50} \quad (1)$$

gdje je 6000 konstanta, a 50 se odnosi na približno vrijeme u sekundama potrebno da se škrob iz brašna dovoljno želatinizira da ga enzimi mogu hidrolizirati, FN predstavlja broj padanja [s] te LN likvefakcijski broj [s^{-1}] (Constantin i sur., 2015.).

Kada procjenjujemo aktivnost α-amilaze u jednoj vrsti brašna dovoljno je poznavati FN iz kojeg se može utvrditi je li aktivnost α-amilaze visoka, niska ili optimalna. Ako procjenjujemo aktivnost α-amilaze za smjesu dvije ili više vrsta brašna moramo računati LN. LN ima linearnu ovisnost s aktivnosti α-amilaze u smjesi više vrsta brašna dok FN nema linearnu ovisnost (Constantin i sur., 2015.).

Finney (1985) je u svom istraživanju dobio da su vrijednosti LN u pozitivno i više korelirale s aktivnosti a-amilaze nego što je to slučaj bio s FN vrijednostima. FN je maksimalno korelirao kada

je zamijenjeno 5g brašna cijelog zrna pšenice s brašnom proklijale pšenice. Za LN najveća korelacija je bila kada je zamijenjeno 3 g brašna. Vrijednosti LN korelirale su s 0,15-0,22 višim koeficijentom nego FN vrijednosti kada je zamijenjeno između 0-4 g brašna cijelih žitarica s brašnom proklijale pšenice.

Postoje eksperimentalni faktori koji utječu na vrijednost FN broja kao što su finoća mljevenja, homogenost uzorka. Greške u testu se mogu pojaviti i zbog varijacija u temperaturi vodene kupelji (Finney, 1985).

Metoda mjeri viskoznost mjereći otpor paste brašna i vode padajućem mješaču. Metoda funkcionira na principu da se dodaje 7 g brašna i 25 ml destilirane vode u staklenu kivetu uređaja za broj padanja, zatvori gumenim čepom i dobro promućka kako bi se formirala homogena suspenzija. Čep se skine te se miješalica i kiveta zajedno stave u ležište na poklopcu uređaja. Kada se suspenzija zagrijava u vodenoj kupelji na 100 °C uz konstantno miješanje škrob se želatinizira i formira gustu pastu. Vrijeme koje protekne od ulaganja kivete sa suspenzijom u vodenu kupelj te sve do kraja penetracije miješalice viskozimetra kroz škrobni gel zapisuje se kao vrijednost broja padanja. Vrijednost se iskazuje u sekundama.

Udjel α-amilaze u uzorku obrnuto je proporcionalan vrijednosti broja padanja. Visoka vrijednost broja padanja, viša od 300 sekundi, upućuje na minimalnu enzimsku aktivnost. Niska vrijednost broja padanja, ispod 200 sekundi, upućuje na znatnu enzimsku aktivnost. Enzimi se u ovom slučaju ne mogu ukloniti iz brašna što stvara mnogo problema u proizvodnji pekarskih proizvoda kao što su ljepljivo tijesto te loša kvaliteta gotovog proizvoda (Causgrove i sur.,2004.).



Slika 6 Uređaj po Hagbergu za određivanje broja padanja (Web 1)

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 vrijednosti broja padanja prema Hagberg-Pertenu i likvefakcijski broj te odrediti njihov inaktivacijski potencijal na amilolitičke enzime pšeničnog brašna.

3.2. 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 (Perten instruments, Švedska). Dobiveno pšenično brašno predstavljalo je uzorke s vrlo visokom amilolitičkom aktivnosti (FN=77 s).

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 ispitivanja na uređaju za određivanje broja padanja prema Hagberg-Pertenu (Perten Instruments, Švedska).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje broja padanja i likvefakcijskog broja

Za određivanje broja padanja po Hagberg- Pertenu korišten je uređaj po Hagbergu (Perten Instruments, Švedska). Određivanjem broja padanja indirektno se određuje akrivnost α- amilaze na škrobu ispitivanog uzorka. Odvagano je 7 g uzorka brašna (preračunato na vlagu 14%), preneseno u kivetu i pipetorom dodano 25 cm^3 destilirane vode ili odgovarajuće otopine $AgNO_3$ ili $CuSO_4$, kiveta se zatvorala gumenim čepom i suspenzija homogenizirala mućkanjem. Nakon toga se u kivetu ulagala miješalica te se kiveta stavljala u vodenu kupelj uređaja. Nakon uključenja uređaja i intenzivnog miješanja tijekom 60 s, miješalica se otpuštala iz tornja uređaja da slobodnim padom prodire kroz nastali škrobni gel. Vrijeme (sekunde) potrebno da miješalica propadne do dna kivete kroz nastali gel predstavlja broj padanja. Osim prethodno opisane

standardne metode (ICC Standard No. 107/1,1995.; AACC Metoda 56-81.03, 1999.) sva mjerenja su provedena i na način da su uzorci prethodno hidratizirani, odnosno suspenzija brašna i otopina ostavljena je da odstoji 20 min prije provođenja ispitivanja kako bi se vidjelo da li hidratizacija ima utjecaj na izmjerene vrijednosti. Sve dobivene vrijednosti broja padanja također su preračunate i u likvefakcijski broj.

3.3.2. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata provedena je upotrebom programa Statistica 13.1 (Dell Inc., SAD) i Microsoft Office Excel 2016. Kako bi se utvrdila eventualna razlika između korištenja standardne metode i metode uz prethodnu hidratizaciju uzorka upotrijebljena je analiza varijance (ANOVA).

3.3.3. Modeliranje parametara broja padanja i likvefakcijskog broja

Modeliranje je provedeno u svrhu razvoja matematičkih modela kojim bi se predvidjela kinetika promjena vrijednosti broja padanja i likvefakcijskog broja uslijed promjene koncentracija otopina $AgNO_3$ i $CuSO_4$. Matematičko modeliranje provedeno je primjenom nelinearne regresije.
Za definiranje parametara kinetike ovisnosti broja padanja u ovisnosti o koncentraciji inhibicijske otopine primijenjen je sigmoidalni model (Slika 7).

$$FN = FN_{max} + \frac{FN_{min} - FN_{max}}{1 + (\frac{10^{c_{1/2}}}{10^{c}})^{k}} \quad (2)$$

gdje su:
FN - broj padanja [s] pri određenoj koncentraciji otopine,
FN_{max} - maksimalna vrijednost broja padanja,
FN_{min} - minimalna vrijednost broja padanja,
$c_{1/2}$ - koncentracija otopine potrebna za postizanje 50%-tne vrijednosti broja padanja,
c - koncentracija [mM],
k - konstanta brzine promjene broja padanja.

Za definiranje parametara kinetike ovisnosti likvefakcijskog broja u ovisnosti o koncentraciji inhibicijske otopine primijenjen je model eksponencijalnog pada prvog reda (Slika 8):

$$LN = LN_{max} \times e^{-kc} + LN_{min} \quad (3)$$

gdje su:

LN - likvefakcijski broj [s^{-1}] pri određenoj koncentraciji otopine,

LN_{max} - maksimalna vrijednost broja padanja,

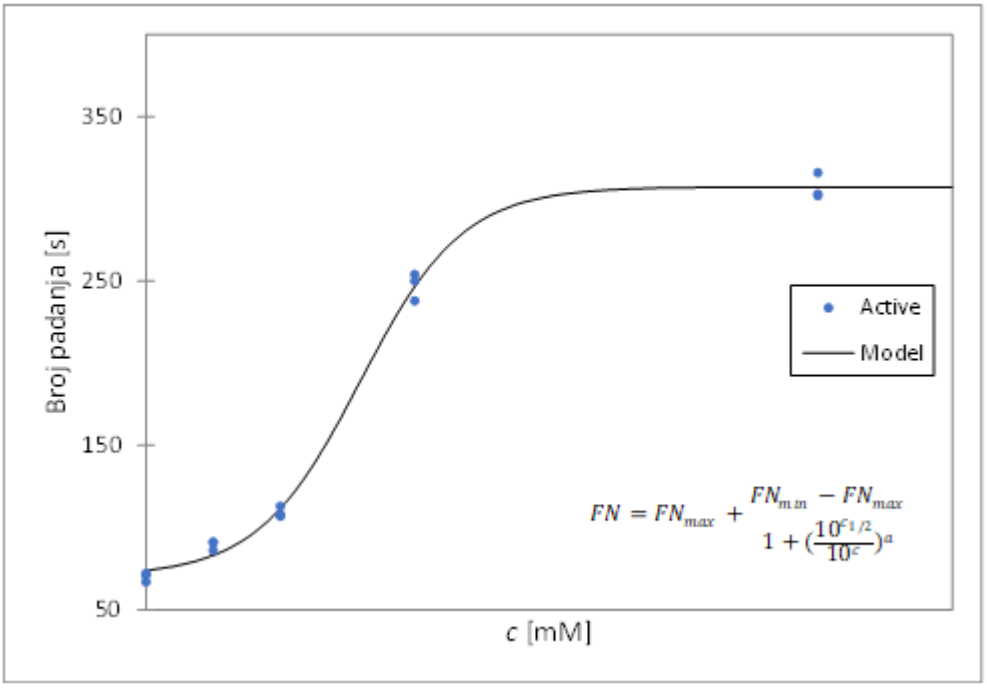
LN_{min} - minimalna vrijednost broja padanja,

c - koncentracija [mM],

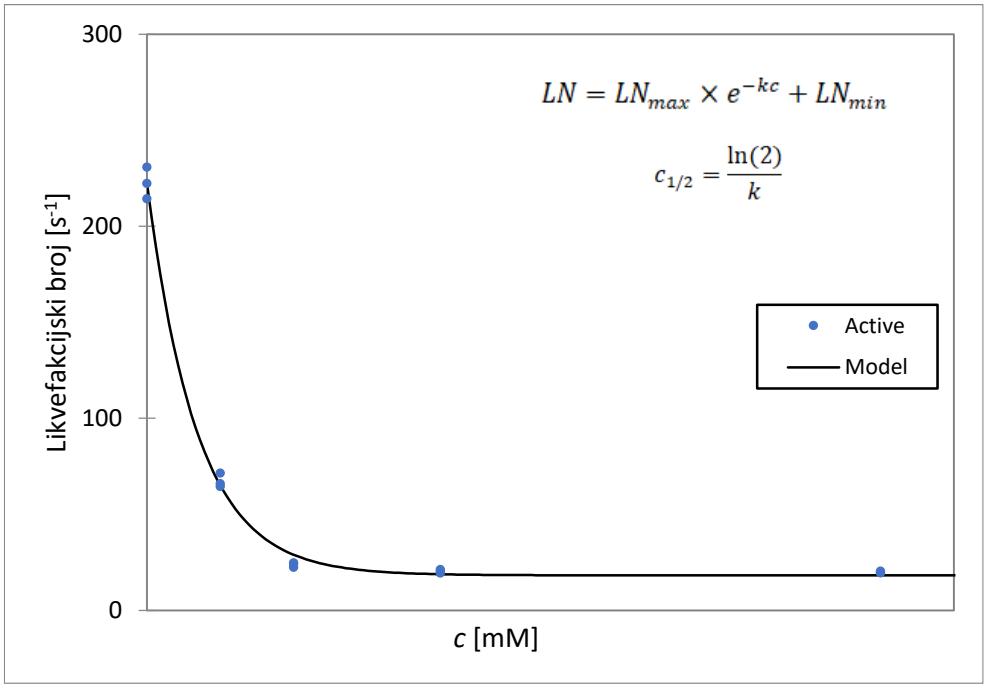
k - konstanta brzine promjene likvefakcijskog broja.

Iz konstante brzine promjene likvefakcijskog broja izračunava se koncentracija otopine potrebne za postizanje 50%-tne vrijednosti likvefakcijskog broja $c_{1/2}$:

$$c_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (4)$$



Slika 7 Primjer primjene sigmoidalnog modela ovisnosti broja padanja o promijeni koncentracije inhibicijske otopine



Slika 8 Primjer primjene modela eksponencijalnog pada ovisnosti likvefakcijskog broja o promijeni koncentracije inhibicijske otopine

Uspješnost aproksimacije eksperimentalni podataka matematičkim modelima procijenjena je na osnovi:

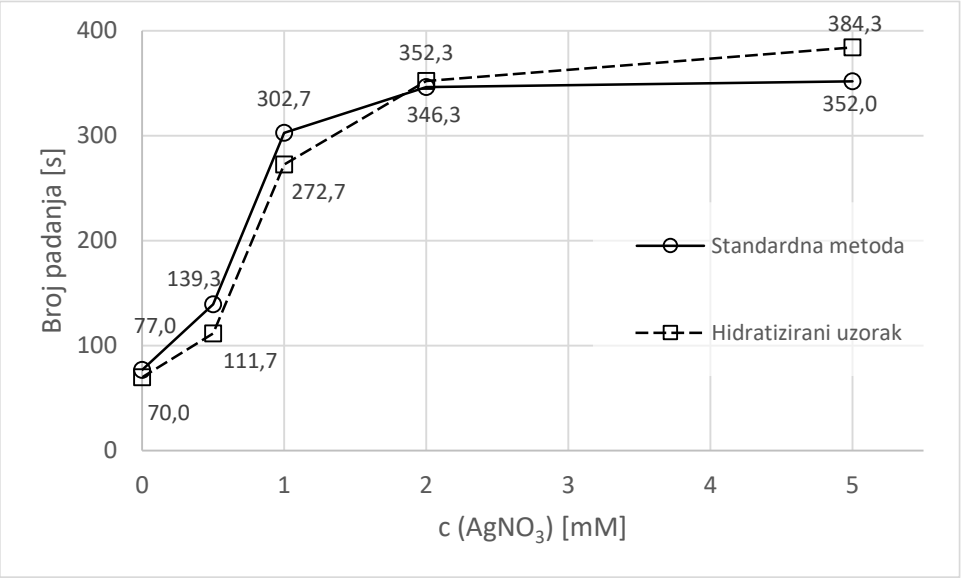
- koeficijenta determinacije, R^2
- srednjeg kvadratnog odstupanja, $RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left(FN_{pre,i} - FN_{eks,i}\right)^2}$

Aproksimacija eksperimentalnih podataka modelom je bolja što su vrijednosti srednjeg kvadratnog odstupanja niže $RMSE \rightarrow 0$, a koeficijenta determinacije više $R^2 \rightarrow 1$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati inaktivacijski potencijal otopina $AgNO_3$ i $CuSO_4$ na amilolitičke enzime pšeničnog brašna. Određivanje broja padanja po Habgerg-Pertenu 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, a koncentracije otopina $CuSO_4$ bile su 10x veće: 5 mM, 10 mM, 20 mM i 50 mM. Osim standardnom metodom (ICC Standard No. 107/1,1995.; AACC Metoda 56-81.03, 1999.) sva mjerenja su prevedena i na način da su uzorci prethodno hidratizirani, odnosno suspenzija brašna i otopina ostavljena je da odstoji 20 min prije provođenja ispitivanja kako bi se vidjelo da li hidratizacija ima utjecaj na izmjerene vrijednosti. Rezultati ispitivanja broja padanja prikazani su na **Slikama 9** i **10**.

Povećanjem koncentracije otopine $AgNO_3$ došlo je do povećanja broja padanja odnosno do smanjenja amilolitičke aktivnosti uslijed inaktivacije enzima (**Slika 9**).



Slika 9 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima srebrovim nitratom na broj padanja

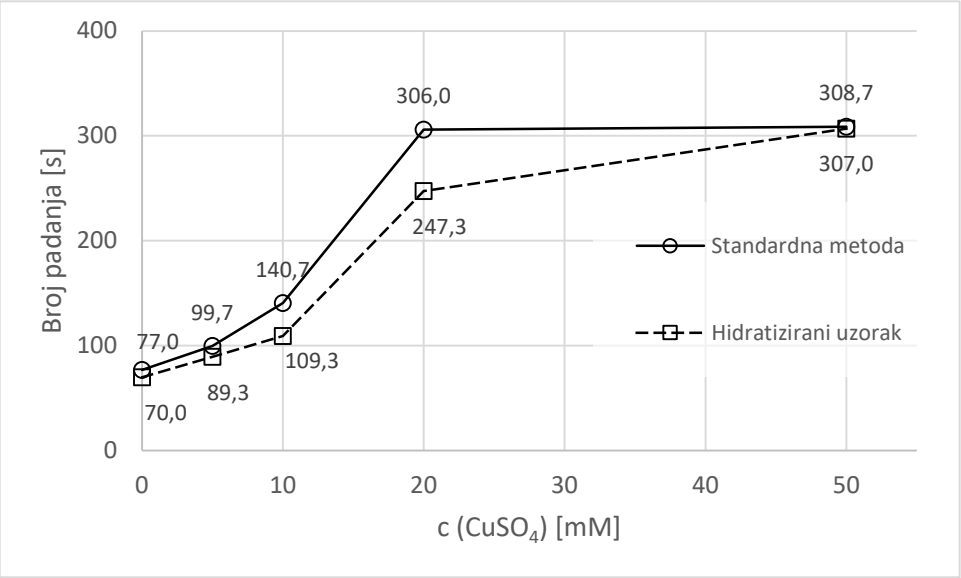
Broj padanja uzorka s dodatkom vode bio je vrlo mali i iznosio je 77 s što ukazuje na izrazito visoku amilolitičku aktivnost ovog uzorka uslijed provođenja postupka kvašenja pšenice. Visok stupanj inaktivacije postiže se već pri koncentraciji otopine $AgNO_3$ od 1 mM (FN=302,7 s), a pri koncentraciji od 5 mM broj padanja iznosio je 352,0 s što ukazuje na vrlo nisku amilolitičku aktivnost odnosno na gotovo potpunu inaktivaciju amilolitičkih enzima. Bhattacharya i Corke

(1996) su u svom radu zaključili da se potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postiže već pri koncentracijama otopine $AgNO_3$ od 1mM dok je ovim istraživanjem dokazano da je koncentracija pri kojoj se postiže maksimalna inaktivacija oko 2 mM. Prethodno hidratizirani uzorak pokazao je slične vrijednosti za broj padanja što znači da djelovanje enzima tijekom hidratizacije pri sobnoj temperaturi nije bilo izraženo. To se i očekivalo s obzirom na činjenicu da amilolitički enzimi djeluju pri temperatura od 55-80 °C što odgovara temperaturi želatinizacije škroba (Perten, 1964.). Nepostojanje statistički značajne razlike (p<0,05) između vrijednosti dobivenih standardnom metodom i metodom uz prethodnu hidratizaciju uzoraka potvrđena je i analizom varijance (**Tablica 2**).

Tablica 2 Usporedba standardne metode određivanja broja padanja i metode uz prethodnu hidratizaciju uzoraka otopinom $AgNO_3$ analizom varijance

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Suma kvadrata	Srednji kvadrat odstupanja	$F_{rač}$ - vrijednost	p
Model	1	208,0333	208,0333	0,0134	0,9086
Pogreška	28	434430,1333	15515,3619		
Ukupno	29	434638,1667			

Slični rezultati dobiveni su i prilikom korištenja otopina $CuSO_4$, ali u koncentracijama 10x većim od koncentracija otopina $AgNO_3$ (**Slika 10**).



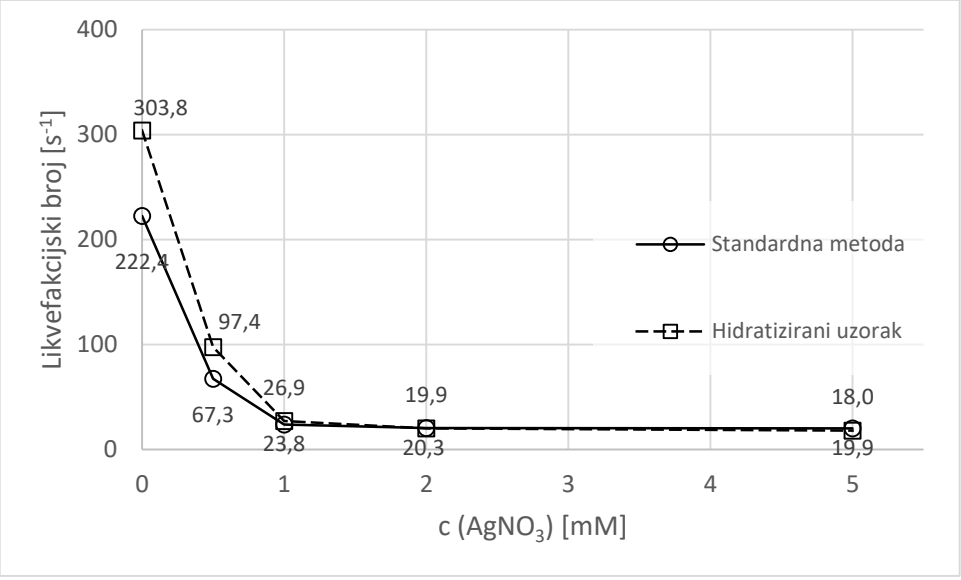
Slika 10 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima bakrovim sulfatom na broj padanja

Visok stupanj inaktivacije postiže se pri koncentraciji otopine $CuSO_4$ od 20 mM (FN=306,0 s) što je ujedno i maksimalna vrijednost jer je pri koncentraciji od 50 mM broj padanja iznosio 308,7 s. Maksimalni broj padanja pri korištenju otopine $AgNO_3$ iznosio je 352,0 s što ukazuje na manju viskoznost škrobne paste pri korištenju otopine $CuSO_4$. Iz toga se može zaključiti da otopina $CuSO_4$ direktno utječe ne samo na amilolitičke enzime već i na želatinizacijska svojstva škroba. Vrijednosti FN dobivene primjenom metode uz prethodnu hidratizaciju uzoraka bile su nešto manje od vrijednosti dobivenih standardnom metodom bez hidratizacije, ali razlike nisu bile statistički značajne (p<0,05) (**Tablica 3**).

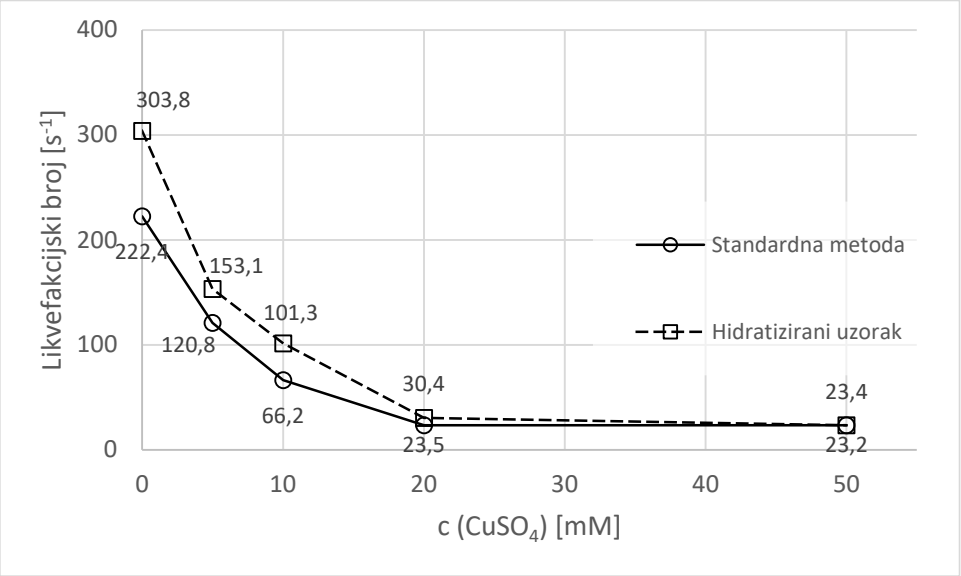
Tablica 3 Usporedba standardne metode određivanja broja padanja i metode uz prethodnu hidratizaciju uzoraka otopinom $CuSO_4$ analizom varijance

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Suma kvadrata	Srednji kvadrat odstupanja	$F_{rač}$ - vrijednost	p
Model	1	3787,1066	3787,1066	0,3865	0,5392
Pogreška	28	274377,3690	9799,1918		
Ukupno	29	278164,4756			

Odnos broja padanja i aktivnosti α-amilaze može se iskazati i kao linearna funkcija prevođenjem vrijednosti broja padanja (FN) u likvefakcijski broj (LN). Povećanjem koncentracije otopina AgNO3 i $CuSO_4$ došlo je do smanjenja likvefakcijskog broja uslijed inaktivacije enzima (**Slike 11 i 12**).



Slika 11 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima srebrovim nitratom na likvefakcijski broj



Slika 12 Utjecaj inaktivacije amilolitičkih enzima bakrovim sulfatom na likvefakcijski broj

Gotovo potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postiže već pri koncentracijama otopine $AgNO_3$ od 1mM (26,9 s^{-1}) i otopine $CuSO_4$ od 20 mM (23,5 s^{-1}). Kao i pri određivanju broja padanja, vrijednosti LN dobivene primjenom metode uz prethodnu hidratizaciju uzoraka bile su nešto veće od vrijednosti dobivenih standardnom metodom bez hidratizacije, ali razlike nisu bile statistički značajne (p<0,05) (**Tablice 4 i 5**).

Tablica 4 Usporedba standardne metode određivanja likvefakcijskog broja i metode uz prethodnu hidratizaciju uzoraka otopinom $AgNO_3$ analizom varijance

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Suma kvadrata	Srednji kvadrat odstupanja	$F_{rač}$ - vrijednost	p
Model	1	3564,3000	3564,3000	0,3473	0,5604
Pogreška	28	287369,2000	10263,1857		
Ukupno	29	290933,5000			

Tablica 5 Usporedba standardne metode određivanja likvefakcijskog broja i metode uz prethodnu hidratizaciju uzoraka otopinom $CuSO_4$ analizom varijance

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Suma kvadrata	Srednji kvadrat odstupanja	$F_{rač}$ - vrijednost	p
Model	1	7292,3824	7292,3824	0,8311	0,3697
Pogreška	28	245670,6851	8773,9530		
Ukupno	29	252963,0675			

U svrhu predviđanja kinetike promjena vrijednosti broja padanja i likvefakcijskog broja uslijed promjene koncentracija otopina $AgNO_3$ i $CuSO_4$ provedeno je matematičko modeliranje eksperimentalnih podataka primjenom nelinearne regresije. Za definiranje parametara kinetike ovisnosti broja padanja u ovisnosti o koncentraciji inhibicijske otopine primijenjen je sigmoidalni model, a za definiranje parametara kinetike ovisnosti likvefakcijskog broja primijenjen je model eksponencijalnog pada prvog reda (**Tablica 6**).

Tablica 6 Parametri modela

FN – Sigmoidalni model							
Otopina	**Metoda**	FN_{max}	$c_{1/2}$	k	FN_{min}	R^2	*RMSE*
$AgNO_3$	Standardna	349,30	0,706	2,367	71,19	0,995	9,106
$AgNO_3$	Hidratizacija	369,12	0,844	2,107	64,35	0,991	13,898
$CuSO_4$	Standardna	311,65	12,423	0,183	82,06	0,996	7,140
$CuSO_4$	Hidratizacija	307,26	15,918	0,114	70,41	0,996	6,690
LN – model eksponencijalnog pada							
Otopina	**Metoda**	LN_{max}	$c_{1/2}$	k	LN_{min}	R^2	*RMSE*
$AgNO_3$	Standardna	204,45	0,235	2,950	18,24	0,997	4,810
$AgNO_3$	Hidratizacija	288,80	0,262	2,641	15,61	0,978	18,517
$CuSO_4$	Standardna	205,03	4,778	0,145	18,47	0,996	5,513
$CuSO_4$	Hidratizacija	281,63	4,950	0,140	20,76	0,970	19,941

Uspješnost aproksimacije eksperimentalnih podataka odabranim matematičkim modelima analizirana je na osnovi koeficijenta determinacije (R^2), koji bi idealnom slučaju imao vrijednost 1, te srednjeg kvadratnog odstupanja (*RMSE*) kod kojeg manje vrijednosti označavaju uspješniju aproksimaciju podataka primijenjenim modelom. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su maksimalne vrijednosti FN i LN bile nešto manje pri korištenju standardne metode u odnosu na metodu s prethodno hidratiziranim uzorcima, a isto je vrijedilo i za koncentracije pri kojima se postiže 50%-tna inaktivacija amilolitičkih enzima $c_{1/2}$. Primijenjeni modeli pokazali su vrlo dobru aproksimaciju eksperimentalnih podataka, a naročito se to odnosi na standardno određivanje broja padanja i likvefakcijskog broja.

5. ZAKLJUČCI

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

- Povećanjem koncentracije dodanih otopina $AgNO_3$ i $CuSO_4$ proporcionalno se povećava broj padanja, a smanjuje likvefakcijski broj analiziranih uzoraka brašna.
- Potpuna inaktivacija amilolitičkih enzima postiže se dodatkom 2 mM otopine $AgNO_3$ ili 20 mM otopine $CuSO_4$ čime je dokazana puno veća učinkovitost $AgNO_3$.
- Nema statistički značajne razlike između vrijednosti dobivenih standardnom metodom i metodom uz prethodnu hidratizaciju uzoraka.
- Za definiranje parametara kinetike ovisnosti broja padanja u ovisnosti o koncentraciji inhibicijske otopine uspješno se može primijeniti sigmoidalni model, a za definiranje parametara kinetike ovisnosti likvefakcijskog broja model eksponencijalnog pada prvog reda.

6. LITERATURA

Al-Malki AL, Kumosani T, Mohamed SA: Partial purification and characterization of five α-amylases from a Wheat local variety (Balady) during germination. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3):1740-1748, 2009.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biokemija. Školska knjiga, Zagreb, 2013.

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.

Causgrove P, Peterson B, Causgrove L: Wheat and flour testing methods. Wheat Marketing Center, Inc. Portland, Oregon, USA, 2004.

Constantin GA, Ferdes M, Stefan EM, Voicu G: Falling number vs. Liquefaction number in alfa-amylase activity estimation for bakery flour. International symposium isb-inma teh 2015, agricultural and mechanical engineering, str. 461-466. Politehnica University of Bucharest, Faculty of Biotechnical Systems Engineering, Bucharest, 2015.

Every D, Simmons L, Al-Hakkak J, Hawkins S, Ross M: Amylase, falling number, polysaccharide, protein and ash relationships in wheat millstreams. *Euphytica* 126(1):135–142, 2002.

Finney PL: Effect of Wheat Variety on the Relationship Between Falling Numbers and Alpha - Amylase Activity. *Cereal Chemistry* 62(4):258-262, 1985.

Huber R, Machius M, Wiegand G: Crystal structure of calcium-depleted Bacillus licheniformis alpha-amylase at 2.2 A resolution. *Journal of molecular biology* 246(4):545–559, 1995.

Kayastha AM, Singh K: a-Amylase from wheat (Triticum aestivum) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. *Food Chemistry* 162:1-9, 2014.

Klang JM, Kohole Foffe HA, Ndomou Houketchang SC, Tambo TS, Teboukeu BG, Womeni HM: Characterisation of amylase crude extracts of germinated corn (Kassaï and Atp varieties) and sweet potato flours (Local and 1112 varieties*). International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 5(5):230-240, 2018.

Kovačević V, Rastija M: Žitarice. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2014.

Mathewson PR: Enzymes. *American Association of Cereal Chemists*, Minnesota, USA, 1998.

Meredith P: Effects of Amylases and Metals on the Pasting Properties of Wheat Flour, Determined by Amylograph and 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(3):127-140, 1964.

Shewry PR: Wheat. *Journal of Experimental Botany* 60(6):1537–1553, 2009.

Van der Maarel MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L: Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of Biotechnology* 94(2):137–155, 2002.

Vermeylen R, Goderi B, Reynaers H, Delcour JA: Gelatinisation related structural aspects of small and large wheat starch granules. *Carbohydrate Polymers* 62(2):170–181, 2005.

Web 1: https://bastak.com/eng/products/falling-number (5.10.2020.)

Whistler RL, BeMiller JN, Paschall EF: STARCH: Chemistry and Technology. Academic Press, San Diego, 1984.

Whitehurst RJ, van Oort M: Enzymes in food technology. Blackwell Publishing Ltd, West Sussex, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2010.