SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Franjo Šumanovac

PRIMJENA MIKRO-VISKOAMILOGRAFA I METODE ODREĐIVANJA BROJA PADANJA U PROCJENI AKTIVNOSTI α-AMILAZE SLADNOG BRAŠNA

DOKTORSKI RAD

Osijek, xxxx.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologije prerade žitarica
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 664.641.19 + 577.152.3 : 532.135 (043.3)
Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**
Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**
Znanstvena grana **Inženjerstvo**
Tema rada **prihvaćena je na XI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 23. rujna 2022.**
Mentor: **prof. dr. sc. Marko Jukić**
Komentor: **dr. sc. Gordana Šimić, znan. savjetnik**

PRIMJENA MIKRO-VISKOAMILOGRAFA I METODE ODREĐIVANJA BROJA PADANJA U PROCJENI AKTIVNOSTI α-AMILAZE SLADNOG BRAŠNA

Franjo Šumanovac, 0113149466

Sažetak: (najviše 200 riječi)
Zadatak ovog doktorskog rada bio je istražiti mogućnost prilagodbe reoloških metoda (Određivanje broja padanja (FN; engl. Falling number) i Mikro-viskoamilografskog (MVA) testa) u svrhu kvantifikacije α-amilaze visoke aktivnosti u sladnom brašnu, koja inače prelazi granice osjetljivosti ovih testova. Metode su modificirane uvođenjem pšeničnog škroba kao supstrata te korištenjem određenih alikvota sladnog brašna ili ekstrakata. Rezultati su validirani usporedbom sa standardnom spektrofotometrijskom Ceralpha metodom. Dodatno, provedena je potpuna i parcijalna inaktivacija α-amilaze pomoću otopina srebrovog nitrata ($AgNO_3$) različitih koncentracija. Linearna i nelinearna eksponencijalna regresijska analiza korištene su za izračunavanje predviđene aktivnosti α-amilaze, a Bland-Altmanova analiza za mjerenje podudarnosti između standardne i modificiranih metoda. Utvrđeno je da modificirani FN postupak i MVA test s alikvotima sladnog brašna daju izvrsnu podudarnost s referentnom metodom. Modifikacije sa sladnim ekstraktom također su pokazale visoku podudarnost s referentnom metodom, no preporučuje se izravna upotreba sladnog brašna kako bi se izbjegao dugotrajan postupak ekstrakcije. Primjena 20 mM $AgNO_3$ za potpunu enzimsku inaktivaciju omogućila je reološku procjenu nativnih svojstava škroba tijekom klijanja, dok se parcijalna inaktivacija pokazala nepouzdanom za predviđanje amilolitičke aktivnosti. Razvijene modificirane reološke metode u ovom radu predstavljaju brzu, točnu i ekonomičnu alternativu standardnim biokemijskim analizama u rutinskoj industrijskoj i znanstvenoj kontroli procesa sladovanja.

Ključne riječi: **α-amilaza, Sladno brašno, Reologija, Broj padanja, Mikro-viskoamilograf**

Rad sadrži: **130 stranica**
40 slika
18 tablica
183 literaturnih referenci

Jezik izvornika: **hrvatski**

Sastav Povjerenstva za ocjenu:

1.	**titula Ime i prezime**	**predsjednik**
2.	**titula Ime i prezime**	**član**
3.	**titula Ime i prezime**	**član**
4.	**titula Ime i prezime**	**zamjena člana**

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu Sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Doctoral Study Food Technology and Nutrition
Department of food technologies
Subdepartment of Cereal technology
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC: 664.641.19 + 577.152.3 : 532.135 (043.3)

Scientific area: **Biotechnical sciences**
Scientific field: **Food Technology**

Thesis subject **was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. XI held on 23 September 2022.**
Mentor: **Prof. Dr. Marko Jukić, PhD**
Co-mentor: **Gordana Šimić, PhD, Scientific Adviser**

USE OF THE MICRO VISCO-AMYLO-GRAPH AND THE FALLING NUMBER METHOD FOR ESTIMATING α-AMYLASE ACTIVITY IN MALT FLOUR

Franjo Šumanovac, 0113149466

Summary: (up to 200 words)

The objective of this doctoral thesis was to investigate the possibility of adapting rheological methods (Falling Number (FN) determination and Micro-Viscoamylograph (MVA) test) for the quantification of high-activity α-amylase in malt flour, which otherwise exceeds the sensitivity limits of these tests. The methods were modified by introducing wheat starch as a substrate and using defined aliquots of malt flour or malt extracts. The results were validated by comparison with the standard spectrophotometric Ceralpha method. Additionally, complete and partial inactivation of α-amylase was carried out using silver nitrate $AgNO_3$ solutions of various concentrations. Linear and non-linear exponential regression analyses were used to calculate the predicted α-amylase activity, while Bland–Altman analysis was applied to assess agreement between the standard and modified methods. It was found that the modified FN procedure and the MVA test using malt flour aliquots show excellent agreement with the reference method. Modifications involving malt extract also showed high agreement with the reference method; however, the direct use of malt flour is recommended to avoid the time-consuming extraction process. The application of 20 mM $AgNO_3$ for complete enzymatic inactivation enabled the rheological evaluation of native starch properties during germination, whereas partial inactivation proved unreliable for predicting amylolytic activity. The modified rheological methods developed in this study represent a rapid, accurate and cost-effective alternative to standard biochemical assays for routine industrial and scientific control of the malting process.

Key words: **α-amylase, Malt flour, Rheology, Falling number, Micro-Viscoamylograph**

Thesis contains: **130 pages**
40 figures
18 tables
183 references

Original in: **Croatian**

Review (Evaluation) committee:

1.	***Name and surname*, PhD, prof./associate prof./assistant prof.**	**chair person**
2.	***Name and surname*, PhD, prof./associate prof./assistant prof.**	**member**
3.	***Name and surname*, PhD, prof./associate prof./assistant prof.**	**member**
4.	***Name and surname*, PhD, prof./associate prof./assistant prof.**	**stand-in**

Defense date: **date**

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; Rector's office, University of Osijek; University Library in Zagreb and in University Library in Osijek

DOKTORSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

_____

Pred Povjerenstvom za obranu doktorskog rada:

1.	**titula, Ime Prezime**	predsjednik	_____ (potpis)
2.	**titula, Ime Prezime**	član	_____ (potpis)
3.	**titula, Ime Prezime**	član	_____ (potpis)

Zahvala

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 7

2.1. ZNAČAJ PŠENICE I JEČMA KAO SIROVINE 8

2.2. MORFOLOŠKA SVOJSTVA ZRNA PŠENICE I JEČMA 10

2.2.1. Opća morfološka organizacija zrna žitarica 10

2.2.2. Morfološka svojstva i anatomija zrna pšenice (*Triticum* spp.) 11

2.2.3. Morfološka svojstva i anatomija zrna ječma (*Hordeum vulgare* L.) 13

2.3. KEMIJSKI SASTAV ZRNA JEČMA I PŠENICE 16

2.3.1. Proteini pšenice i ječma 17

2.3.2. Lipidi 18

2.3.3. Mineralne tvari 19

2.3.4. Šećeri i oligosaharidi 20

2.3.5. Neškrobni polisaharidi 21

2.3.6. Škrob 23

2.4. ENZIMSKI SUSTAV ZRNA JEČMA I PŠENICE 30

2.4.1. Amilolitički enzimi 31

2.4.2. Proteolitički enzimi (proteaze i peptidaze) 34

2.4.3. Hemicelulolitički i citolitički enzimski sustav 35

2.4.4. Fitaze 35

2.4.5. Lipaze i lipoksigenaze 36

2.5. SLADOVANJE JEČMA I PŠENICE 36

2.5.1. Postupak sladovanja 38

2.5.2. Promjene tijekom sladovanja i povećanje biodostupnosti nutrijenata 41

2.5.3. Vrste slada i njihove namjene 44

2.6. DIREKTNE METODE ODREĐIVANJA AMILOLITIČKE AKTIVNOSTI 45

2.6.1. Saharogene metode 45

2.6.2. Amiloklastične metode 46

2.6.3. Kromogene metode 47

2.6.4. ELISA test 47

2.6.5. Spektrofotometrijske metode sa sintetičkim supstratima 47

2.7. INDIREKTNE METODE ODREĐIVANJA AMILOLITIČKE AKTIVNOSTI (REOLOŠKE METODE) 49

2.7.1. Metoda određivanja broja padanja (FN) prema Hagberg-Pertenu 50

2.7.2. Viskografske metode 53

2.8. KEMIJSKA INHIBICIJA AMILOLITIČKIH ENZIMA U REOLOŠKIM MJERENJIMA 57

3. EKSPERIMENTALNI DIO 58

3.1. ZADATAK 59

3.2. MATERIJALI 59

3.3. METODE 60

3.3.1. Postupak mikrosladovanja 60

3.3.2. Ekstrakcija amilolitičkih enzima iz sladnog brašna ... 61
3.3.3. Određivanje udjela vlage ... 61
3.3.4. Određivanje udjela ukupnog škroba ... 62
3.3.5. Određivanje aktivnosti α-amilaze Ceralpha metodom ... 62
3.3.6. Modifikacija metode određivanja broja padanja (FN) ... 63
3.3.7. Modifikacija mikro-viskoamilografskog (MVA) testa ... 64
3.3.8. Metode inaktivacije amilolitičkog sustava pomoću srebrovog nitrata ($AgNO_3$) ... 65
3.3.9. Statistička obrada podataka ... 65
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 67
4.1. SVOJSTVA SLADNOG BRAŠNA ... 68
4.2. PRILAGODBA METODE ODREĐIVANJA BROJA PADANJA (FN) ZA UZORKE SLADNOG BRAŠNA S VISOKOM AKTIVNOŠĆU A-AMILAZE ... 75
4.2.1. Linearna estimacija korištenjem likvefakcijskog broja (LN) ... 79
4.2.2. Nelinearna regresijska procjena aktivnosti α-amilaze pomoću broja padanja (FN) ... 83
4.2.3. Inaktivacija amilolitičkog sustava otopinama srebrovog nitrata u modificiranoj metodi broja padanja (FN) ... 87
4.3. PRILAGODBA METODE ODREĐIVANJA BROJA PADANJA (FN) ZA UZORKE SLADNOG BRAŠNA S VISOKOM AKTIVNOŠĆU A-AMILAZE ... 90
4.3.1. Upotreba alikvota sladnog brašna i sladnog ekstrakta u procjeni aktivnosti α-amilaze pomoću amilografskog parametra Maksimalna viskoznost (PV) ... 92
4.3.2. Upotreba alikvota sladnog brašna i sladnog ekstrakta u procjeni aktivnosti α-amilaze pomoću amilografskih parametara Konačna (FV) i retrogradna viskoznost (SV) ... 97
4.3.3. Inaktivacija amilolitičkog sustava otopinama srebrovog nitrata u amilografskoj analizi ... 107
4.4. USPOREDBA FN I MVA METODE U SVRHU ODREĐIVANJA AKTIVNOSTI A-AMILAZE ... 111
5. ZAKLJUČCI ... 114
6. LITERATURA ... 117

1. UVOD

Škrob je najzastupljeniji rezervni polisaharid u zrnu žitarica i predstavlja primarni izvor energije u ljudskoj prehrani te u ishrani domaćih životinja (Balet i sur., 2019). Tijekom biološkog ciklusa rasta i razvoja, a posebno u fazi klijanja zrna, aktivira se složen sustav hidrolitičkih enzima koji koordinirano razgrađuju makromolekule endosperma (Mäkinen i Arendt, 2015). Među tim enzimima, ključnu ulogu u razgradnji škrobnog supstrata ima amilolitički (dijastatski) sustav, u kojem dominiraju enzimi α-amilaza, β-amilaza, granična dekstrinaza i α-glukozidaza (Duke i Henson, 2008). Dok je β-amilaza u značajnoj količini već prisutna u nativnom, zdravom zrnu žitarica, aktivna α-amilaza sintetizira se tek *de novo* tijekom procesa klijanja (Muralikrishna i Nirmala, 2005; Bwanganga, Béra i Philippe, 2012). Kontrolirana razgradnja škroba pod utjecajem amilolitičkih enzima predstavlja temeljni biokemijski proces za dobivanje kvalitetnih gotovih proizvoda, osobito u mlinsko-pekarskoj, pivarskoj i destilerskoj industriji (Goode i sur., 2005).

U tehnologiji prerade žitarica, poznavanje i kontrola amilolitičke aktivnosti od presudne su važnosti za osiguranje visoke kvalitete finalnih proizvoda. Enzimi α- i β-amilaza kataliziraju hidrolizu škroba pri čemu nastaju fermentabilni šećeri koje kvasci koriste tijekom fermentacije tijesta (Atwell, 2001). Optimalna amilolitička aktivnost osigurava odgovarajući volumen kruha, poželjnu mrvljivost sredine, stabilnu reologiju tijesta te zlatno-smeđu boju kore uslijed Maillardovih reakcija (Atwell, 2001; He i sur., 2019). S druge strane, prekomjerna amilolitička aktivnost uzrokuje ozbiljne tehnološke probleme kao što su ljepljivo i teško obradivo tijesto, vlažna i gnjecava sredina kruha te pretamna boja kore, dok preniska aktivnost rezultira suhim i mrvljivim kruhom malog volumena i blijede kore (Atwell, 2001; Jukić i sur., 2023). Budući da brašna namijenjena proizvodnji pekarskih proizvoda često imaju nedovoljnu dijastatsku aktivnost, u praksi se taj nedostatak korigira dodavanjem male količine (obično 0,1 do 0,4 %) dijastatskog sladnog brašna ili ekstrakta bogatog α-amilazom (De Leyn, 2014; Jukić i sur., 2023).

U pivarskoj industriji, α-amilaza jedan je od najvažnijih enzima tijekom procesa ukomljavanja (engl. *mashing*) slada. Njezin je prvenstveni zadatak brza likvefakcija (ukapljivanje) škrobne paste, pri čemu nasumično cijepa unutarnje α-(1→4)-glikozidne veze škrobnog supstrata i pretvara ga u topljive dekstrine i malto-oligosaharide. Zajedno s β-amilazom, koja osigurava saharifikaciju, α-amilaza izravno određuje prinos ekstrakta, viskoznost sladovine te njezinu konačnu fermentabilnost (Goode i sur., 2005; Fox i sur., 2014). Nedostatak aktivnosti ili termička inaktivacija α-amilaze rezultira nepotpunom razgradnjom škroba, i s tim povezanih problema u proizvodnji.

Slično tome, u destilerskoj industriji, iznimno visoka amilolitička aktivnost preduvjet je za postizanje maksimalne iskoristivosti sirovina. Za razliku od pivarstva, gdje se zahtijeva određeni udio nefermentabilnih dekstrina koji pridonose punoći okusa piva, u destilerstvu je cilj postići potpunu pretvorbu škroba u fermentabilne šećere radi ostvarivanja maksimalnog prinosa etanola (Vriesekoop i sur., 2012). Ovdje α-amilaza djeluje u sinergiji s graničnom dekstrinazom kako bi se potpuno razgradile razgranate strukture amilopektina. Reološko praćenje smanjenja viskoznosti ukomljene mase iznimno je važno za osiguranje energetski učinkovitog miješanja, transporta i optimalne izmjene topline tijekom procesa destilacije (Goode i sur., 2005).

Sladovanje je postupak u kojem se zrno u kontroliranim uvjetima dovodi u fazu klijanja uz optimalnu vlagu i temperaturu kako bi se inducirala sinteza hidrolitičkih enzima. Glavni cilj sladovanja jest ciljana sinteza i aktivacija hidrolitičkih enzima uz kontrolirani stupanj modifikacije endosperma (Mäkinen i Arendt, 2015; Baranwal, 2017). Postupak sladovanja sastoji se od triju kontroliranih faza: namakanja zrna (engl. s*teeping*), klijanja (engl. *germination*) te sušenja (engl. *kilning*) (Mäkinen i Arendt, 2015). O temperaturi sušenja ovisi koliko će se enzima inaktivirati pa se pri proizvodnji dijastatskog slada moraju primijeniti niže temperature sušenja (Baranwal, 2017; Mäkinen i Arendt, 2015).

S obzirom na to da aktivnost α-amilaze u sladu može biti iznimno visoka i prelaziti 300 CU/g (ovisno o duljini klijanja i sorti), precizno određivanje njezine aktivnosti predstavlja temeljni preduvjet za ispravno doziranje i standardizaciju u industriji (Bera i sur., 2018; Jukić i sur., 2023).

Ukupna aktivnost amilolitičkih enzima u sladu i sladnom brašnu uobičajeno se određuje metodom dijastatske snage (DP; engl. *diastatic power*). Na nju utječu svi prisutni amilolitički enzimi (α- i β-amilaza, granična dekstrinaza i α-glukozidaza), a u najveći utjecaj ima β-amilaza (Duke i Henson, 2009). Ako se želi odrediti samo aktvnost α-amilaze, moraju se primijeniti druge specifične metode koje se mogu podijeliti u nekoliko skupina: a) saharogeni postupak, odnosno spektrofotometrijsko određivanje reducirajućih šećera nastalih djelovanjem α-amilaze na supstrat (škrob) uz upotrebu različitih reagensa; b) amiloklastične metode u kojima se prati promjena boje ili zamućenja otopine; c) kromogene metode koje mjere oslobađanje boje koja je prethodno bila vezana na škrob; d) ELISA test; e) spektrofotometrijske metode sa sintetičkim supstratima koji pri reakciji oslobađaju boju kao što su npr. nitrofenilni derivati maltooligosaharida (Ceralpha metoda) (McCleary i sur., 2002; Muralikrishna i Nirmala, 2005). Iako su ove metode visoko specifične i točne, u pravilu su dugotrajne, skupe i zahtijevaju

složenu pripremu uzoraka te centrifugiranje i ekstrakciju enzima, što ih čini manje prikladnima za brzu i rutinsku kontrolu u industrijskim uvjetima.

S druge strane, različite neizravne reološke metode prate promjene viskoznosti škrobne paste uzrokovane djelovanjem enzima. Međutim, one se uobičajeno ne koriste za određivanje aktivnosti α-amilaze u sladnom brašnu jer je amilolitička aktivnost previsoka, pa je likvefakcija vruće škrobne paste vrlo intenzivna te se viskoznost smanji do te mjere da se ne može odrediti uređajima kojima se provode ova ispitivanja (Jukić i sur., 2023).

Među njima se u svijetu već desetljećima koristi standardizirana metoda određivanja broja padanja (FN; engl. *Falling Number*) po Hagberg-Pertenu, vrlo brza i jednostavna, odobrena od strane svih relevantnih međunarodnih organizacija kao što su (ISO, AACC, ICC i ASBC (He i sur., 2019). FN test temelji se na brzoj želatinizaciji suspenzije brašna i vode u kipućoj vodenoj kupelji uz miješanje (60 s), nakon čega se mjeri vrijeme u sekundama potrebno da standardizirana miješalica pod vlastitom težinom propadne kroz nastalu pastu od vrha do dna epruvete (Perten, 1964). U međunarodnoj trgovini pšenicom, za potrebe proizvodnje brašna za pekarsku proizvodnju pšenična zrna s vrijednostima FN ispod 250 s smatraju se tehnološki inferiornima i obično postižu nižu cijenu (He i sur., 2019; Shao i sur., 2019). Ova je metoda vrlo uspješna u detekciji povišenih razina α-amilaze u zrelom zrnu uzrokovanih priježetvenim proklijavanjem (PHS; *engl*. *Preharvest sprouting*) ili amilazom kasnog sazrijevanja (LMA; engl. *Late maturity amylase*) (Mares i Mrva, 2014; Ral i sur., 2016). Ove povišene razine α-amilaze inducirane PHS-om i LMA-om i dalje su relativno niske u usporedbi s razinama aktivnosti α-amilaze u sladovanom zrnu (Jukić i sur., 2023).

Međutim, standardna FN metoda pokazuje ozbiljno fizikalno-kemijsko ograničenje kada se primijeni na uzorke sladnog brašna. Zbog vrlo visoke aktivnosti α-amilaze u sladu, škrob se u potpunosti hidrolizira već u prvim sekundama zagrijavanja. Kao rezultat toga, viskoznost paste intenzivno opada, a miješalica FN uređaja vrlo brzo propada do dna kivete (~1 s), pri čemu uređaj bilježi minimalno moguće očitanje od 61 s. Budući da donji prag standardne metode od 61 s odgovara aktivnosti od svega ~5 CU/g, dok aktivnosti u sladnom brašnu redovito premašuju 100 CU/g, a kod visokodijastatskih sladova i 300 CU/g (Bhatty, 1996), standardna FN metoda potpuno je neupotrebljiva za analizu slada te se javlja potreba za modifikacijom FN testa kako bi bio upotrebljiv i za analizu sladnih brašna s visokom amilolitičkom aktivnošću (Raschke i sur., 1995; Yu i sur., 2015).

Za razliku od FN metode, koja daje samo jedan zbirni podatak (vrijeme padanja), razvijeni su moderni rotacijski viskozimetri s mogućnošću kontinuiranog praćenja viskoznosti tijekom precizno kontroliranog temperaturnog ciklusa zagrijavanja i hlađenja škrobne suspenzije, pri čemu se dobiva znatno potpunija slika o svojstvima škrobne komponente ispitivanog uzorka. Dva najraširenija instrumenta ovog tipa su tzv. brzi viskoanalizator (Rapid Visco Analyser, RVA) i mikro-viskoamilograf (Micro Visco-Amylo-Graph, MVA) (Balet i sur., 2019; Mariotti i sur., 2005). Kontinuirane krivulje viskoznosti (viskogrami) koje se generiraju na ovim uređajima bilježe ključne parametre koji odražavaju fizikalno-kemijsko stanje škrobne komponente i razinu enzimske aktivnosti (Batey i Curtin, 2000; Balet i sur., 2019). Ipak, slično kao i kod FN metode, visoka koncentracija α-amilaze u sladnim brašnima uzrokuje prebrzu likvefakciju škroba i „ravne“ amilografske krivulje, čime se eliminira mogućnost razlikovanja uzoraka (Goode i sur., 2005).

Kako bi se izolirala „nativna“ reološka svojstva škroba u sladu bez ometajućeg utjecaja aktivnih enzima, u analitici se često primjenjuje metoda enzimske inaktivacije pomoću teških metala, pri čemu se otopina srebrova nitrata ($AgNO_3$) koristi kao najučinkovitiji inhibitor α-amilaze (Zhou i Mendham, 2005; Fox i sur., 2014). Ioni srebra (Ag^+) snažno i specifično se vežu za katalitičke i sulfhidrilne skupine enzima, istiskujući kalcijeve ione (Ca^{2+}) koji su nužni za stabilnost trodimenzionalne strukture i aktivnost α-amilaze, čime se dobiva amilografski profil ekvivalentan čistom škrobnom supstratu (Meredith, 1970; Batey, Curtin i Moore., 1997; Fox i sur., 2014).

Zbog nemogućnosti izravnog određivanja broja padanja i amilografskih parametara sladnog brašna, neki istraživači su u tu svrhu koristili škrob kao supstrat uz dodatak male količine sladnog brašna pri provođenju analiza (Raschke i sur., 1995; Bhatty, 1996). Na taj je način moguće približno procijeniti amilolitičku aktivnost, međusobno usporediti različita sladna brašna i odrediti potrebnu količinu dodatka sladnog brašna za proizvodnju pekarskih proizvoda. Međutim, do danas nije razvijena jedinstvena metodologija za određivanje amilografskih parametara i broja padanja kojom bi se procijenila aktivnost α-amilaze u sladnom brašnu, a koja bi bila usporediva sa standardnim spektrofotometrijskim metodama.

Stoga je cilj istraživanja u okviru ovog doktorskog rada bio prilagoditi i modificirati reološke metode određivanja broja padanja (FN) i mikro-viskoamilografskog (MVA) testa radi određivanja aktivnosti α-amilaze u uzorcima sladnog brašna, na način da se dobiveni rezultati mogu lako usporediti s vrijednostima dobivenima standardnim spektrofotometrijskim metodama.

Ispitivanja su provedena na tri metodološka načina: a) uvođenjem točno definiranih alikvota sladnog brašna uz pšenični škrob kao standardni reološki supstrat; b) uvođenjem različitih volumena vodenog sladnog ekstrakta uz pšenični škrob kao supstrat; c) parcijalnom i potpunom inaktivacijom α-amilaze u analitičkom sustavu primjenom otopina srebrova nitrata ($AgNO_3$) različitih koncentracija. Svi dobiveni rezultati analizirani su metodama nelinearne i linearne regresijske analize radi dobivanja matematičkih modela za predviđanje aktivnosti α-amilaze sladnog brašna izravno iz reoloških pokazatelja, a provedena je i statistička validacija i verifikacija razvijenih modela primjenom Bland-Altmanove analize podudarnosti metoda.

Osim toga, određena je aktivnost α-amilaze tijekom procesa sladovanja pšenice te stočnog, pivarskog i golozrnog ječma standardnom spektrofotometrijskom Ceralpha metodom (AACC International 22-02.01, 2021) kako bi se dobile informacije o kinetici promjene aktivnosti α-amilaze i intenzitetu hidrolize škroba tijekom različitih faza sladovanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Značaj pšenice i ječma kao sirovine

Žitarice čine osnovni i tehnološki nezamjenjiv dio ljudske prehrane te hranidbe domaćih životinja zbog svojeg dominantnog doprinosa dnevnom unosu ugljikohidrata, bjelančevina, lipida i esencijalnih tvari poput minerala, vitamina i raznovrsnih bioaktivnih sastojaka (Foligni i sur., 2024). Svi današnji komercijalno uzgajani kultivari žitarica jednogodišnje su biljke koje botanički pripadaju porodici trava (*Gramineae*), a najznačajnije su obična pšenica (*Triticum aestivum* L.), ječam (*Hordeum vulgare* L.), riža (*Oryza sativa*), raž (*Secale cereale*), zob (*Avena sativa*) i kukuruz (*Zea mays*), sirak (Sorghum vulgare) i pšenoraž (*Triticosecale*). U tehnološkom i nutritivnom smislu važno je spomenuti i pseudožitarice poput heljde (*Fagopyrum esculentum*), amaranta (*Amaranthus* spp.) i kvinoje (*Chenopodium quinoa*) (Fardet, 2010).

Analizom pojedinačne globalne proizvodnje žitarica, kukuruz čvrsto dominira svjetskim tržištem s ukupnom proizvodnjom od 1,31 milijardi tona u 2026. godini, što je izravna posljedica njegove primarne uloge temeljnog krmiva u stočarstvu. Drugo mjesto na globalnoj ljestvici zauzima pšenica s proizvodnjom od 814 milijuna tona, a slijede je riža s 552 milijuna tona te ječam sa 145 milijuna tona (FAO, 2026). Slični se proizvodni trendovi i odnosi među kulturama opažaju i u poljoprivrednoj proizvodnji na području Republike Hrvatske. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS, 2026a; 2026b), u 2026. godini u Hrvatskoj je proizvedeno najviše kukuruza (1,5 milijuna tona), zatim 1,1 milijuna tona pšenice te 319 tisuća tona ječma.

Pšenica ima status najvažnije žitarice u tehnologiji mlinsko-pekarskih proizvoda te u izravnoj ljudskoj prehrani (Brlek i sur., 2018). Oko dvije trećine ukupno proizvedene pšenice na globalnoj razini namijenjeno je izravno prehrani ljudi, dok se preostala trećina koristi za hranidbu životinja i industrijske svrhe. O golemom tehnološkom i društvenom značaju ove kulture svjedoči i podatak da više od 35% cjelokupne svjetske populacije ovisi o pšenici kao glavnom izvoru energije i proteina (Ammar i sur., 2023). Njezina kultivacija započela je u ranom razdoblju neolitika, prije otprilike 10 000 godina, na plodnom području Bliskog istoka, pri čemu arheološki nalazi upućuju na to da je pšenica bila jedna od prvih sustavno uzgajanih biljnih vrsta u povijesti čovječanstva (Khalid i sur., 2023). Divlje vrste pšenice (poput *Triticum urartu*, *Triticum boeoticum* i *Triticum dicoccoides*) značajno su se razlikovale od današnjih modernih sorti po znatno manjem prinosu, manjim dimenzijama zrna i klasova te po tome što su zrna bila izrazito čvrsto povezana s pljevicom. Današnji kultivari nastali su tijekom tisućljeća

selekcije, i slučajne i planirane, te kasnijeg znanstvenog oplemenjivanja, što je rezultiralo visokim prinosima i povećanom otpornošću na nepovoljne biotičke i abiotičke čimbenike okoliša (Khalid i sur., 2023). Zbog goleme genetske varijabilnosti danas je poznato više od 25 000 različitih kultivara pšenice, među kojima su tehnološki najznačajnije obična pšenica (*Triticum aestivum* L.) i durum pšenica (*Triticum durum* L.). Durum pšenicu odlikuje visoka tvrdoća staklastog endosperma te povišen udio proteina i specifičnog glutena visoke rastezljivosti, zbog čega se primarno koristi za proizvodnju tjestenine i krupice, dok se obična pšenica melje u različite tipove brašna namijenjene pekarstvu i konditorskoj industriji (de Sousa i sur., 2021; Sissons, 2022).

Ječam zauzima iznimno važno mjesto među globalno uzgajanim žitaricama te se primarno koristi u industriji slada i piva, hranidbi stoke te sve više u izravnoj ljudskoj prehrani kao funkcionalna hrana (Lukinac i Jukić, 2022). Iako je kroz povijest bio jedna od temeljnih žitarica u ljudskoj prehrani, danas se najveći dio svjetske proizvodnje ječma usmjerava na proizvodnju stočne hrane te za potrebe sladarske i pivarske industrije, dok je svega oko 6 % namijenjeno izravnoj ljudskoj potrošnji (Lukinac i Jukić, 2022). Unatoč tomu, interes prehrambene industrije za ječmom naglo raste zbog visokog udjela topivih prehrambenih vlakana, posebice β-glukana, za koje je dokazano da snižavaju razinu kolesterola u krvi i reguliraju postprandijalni glikemijski odgovor (Baik i Ullrich, 2008). Njegova kultivacija započela je u ranom razdoblju neolitika, prije otprilike 10 000 godina, na području Plodnog polumjeseca na Bliskom istoku, što ječam čini jednom od najranije kultiviranih i najstarijih uzgajanih žitarica u povijesti čovječanstva (Badr i sur., 2000). Današnji uzgojeni ječam izravni je potomak divljeg ječma (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*), od kojeg se moderni kultivari razlikuju po znatno većem prinosu, krupnijim dimenzijama zrna i smanjenom osipanju klasova, što je rezultat stoljetne selekcije i suvremenog oplemenjivanja radi povećanja otpornosti na nepovoljne biotičke i abiotičke čimbenike okoliša (Zohary i Hopf, 1988). Zbog velike genetske varijabilnosti i iznimne prilagodljivosti ječam se danas uspješno uzgaja u širokom rasponu od subarktičkih do suptropskih klimatskih zona (Ullrich, 2011). U biološkom i tehnološkom pogledu kultivari ječma primarno se klasificiraju prema broju plodnih klasića u klasu na dvoredni (*Hordeum vulgare* ssp. *distichon*) i višeredni/šesteroredni (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*), te prema čvrstoći prianjanja pljevice uz zrno na pljevičasti i golozrni ječam. Dvoredi pljevičasti ječam odlikuje se ujednačenim krupnim zrnom i povišenim udjelom ekstrakta, zbog čega je primarni izbor za sladarsku i pivarsku industriju, dok se višeredni ječam s povišenim udjelom proteina češće koristi za hranidbu životinja. Golozrni ječam se zbog slabog prianjanja pljevice na zrno

lakše prerađuje te ima sve veću važnost u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda poput pekarskih proizvoda, tjestenine, kolača i pahuljica (Baik i Ullrich, 2008; Lukinac i Jukić, 2022).

2.2. Morfološka svojstva zrna pšenice i ječma

2.2.1. Opća morfološka organizacija zrna žitarica

Plod biljaka iz porodice trava (*Poaceae*) botanički je definiran kao pšeno (*caryopsis*), odnosno jednosjemeni suhi plod kod kojega je stijenka ploda, odnosno usplođe (perikarp), čvrsto povezana sa sjemenom ovojnicom (testom). Zrno žitarica anatomski se može podijeliti na tri osnovne cjeline: vanjske zaštitne slojeve, klicu i endosperm. Prosječni maseni udjeli pojedinih anatomskih dijelova zrna pšenice i ječma prikazani su u **Tablici 1.** Kod pljevičastih žitarica, poput većine kultivara ječma, ovoj se građi pridružuje i pljevica koja ostaje čvrsto povezana sa zrnom (pšenom) nakon vršidbe (Evers, Blakeney i O'Brien, 1999; Evers i Millar, 2002; McKevith, 2004).

Tablica 1 Prosječni maseni udjeli (%) pojedinih anatomskih dijelova zrna pšenice i ječma*

Vrsta	Pljevice	Omotač	Aleuronski sloj	Škrobni endosperm	Klica	
					Embrionalna os	Štitčić
Pšenica	-	8,5	6,7	82,0	1,3	1,5
Ječam	13,0	2,9 (3,3)**	4,8 (5,5)	76,3 (87,0)	1,7 (1,9)	1,3 (1,5)

* Tablica prilagođena prema Evers i Millar (2002), uz uvjete licence Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).
** Vrijednosti u zagradama odnose se na udjele u zrnu ječma bez pljevice.

Klica (embrij) predstavlja metabolički aktivni dio zrna iz kojega se tijekom klijanja razvija nova biljka. Endosperm čini najveći dio zrna i glavno je skladište rezervnih tvari, prije svega škroba i skladišnih proteina. Na njegovoj periferiji nalazi se aleuronski sloj, metabolički aktivno tkivo koje tijekom klijanja sudjeluje u mobilizaciji rezervnih tvari endosperma. Vanjski slojevi zrna imaju prvenstveno zaštitnu ulogu, ali istodobno sadrže značajan dio prehrambenih vlakana, mineralnih tvari, lipida, vitamina i različitih bioaktivnih spojeva (Evers i Millar, 2002; McKevith, 2004).

Anatomska organizacija zrna izravno je povezana s njegovim fizikalnim i tehnološkim svojstvima. Veličina i oblik zrna, struktura i tvrdoća endosperma, raspored škrobnih granula te

čvrstoća povezanosti pojedinih anatomskih dijelova utječu na ponašanje žitarica tijekom skladištenja, mljevenja i drugih postupaka prerade. Kod ječma anatomska građa ima dodatnu važnost za proces sladovanja, tijekom kojega dolazi do kontrolirane klijavosti i postupne enzimske modifikacije endosperma (Evers and Millar, 2002; Gupta, Abu-Ghannam i Gallaghar, 2010; Lukinac i Jukić, 2022).

2.2.2. Morfološka svojstva i anatomija zrna pšenice (*Triticum* spp.)

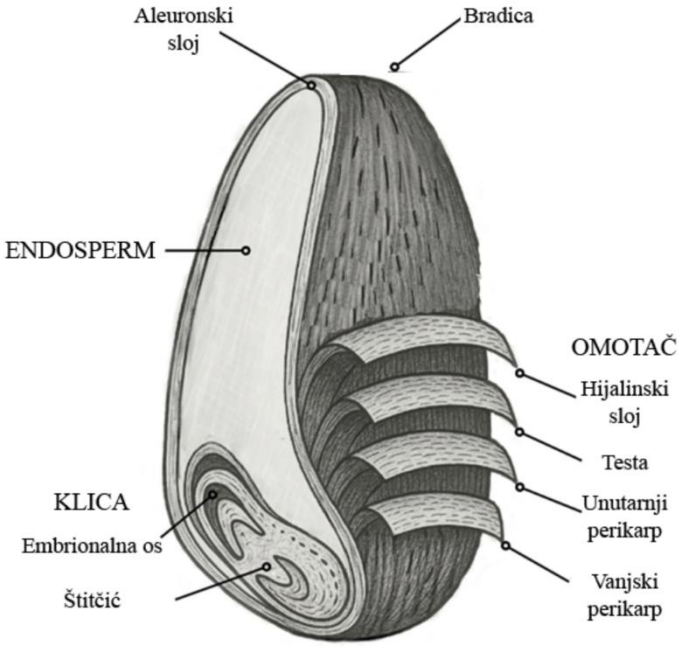
Pšenica pripada skupini pravih (strnih) žitarica s golim zrnom, što znači da se pljevice tijekom vršidbe odvajaju od zrna (pšena). Zrno pšenice najčešće je izduženo, jajoliko ili elipsoidno, a na ventralnoj strani ima karakterističnu uzdužnu brazdu. Na proksimalnom se dijelu nalazi klica, dok se na distalnom nalazi bradica, odnosno skupina finih dlačica karakterističnih za pšenično zrno (Evers, Blakeney i O'Brien, 1999; Evers i Millar, 2002).

U funkcionalnom smislu zrno pšenice može se podijeliti na omotač, klicu i endosperm (**Slika 1**). Endosperm čini najveći dio mase zrna i predstavlja najvažniju frakciju za proizvodnju bijelog brašna, dok se tijekom mljevenja vanjski slojevi i aleuronsko tkivo pretežito izdvajaju u mekinje. Raspodjela pojedinih anatomskih frakcija nije konstantna, nego ovisi o genotipu, uvjetima uzgoja i načinu razdvajanja anatomskih dijelova (Evers, Blakeney i O'Brien, 1999; Evers i Millar, 2002).

Vanjski slojevi (omotač) pšeničnog zrna obuhvaćaju perikarp, testu i hijalinski sloj. Perikarp potječe od stijenke plodnice i sastoji se od više histoloških zona, dok testa predstavlja sjemenu ovojnicu. Ti slojevi zajedno čine zaštitnu barijeru između unutrašnjosti zrna i okoliša te sudjeluju u regulaciji prijenosa vode i drugih tvari prema unutrašnjosti zrna (Evers, Blakeney i O'Brien, 1999; Evers i Millar, 2002).Kemijski sastav vanjskih slojeva razlikuje se od sastava endosperma. U njima su koncentrirani različiti oblici prehrambenih vlakana, među kojima se posebno ističu arabinoksilani i celuloza, kao i mineralne tvari, lipidi, vitamini i fenolni spojevi. Zbog njihove neravnomjerne raspodjele unutar zrna, proces mljevenja i stupanj izmeljavanja znatno utječu na kemijski i nutritivni sastav konačnog brašna (Evers, Blakeney i O'Brien, 1999; McKevith, 2004).

Endosperm predstavlja najveću anatomsku cjelinu pšeničnog zrna i glavno skladišno tkivo. Njegov najveći dio čini škrobni endosperm, koji se sastoji od stanica ispunjenih škrobnim granulama uklopljenima u proteinski matriks. Na periferiji endosperma nalazi se aleuronski sloj, koji se od škrobnog endosperma razlikuje po građi, kemijskom sastavu i metaboličkoj

aktivnosti (Evers i Millar, 2002). Aleuronski sloj pšeničnog zrna tipično je jednoslojan. Aleuronske stanice bogate su proteinima, mineralnim tvarima, lipidima, fitatima, vitaminima i enzimima. Za razliku od stanica škrobnog endosperma, one ostaju biološki aktivne u zrelom zrnu. Tijekom klijanja aleuronsko tkivo aktivno sudjeluje u sintezi i izlučivanju hidrolitičkih enzima, koji omogućuju mobilizaciju rezervnih tvari endosperma i opskrbu klice potrebnim hranjivim tvarima (Evers i Millar, 2002; McKevith, 2004). Škrobni endosperm nije potpuno homogeno tkivo. U njemu se mogu razlikovati područja subaleuronskih, prizmatičnih i središnjih stanica, koja se razlikuju u veličini stanica, sadržaju proteina i gustoći škrobnih granula. Ovakva prostorna organizacija važna je za razumijevanje ponašanja zrna tijekom mljevenja i prerade (Evers i Millar, 2002).



Slika 1 Građa zrna pšenice. Prilagođeno prema Ariyarathna i sur. (2025), uz uvjete licence Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Klica (embrij) smještena je na dorzalnoj strani proksimalnog dijela zrna, i sastoji se od štitčića (*scutellum*) i embrionalne osi. Štitčić predstavlja modificiranu supku jednosupnica te se nalazi između embrionalne osi i endosperma. Štitčić ima važnu ulogu tijekom klijanja jer sudjeluje u prijenosu mobiliziranih rezervnih tvari iz endosperma prema embriju. Embrionalna os sadrži začetke budućeg izdanka i korijena. Njezin gornji dio čini klicin pupoljak (*plumula*) sa

začetcima listova, koji je zaštićen koleoptilom, dok se na donjem dijelu nalazi radikula (*radicula*), odnosno klicin korjenčić, zaštićen koleorizom. Takva organizacija omogućuje jasno razlikovanje osnovnih dijelova klice već u zrelom zrnu. Klica pšenice čini približno 2,5–3,5% mase zrna, iako njezin udio može varirati ovisno o genotipu i svojstvima zrna. Zbog relativno visokog sadržaja lipida i drugih bioaktivnih sastojaka, klica se kemijski razlikuje od škrobnog endosperma. Pri proizvodnji bijelog pšeničnog brašna najveći se dio klice uklanja zajedno s vanjskim slojevima, čime se produljuje stabilnost brašna tijekom skladištenja (Faltermaier i sur., 2014; Evers i Millar, 2002; McKevith, 2004).

2.2.3. Morfološka svojstva i anatomija zrna ječma (*Hordeum vulgare* L.)

Za razliku od pšenice, većina komercijalnih kultivara ječma pripada skupini pljevičastih žitarica. Kod takvog ječma cvjetne pljevice, odnosno lema i palea, ostaju čvrsto povezane s pšenom nakon sazrijevanja i vršidbe. Zbog toga pljevice čine sastavni dio zrna i imaju važnu zaštitnu i tehnološku funkciju, osobito tijekom sladovanja i proizvodnje piva (Evers i Millar, 2002). Kod golozrnog ječma pljevice se tijekom vršidbe odvajaju od pšena. Genetska osnova ovog svojstva povezana je s genom *nud*. Taketa i sur. (2008) pokazali su da gen *nud* kodira transkripcijski faktor odgovora na etilen (ERF; engl. *Ethylene Response Factor*) uključen u regulaciju biosintetskog puta lipida, čime se određuju svojstva sloja odgovornog za vezivanje pljevice uz pšeno. Anatomski, pšeno ječma sastoji se od vanjskih slojeva, klice i endosperma, dok je kod pljevičastog ječma cijelo pšeno dodatno obavijeno pljevicama (**Slika 2**). Udio pojedinih frakcija može se znatno razlikovati među kultivarima i ovisno o načinu razdvajanja, pa se pojedinačne vrijednosti trebaju smatrati približnima, a ne univerzalnim anatomskim konstantama (Evers i Millar, 2002; Lukinac i Jukić, 2022).

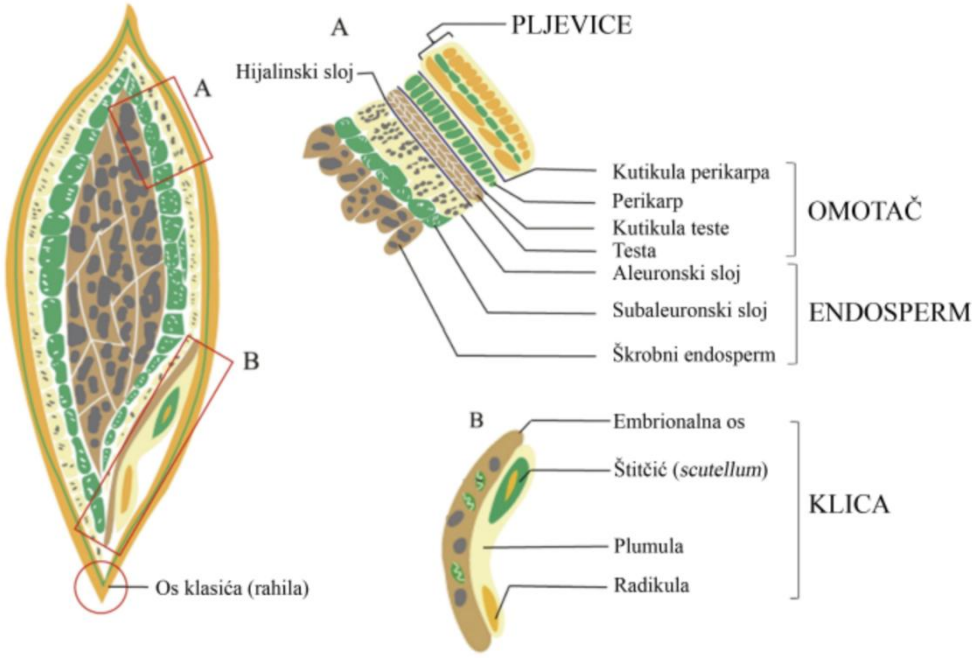
Ječam se prema građi klasa tradicionalno dijeli na dvoredni i šesteroredni. Kod dvorednog ječma razvija se samo središnji klasić svakog usjeka klasnoga vretena, dok su bočni klasići sterilni. Zbog toga su razvijena zrna obično krupnija, pravilnija i ujednačenija. Kod šesterorednog ječma razvijena su sva tri klasića svakog usjeka klasnoga vretena. Središnja su zrna obično pravilnija i simetričnija, dok su bočna zrna, zbog ograničenog prostora u klasu, češće asimetrična i nešto nepravilnijeg oblika. Takva razlika utječe na raspodjelu veličine zrna unutar uzorka, što je važno za proces sladovanja (Lukinac i Jukić, 2022). Dvoredni ječam tradicionalno ima važnu ulogu u proizvodnji slada, ali ga nije opravdano općenito smatrati tehnološki superiornim šesterorednom. Sladarska kvaliteta ovisi o nizu svojstava, uključujući genotip, klijavost, veličinu i ujednačenost zrna, sadržaj proteina i škroba, sadržaj β-glukana te

sposobnost zrna da tijekom klijanja razvije odgovarajući enzimski potencijal (Gupta, Abu-Ghannam i Gallagher, 2010). Uz navedena svojstva, važna morfološka komponenta klasifikacije i identifikacije kultivara ječma je i os klasića rahila (*rachilla*). Smještena u bazi trbušne brazde neposredno uz unutrašnju pljevicu, rahila predstavlja skraćenu, zakržljalu os klasića koja nakon vršidbe ostaje trajno vezana uz zrno. Njezina duljina te specifični tip dlakavosti (duge ravne ili kratke kovrčave dlake) služe kao ključni taksonomski biljezi za determinaciju čistoće sorti unutar proizvodnog i sladarskog asortimana. Ova anatomska značajka predstavlja jasnu diferencijalnu razliku u odnosu na pšenicu jer se njezina rahila tijekom procesa žetve i vršidbe u potpunosti odvaja od zrna. (Taketa i sur., 2009).

Pljevica je jedna od najvažnijih morfoloških značajki ječmenog zrna. Sastoji se prvenstveno od leme i palee te tijekom razvoja pruža mehaničku i fizikalnu zaštitu pšenu i embriju. Kod pljevičastog ječma pljevica je čvrsto povezana s pšenom zahvaljujući specifičnom kutikularnom vezivnom sloju koji se razvija na površini pšena. Brennan i sur. (2017) pokazali su da kvaliteta vezivanja pljevice uz pšeno ovisi o sastavu tog vezivnog sloja. Njegov razvoj započinje tijekom kasne mliječne faze razvoja zrna, a na sastav sloja i čvrstoću vezivanja utječu i temperaturni uvjeti prije cvatnje i nakon nje. Slabije vezivanje pljevice može rezultirati pojavom ljuštenja zrna, odnosno djelomičnim ili potpunim odvajanjem pljevice tijekom žetve i rukovanja zrnom. Čvrsto povezana pljevica ima naročitu važnost za proizvodnju slada. Ona štiti embrij od mehaničkih oštećenja tijekom rukovanja zrnom, a u proizvodnji piva nakon mljevenja slada sudjeluje u formiranju filtracijskog sloja tijekom cijeđenja komine. Zbog toga je očuvanje pljevice važno svojstvo kvalitetnog sladarskog ječma (Gupta, Abu-Ghannam i Gallaghar, 2010; Lukinac i Jukić, 2022).

Ispod pljevice nalaze se perikarp i testa, koji, zajedno s ostalim vanjskim slojevima pšena, čine zaštitnu barijeru između unutarnjih tkiva i okoliša. Njihova struktura utječe na prijenos vode tijekom hidratacije zrna, što je osobito važno tijekom namakanja u procesu sladovanja. Ispod teste nalazi se nucelarni epidermis, odnosno hijalinski sloj, čija je građa povezana s funkcijom barijere i prijenosom vode i otopljenih tvari prema unutarnjim tkivima zrna (Evers i Millar, 2002; Gupta, Abu-Ghannam i Gallagher, 2010). Jedna od važnih anatomskih posebnosti ječmenog zrna jest građa aleuronskog sloja. Za razliku od pšenice, kod koje je aleuron tipično organiziran u jednom sloju stanica, kod ječma se aleuronski sloj u pravilu sastoji od triju slojeva stanica. Ova razlika odražava specifičnu organizaciju endosperma ječma i važna je za njegovu funkciju tijekom klijanja. Aleuronske su stanice ječma metabolički aktivne te sadrže proteine, lipide, mineralne tvari, fitate i druge rezervne ili funkcionalne komponente. Nakon hidratacije

i početka klijanja hormonski signali iz embrionalnog područja, osobito giberelini, potiču aleuronske stanice na sintezu hidrolitičkih enzima. Oni sudjeluju u razgradnji staničnih stijenki, škroba i drugih komponenti endosperma te omogućuju mobilizaciju rezervnih tvari potrebnih za rast klice (Gupta, Abu-Ghannam i Gallagher, 2010; Lukinac i Jukić, 2022).



Slika 2 Građa zrna ječma. Prilagođeno prema Geng i sur. (2022), uz uvjete licence Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

U funkcionalnom smislu potrebno je razlikovati aleuronski sloj od subaleuronskog područja škrobnoga endosperma. Subaleuronske stanice predstavljaju prijelazno područje između aleuronskog sloja i unutarnjeg endosperma te se odlikuju većim udjelom proteina i manjim udjelom škroba u odnosu na dublje smještene stanice endosperma (Shewry, Tatham i Halford, 2002).

Škrobni endosperm predstavlja najveći dio zrna ječma i glavno je skladište škroba. Škrobne granule smještene su unutar endospermalnih stanica, zajedno sa skladišnim proteinima i drugim komponentama. Kao i pšenični škrob, ječmeni škrob sadrži velike i male granule, iako se njihova raspodjela i morfološke karakteristike mogu razlikovati ovisno o genotipu i uvjetima razvoja zrna. Posebno obilježje ječmenog endosperma predstavljaju stanične stijenke bogate β-glukanima. Uz β-glukane, značajan sastojak staničnih stijenki predstavljaju arabinoksilani,

dok su celuloza i drugi polisaharidi prisutni u manjim količinama. (Fincher i Stone, 1986; Gupta, Abu-Ghannam i Gallaghar, 2010).

Klica ječma, kao i kod pšenice, sastoji se od štitčića (*scutellum*) i embrionalne osi. Štitčić je smješten između embrionalne osi i endosperma, a njegova je površina prema endospermu obložena jednoslojnim epitelom. Embrionalna os obuhvaća klicin pupoljak sa začetcima listova, koleoptil, radikulu i koleorizu. U osnovnoj anatomskoj organizaciji klica ječma stoga se bitno ne razlikuje od klice pšenice. Razlike se prvenstveno odnose na veličinu i oblik pojedinih struktura te njihov prostorni odnos prema okolnim tkivima zrna. Kod ječma je klica smještena neposredno uz endosperm, a kod pljevičastih oblika cijelo je zrno dodatno obavijeno pljevicama koje nakon vršidbe ostaju čvrsto povezane sa zrnom. Ovakav anatomski odnos pojedinih dijelova zrna važan je za razumijevanje kasnijih promjena tijekom klijanja i sladovanja (Daneri-Castro et al., 2016; Betts et al., 2017).

2.3. Kemijski sastav zrna ječma i pšenice

Iako morfološki vrlo slična, zrna ječma i pšenice pokazuju određene kvantitativne razlike u kemijskom sastavu koje izravno utječu na njihovu tehnološku namjenu. Kemijski sastav zrna nije konstantna veličina, već ovisi o genotipu, klimatskim i pedološkim uvjetima uzgoja, gnojidbi, dostupnosti vode te stupnju zrelosti zrna u trenutku žetve, zbog čega se vrijednosti navedene u **Tablici 2** trebaju promatrati kao reprezentativne prosječne vrijednosti za cjelovito zrno, a ne kao fiksne, univerzalno važeće vrijednosti. Posebno je izražena varijabilnost sadržaja proteina i neškrobnih polisaharida, koji mogu varirati u dosta velikim rasponima ovisno o sorti i agroekološkim čimbenicima (Frølich, Åman i Tetens, 2013; Shewry i Hey, 2015; Wieser i sur., 2023; Lukinac i Jukić, 2022).

Škrob je dominantna komponenta suhe tvari oba zrna te u pravilu čini između 50 i 65% mase zrna ječma (Fox, 2010; Lukinac i Jukić, 2022) i nešto više, oko 60 do 70% mase zrna pšenice (Ammar i sur., 2023; Tosi i sur., 2018; Wieser, Koehler i Scherf, 2020), pri čemu je njegov udio obrnuto proporcionalan udjelu proteina. Proteini su druga po zastupljenosti komponenta te u ječmu čine približno 8 do 15% suhe tvari, a u pšenici 10 do 15%, pri čemu agronomski uvjeti (ponajprije razina dušične gnojidbe) mogu značajno pomaknuti taj raspon (Fox, 2010; Brlek i sur., 2018; Frølich, Åman i Tetens, 2013; Newman i Newman, 2008; Lukinac i Jukić, 2022). Lipidi su zastupljeni u znatno manjem udjelu, svega 2 do 3 % suhe tvari zrna, no unatoč niskom udjelu imaju nezanemariv tehnološki značaj jer utječu na svojstva želatinizacije škroba

stvaranjem kompleksa s amilozom te su podložni oksidativnom kvarenju tijekom skladištenja (Day, 2004; Morrison, 1988).

Tablica 2 Prosječni kemijski sastav zrna pšenice i ječma (% s.t.)*

Komponenta	Pšenica (%)	Pljevičasti ječam (%)	Golozrni ječam (%)
Proteini	12,1	13,7	14,1
Škrob	66,7	55,9	61,3
Šećeri	1,3	1,2	1,5
Lipidi	2,1	2,2	2,7
Prehrambena vlakna	13,5	20,2	13,8
β-glukan	0,8	4,8	5,7
Arabinoksilani	5,6	6,2	4,4
Pepeo (minerali)	2,0	2,7	2,1

* Prilagođeno prema Wieser, Koehler i Scherf (2020), Frølich, Åman i Tetens (2013), Newman, i Newman (2008) i Lukinac i Jukić (2022).

Ugljikohidrati stanične stijenke, prvenstveno β-glukani i arabinoksilani (pentozani), predstavljaju frakciju prema kojoj se ječam bitno razlikuje od pšenice. Ječam sadrži znatno viši udio β-glukana (3 do 8%) u odnosu na pšenicu (0,5 do 1%), što ima izravne posljedice na viskoznost sladovine i filtracijska svojstva tijekom pivarske proizvodnje. Preostali dio suhe tvari čine mineralne tvari (pepeo, oko 2 do 3 %) te male količine vitamina i fenolnih spojeva koncentriranih ponajprije u aleuronskom sloju i klici (Fox, 2010; Lukinac i Jukić, 2022).

2.3.1. Proteini pšenice i ječma

Proteini pšeničnog zrna tradicionalno se, prema Osborneovoj klasifikaciji topljivosti, dijele na albumine, globuline, glijadine i glutenine. Albumini i globulini uglavnom su metabolički aktivni proteini, uključujući enzime i druge funkcionalne proteine, dok glijadini i glutenini čine glavninu skladišnih proteina te zajedno obuhvaćaju približno 70 do 80% ukupnih proteina zrna (Shewry, P. R. & Tatham, 1990; Wieser i sur., 2023). Glijadini su pretežno monomerni proteini koji se prema strukturi dijele na ω5-, ω1,2-, α-, i γ-glijadine, dok su glutenini polimerni proteini sastavljeni od podjedinica visoke (HMW-GS; engl. *High-Molecular-Weight Glutenin Subunits*) i niske molekulske mase (LMW-GS; engl. *Low-Molecular-Weight Glutenin Subunits*), međusobno povezanih disulfidnim vezama u velike proteinske polimere (Shewry, P. R. &

Tatham, 1990; Wieser i sur., 2023). Upravo hidratacija i međusobna interakcija glijadina i glutenina tijekom miješanja tijesta dovode do stvaranja viskoelastične glutenske mreže. Glijadini prvenstveno pridonose viskoznosti i rastezljivosti, a polimerne frakcije glutenina, naročito one bogate HMW-GS podjedinicama, određuju elastičnost i čvrstoću mreže te njezinu sposobnost zadržavanja plinova nastalih tijekom fermentacije (Wieser i sur., 2023). Relativni udio pojedinih glijadinskih i gluteninskih frakcija ovisi o genotipu, okolišnim uvjetima i agronomskim faktorima, uključujući dostupnost dušika, zbog čega sadržaj ukupnih proteina nije dostatan pokazatelj tehnološke kvalitete pšenice bez poznavanja kvalitativnog sastava proteinskih frakcija (Wieser i sur., 2023).

Za razliku od pšenice, kod ječma glavnu skupinu skladišnih proteina ne čine glutenini i glijadini, već hordeini, koji pripadaju skupini prolamina. Hordeini čine približno 35 do 50% ukupnih proteina ječma te se, ovisno o molekulskoj masi, tradicionalno dijele na četiri skupine: B-, C-, D- i γ-hordeine, pri čemu su B-hordeini (sumporom bogata frakcija, oko 50 kDa) najzastupljenija skupina, a C-hordeini (sumporom siromašna frakcija, 55 do 65 kDa) čine drugu po zastupljenosti frakciju (Tanner i sur., 2019). Za razliku od pšeničnih proteina, hordeini ne stvaraju viskoelastičnu proteinsku mrežu usporedivih funkcionalnih svojstava, a njihova tehnološka važnost proizlazi ponajprije iz uloge skladišnih proteina te iz promjena kojima podliježu tijekom klijanja(Tanner i sur., 2019).

2.3.2. Lipidi

Lipidi žitarica, iako čine svega 1 do 3 % ukupne suhe tvari brašna odnosno zrna, predstavljaju izuzetno raznoliku i funkcionalno značajnu skupinu biomolekula (Marion, Dubreil i Douliez, 2003; Morrison, 1988). U zrelom zrnu pšenice i ječma lipidi nisu ravnomjerno raspoređeni, već je njihova struktura i lokalizacija strogo definirana fiziološkom ulogom pojedinih tkiva tijekom razvoja i klijanja zrna (Douliez et al., 2000).

Lipidi žitarica dijele se u dvije osnovne kategorije: nepolarne i polarne lipide. Nepolarni lipidi uglavnom obuhvaćaju trigliceride, digliceride, monogliceride, slobodne masne kiseline, sterole i lipofilne pigmente poput karotenoida i tokoferola, a polarne lipide čine glikolipidi i fosfolipidi (Morrison, 1988; Marion, Dubreil i Douliez, 2003). Histološki gledano, nepolarni lipidi primarno su koncentrirani u klici i aleuronskom sloju, gdje tvore prirodne kapljice ulja oleosome ili uljna tijela, prekrivene jednostrukim slojem fosfolipida i proteina. Suprotno tome, škrobni endosperm sastoji se dominantno od polarnih lipida. Neškrobni lipidi endosperma

sadrže približno 40% nepolarnih lipida, 30% glikolipida i 30% fosfolipida (Marion, Dubreil i Douliez, 2003).

Posebnu skupinu čine takozvani unutrašnji ili škrobni lipidi, koji su čvrsto vezani unutar samih škrobnih zrnaca i oni izravno utječu na fizikalno-kemijska svojstva i bubrenje škroba. Ovi lipidi sastoje se gotovo isključivo od monoaciliranih fosfolipida, pri čemu dominira lizofosfatidilkolin (lizolecitin), te slobodnih masnih kiselina (Morrison, 1988; Marion, Dubreil i Douliez, 2003). Osim staničnih lipida endosperma i klice, zrno žitarica obavijeno je specifičnim hidrofobnim kutikularnim slojevima koje čine kutin i voskovi. Ovi slojevi prekrivaju vanjski perikarp, ali se nalaze i na graničnim površinama između aleurona, klice i škrobnog endosperma. Njihova je biološka uloga ključna u regulaciji difuzije vode kroz tkiva zrna (Marion, Dubreil i Douliez, 2003).

Jedan dio lipida u zrnu je povezan s proteinskom frakcijom u tzv. lipoproteine. Unutar zrna žitarica identificirane su dvije glavne porodice albuminskih proteina bogatih cisteinom koji stupaju u specifične interakcije s lipidima: proteini za prijenos lipida (LTP; engl. Lipid Transfer Proteins) i puroindolini (Douliez et al., 2000; Marion, Dubreil i Douliez, 2003). Proteini za prijenos lipida sveprisutni su biljni proteini koji olakšavaju međumembranski prijenos polarnih lipida (Kader, 1996; Douliez et al., 2000). U zrnu pšenice i ječma koncentrirani su prvenstveno u aleuronskom sloju. Za razliku od LTP-a, puroindolini ne vežu pojedinačne monomere lipida u unutrašnju šupljinu, već stupaju u interakciju isključivo s lipidnim agregatima (micelama i dvoslojevima) (Dubreil, Compoint i Marion, 1997).

2.3.3. Mineralne tvari

Mineralne tvari čine relativno mali udio u zrnu žitarica i čine približno 1,5 do 2,5% suhe tvari zrna te uključuju različite makro- i mikroelemente. Na njihov ukupni sadržaj i sastav utječe niz faktora, uključujući svojstva tla, klimatske uvjete i agrotehničke mjere. Općenito, minerali se unutar zrna obiju žitarica uglavnom koncentrirani u vanjskim slojevima: klici, perikarpu i aleuronskom sloju. Tako se u pšenici čak 61% ukupnih minerala nalazi u aleuronskom sloju, dok u ječmu aleuronska podfrakcija sadrži najviše koncentracije magnezija (Mg). Klica ječma pak pokazuje visoku koncentraciju mangana (Mn) s udjelom većim od 30%, dok je raspodjela bakra (Cu), cinka (Zn) i željeza (Fe) znatno veća na ventralnoj nego na dorzalnoj strani zrna (Arendt i Zannini, 2013; Newman i Newman, 2008). Glavni makroelementi u pšenici i ječmu su fosfati i sulfati kalija (K), magnezija (Mg) i kalcija (Ca), s tim da je u ječmu obilno zastupljen i silicij (Si), posebice u pljevici, ali i u škrobu. Među mikroelementima u objema se žitaricama

kao glavni predstavnici ističu Fe, Mn, Zn i Cu, uz prisutnost brojnih drugih elemenata u tragovima (Arendt i Zannini, 2013).

Unatoč njihovoj prisutnosti, ljudi i drugi monogastrični organizmi slabo iskorištavaju minerale iz žitarica zbog unutarnjih i vanjskih faktora koji smanjuju njihovu apsorpciju u probavnom sustavu. Prehrambena vlakna i određene aminokiseline te proteini djeluju kao kelatori minerala, čime ograničavaju njihovu bioraspoloživost vezanjem, razrjeđivanjem ili zarobljavanjem unutar čestica vlakana. Komponente vlakana pšenice i drugih žitarica, poput hemiceluloze, celuloze i lignina, značajno utječu na to vezanje. Primjerice, lignin može vezati velike količine Ca, Zn, Fe i Mg, dok celuloza veže samo male količine. Uz komponente vlakana, ključni antinutritivni čimbenik, posebice u ječmu, jest fosfor (P), koji je s nutricionističkog stajališta najvažniji element. U zrnu ječma fosfor je uglavnom lokaliziran u klici i aleuronskom tkivu u obliku fitinske kiseline što predstavlja 65–75% ukupnog fosfora u zrnu. Zbog svoje sposobnosti stvaranja kelata s ionima metala kao što su Ca, Cu, Fe i Zn, fitinska kiselina ima izrazitu antinutritivnu ulogu (Arendt i Zannini, 2013; Shewry i Hey, 2015; Baik i Ullrich, 2008).

2.3.4. Šećeri i oligosaharidi

U zrnu pšenice i ječma slobodni, niskomolekularni topljivi šećeri čine relativno mali udio ukupne suhe tvari (1-3%). Njihov sadržaj i sastav ovise o vrsti, genotipu, stupnju razvoja i zrelosti zrna te uvjetima uzgoja. Među najzastupljenijim slobodnim šećerima zrelog zrna nalazi se saharoza, dok su glukoza, fruktoza i maltoza u pravilu prisutne u manjim količinama. Osim navedenih šećera, u zrnu se mogu pronaći i oligosaharidi, među kojima se ističu rafinoza i stahioza, kao i fruktani, koji predstavljaju zasebnu skupinu neškrobnih ugljikohidrata (Henry, 1988; MacLeod and Preece, 1954).

Saharoza ima važnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata tijekom razvoja zrna jer predstavlja glavni oblik ugljika koji se iz fotosintetski aktivnih organa biljke transportira prema različitim nefotosintetskim organima, uključujući zrno. Nakon što se dopremi u zrno, saharoza se metabolički razgrađuje, a nastali ugljikovi spojevi koriste se u sintezi škroba i drugih komponenti zrna (Kumar, Mukherjee and Ayele, 2018). Tijekom sazrijevanja zrna mijenjaju se koncentracije pojedinih slobodnih šećera, pri čemu se značajan dio topljivih ugljikohidrata usmjerava prema sintezi skladišnih polisaharida (LaBerge, MacGregor and Meredith, 1973).

Posebnu skupinu topljivih ugljikohidrata čine oligosaharidi rafinoznog tipa, među kojima se u žitaricama najčešće navode rafinoza i stahioza, te fruktani. Fruktani su ugljikohidrati sastavljeni

pretežno od fruktoznih jedinica, a obuhvaćaju oligomere i polimere različitog stupnja polimerizacije i strukturne organizacije. Stoga ih nije opravdano poistovjećivati isključivo s kratkolančanim fruktooligosaharidima (MacLeod and Preece, 1954; Verspreet et al., 2015).

Sadržaj i sastav ugljikohidrata mijenjaju se tijekom klijanja i sladovanja žitarica. Nakon upijanja vode aktiviraju se metabolički procesi u klici te dolazi do sinteze i aktivacije enzima koji sudjeluju u mobilizaciji rezervnih tvari. U razgradnji škroba najvažniju ulogu imaju amilolitički enzimi pri čemu se dio škroba pretvara u dekstrine i oligosaharide, a dolazi i do oslobađanja maltoze s nereducirajućih krajeva škrobnih lanaca. Zbog toga tijekom klijanja dolazi do povećanja sadržaja maltoze, koja predstavlja jedan od glavnih produkata amilolitičke razgradnje škroba. Uz maltozu nastaju i glukoza, maltotrioza te različiti dekstrini, pri čemu njihov relativni udio ovisi o aktivnosti pojedinih enzima i stupnju klijanja. Nastali šećeri osiguravaju energiju zrnu u fazi klijanja, a tijekom daljnje prerade slada prelaze u sladovinu i služe kao važni supstrati za alkoholnu fermentaciju kvascima (Gupta, Abu-Ghannam and Gallaghar, 2010; De Schepper and Courtin, 2024).

Slobodni šećeri imaju važnu tehnološku ulogu i u pekarstvu jer tijekom fermentacije pšeničnog tijesta šećeri prisutni u brašnu, kao i oni nastali enzimskom razgradnjom škroba, predstavljaju supstrat za metabolizam pekarskog kvasca (Sahlström, Park and Shelton, 2004). Tijekom pečenja šećeri sudjeluju u reakcijama neenzimskog posmeđivanja, naročito Maillardovim reakcijama, koje uključuju reakciju reducirajućih šećera s amino-spojevima. Te reakcije pridonose razvoju boje kore i karakterističnih aromatskih spojeva pekarskih proizvoda (Verspreet et al., 2015).

2.3.5. Neškrobni polisaharidi

Neškrobni polisaharidi u žitaricama predstavljaju ključnu komponentu prehrambenih vlakana, značajno utječući na nutritivnu vrijednost i funkcionalna svojstva žitarica. Ovi polisaharidi uključuju celulozu, hemiceluloze (poput arabinoksilana), β-glukane, pektine, gume i voskove. Njihova prisutnost i struktura variraju među različitim vrstama žitarica, što utječe na njihova funkcionalna svojstva i nutritivnu vrijednost. Stanične stijenke vanjskih dijelova zrna su debele, hidrofobne i uglavnom građene od celuloze i složenih ksilana, ali općenito sadrže i značajnu količinu lignina. U tkivima endosperma stanične stijenke čine 2–7%, tanke su i hidrofilne te su uglavnom građene od dvaju polimera: arabinoksilana i β-glukana, čiji udjeli mogu značajno varirati ovisno o vrsti žitarice. Na primjer, pšenica je bogata arabinoksilanima, dok ječam sadrži visoke razine β-glukana. Osim toga, u tim su stijenkama zabilježene i male količine drugih

polimera kao što su glukomanan (2–7%), celuloza (2–4%) i strukturni proteini. (Saulnier i sur., 2007).

U žitaricama, celuloza čini osnovnu komponentu staničnih stijenki vanjskih dijelova zrna, pružajući čvrstoću i stabilnost biljnim tkivima. Njena linearna struktura, sastavljena od molekula glukoze povezanih β-(1→4)-glikozidnim vezama, omogućuje formiranje snopova stabiliziranih vodikovim vezama, što rezultira njezinom netopljivošću i neprobavljivošću (Saulnier i sur., 2007). U prehrani, kao ključna komponenta (netopljivih) prehrambenih vlakana, doprinosi povećanju volumena stolice i ubrzavanju prolaza hrane kroz probavni sustav, što pomaže u prevenciji opstipacije i održavanju zdravlja crijeva. Iako kemijski nije polisaharid, važno je spomenuti i lignin, kompleksni, trodimenzionalni aromatski polimer građen od fenolnih alkohola koji se nalazi u staničnim stijenkama, gdje pruža mehaničku čvrstoću i otpornost. U zrnu pšenice i ječma on je kovalentno vezan za hemicelulozu (arabinoksilane), stvarajući čvrste ligninsko-ugljikohidratne komplekse. U omotaču zrna ga ima svega 1-3%, ali u pljevici se njegov udio kreće od 15 do 25%. U staničnim stijenkama zrna žitarica nalaze se i male količine pektina (do 1%) (Olkku i sur., 2005):

Arabinoksilani se sastoje od linearnog ksilanskog lanca na koji su bočno vezane jedinice arabinoze. Arabinoksilani u endospermu pšenice sastavljeni su isključivo od arabinoze i ksiloze te se stoga često nazivaju pentozanima. Prevladavaju u staničnim stijenkama endosperma većine žitarica, uključujući pšenicu (60–70%), dok ih je u zobi i ječmu mnogo manje (~20%) (Rakha i sur, 2012). Nalaze se u obliku vodotopljivih i netopljivih frakcija. Njihova izražena sposobnost vezanja vode značajno utječe na hidrataciju brašna i reološka svojstva tijesta, a količina i stupanj supstitucije arabinozom ovise o genotipu i distribuciji unutar pojedinih tkiva zrna (Saulnier i sur., 2007). U prehrani, arabinoksilani imaju pozitivan učinak na zdravlje probavnog sustava. Topljivi arabinoksilani fermentiraju u debelom crijevu, proizvodeći kratkolančane masne kiseline koje djeluju prebiotički i potiču rast korisnih bakterija. Osim toga, pomažu u snižavanju razine glukoze u krvi i kolesterola, smanjujući rizik od dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti (Nemes i sur., 2022).

β-glukani su linearni polisaharidi građeni od glukoznih jedinica povezanih naizmjenično β-(1→3)- i β-(1→4)-glikozidnim vezama, pri čemu upravo ta miješana povezanost lancu daje karakterističnu, djelomično savitljivu konformaciju različitu od celuloze. U ječmu su β-glukani ponajprije koncentrirani u staničnim stijenkama endosperma i aleuronskog sloja, a njihova količina, molekulska masa i stupanj razgranatosti određuju sposobnost vezanja vode i viskoznost vodenih otopina (Li i sur., 2016). U staničnim stijenkama endosperma ječma su

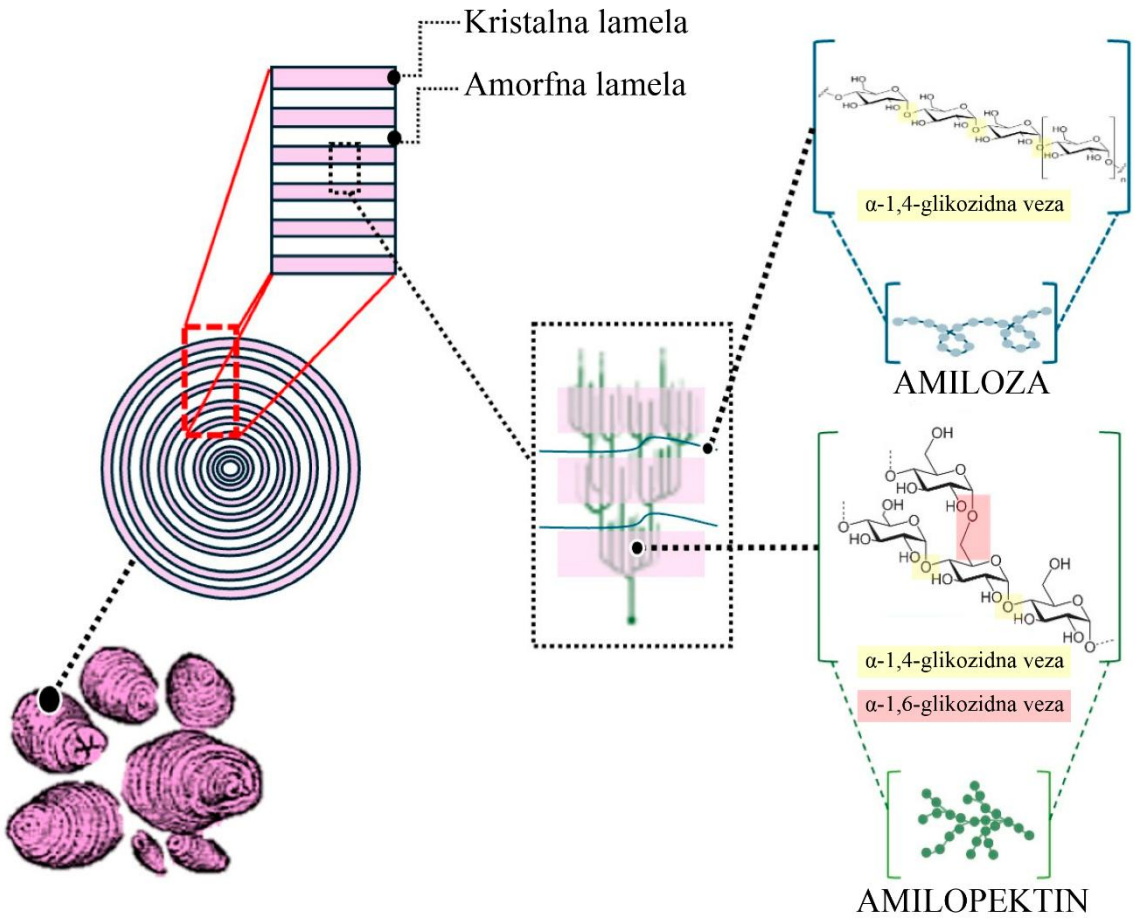
prisutni u značajnim količinama (~75%), dok ih je u stijenkama endosperma pšenice mnogo manje(~20%) (Stone, 2006). Upravo zbog toga relativno visok udio β-glukana u ječmu predstavlja tehnološki izazov s oprečnim učincima: s nutricionističkog gledišta povećava vrijednost ječma kao izvora topljivih prehrambenih vlakana, dok s aspekta sladarske proizvodnje zahtijeva odgovarajuću enzimsku razgradnju. Tijekom klijanja aktiviraju se β-glukanaze koje hidroliziraju stanične stijenke endosperma, čime se omogućuje bolja dostupnost škroba i proteina amilolitičkim i proteolitičkim enzimima, dok nedovoljna razgradnja β-glukana, s druge strane, povećava viskoznost sladovine, otežava filtraciju tijekom pivarske proizvodnje i smanjuje učinkovitost izdvajanja ekstrakta (Gupta i sur., 2010).

2.3.6. Škrob

Škrob (**Slika 3**) nije jedinstvena molekula, već mješavina dvaju strukturno različitih glukanskih polimera, amiloze i amilopektina, koji zajedno grade djelomično kristalnu, odnosno kristaliničnu škrobnu granulu (Hii i sur., 2012; Tester i sur., 2004a). Amiloza je pretežno linearan polimer sastavljen od D-glukopiranoznih jedinica povezanih α-(1→4)-glikozidnim vezama i, iako se smatra linearnom molekulom, sadrži i mali udio (~0,1%) α-(1→6)-veza, pri čemu su bočni ogranci nešto kraći nego kod amilopektina (Hii i sur., 2012). Stupanj polimerizacije (DP, engl. D*egree of Polymerization*) amiloze u pšenici i ječmu iznosi do približno 1500 glukoznih jedinica, što odgovara molekulskoj masi reda veličine 10^5 do 10^6 g/mol (Bertoft, 2017). Zbog linearne građe amiloza u prisutnosti vode lako formira jednostruke ili dvostruke uzvojnice, što joj daje sposobnost vezanja nepolarnih molekula (poput lipida, viših masnih kiselina i joda) u komplekse te pogoduje brzoj reasocijaciji i retrogradaciji nakon toplinske obrade (Bertoft, 2017; Zhu, 2017). U nativnom škrobu pšenice i ječma udio amiloze iznosi 25 do 30% ukupnog škroba, premda mutacije gena za sintezu škroba mogu značajno promijeniti taj odnos. Tako voštani (engl. *waxy*) kultivari sadrže manje od 1% amiloze, dok visokoamilozni kultivari mogu sadržavati više od 50 do 70% amiloze (Bertoft, 2017; Zhu, 2017).

Amilopektin je, za razliku od amiloze, jedna od najvećih poznatih molekula u prirodi, prosječnog stupnja polimerizacije reda veličine 10^5 do 10^6 i molekulske mase od 10^7 do 10^8 g/mol (Bertoft, 2017; Tester i sur., 2004a). Riječ je o izrazito razgranatom polimeru u kojem su D-glukozne jedinice u osnovnom lancu povezane α-(1→4)-glikozidnim vezama, dok točke grananja čine α-(1→6)-glikozidne veze, koje predstavljaju približno oko 5% ukupnog broja glikozidnih veza u molekuli. Ogranci amilopektina nisu raspoređeni nasumično, već su

organizirani u klastere razmaknute otprilike 9 nm, što predstavlja univerzalno strukturno obilježje škroba neovisno o botaničkom podrijetlu (Bertoft, 2017; Hii i sur., 2012). Unutar te klaster-strukture razlikuju se tri tipa lanaca: A-lanci, koji nisu supstituirani na C6 poziciji i predstavljaju vanjske, nerazgranate ogranke; B-lanci, koji nose jedno ili više α-(1→6)-grananja te povezuju više klastera; i C-lanac, jedinstveni lanac koji nosi jedini reducirajući kraj cijele molekule (Hii i sur., 2012; Hizukuri, 1986; Bertoft, 2017). Prosječna duljina A- i B1-lanaca (DP 6 do 36) omogućuje stvaranje stabilnih dvostrukih spirala koje se organiziraju u kristalinične lamele unutar škrobne granule, čime amilopektin izravno određuje stupanj kristalnosti i temperaturu želatinizacije škroba (Hizukuri, 1986; Tester i sur., 2004a).



Slika 3 Građa škrobne granule i struktura škroba. Prilagođeno prema Arruda i sur. (2025), uz uvjete licence Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Udio amilopektina u većini škrobova namijenjenih preradi u glukozne sirupe iznosi između 75 i 85 %, dok u prirodi taj udio varira ovisno o botaničkom podrijetlu i genotipu. Omjer amiloze i amilopektina predstavlja temeljnu determinantu fizikalno-kemijskih, reoloških i termičkih svojstava škroba, uključujući sposobnost bubrenja, temperaturu želatinizacije, viskoznost paste te brzinu i opseg retrogradacije (Tester i sur., 2004a; Zhu, 2017).

2.3.6.1 Struktura škrobne granule

Škrobna granula predstavlja hijerarhijski organiziranu, djelomično kristalnu (kristalastu) strukturu s više razina uređenosti, čija se kristalnost kod žitarica kreće od približno 15 do 45%, ovisno o botaničkom podrijetlu i sastavu (Zhu, 2017; Tester i sur., 2004a). Na najvišoj strukturnoj razini granula se sastoji od koncentričnih, naizmjeničnih kristalnih i amorfnih prstenova, debljine reda veličine 100 nm, koji se granaju iz hiluma, mjesta inicijalnog rasta granule (**Slika 3**). Unutar tih prstenova nalaze se pravilne sferične strukture veličine od 20 do 500 nm, sastavljene od naizmjeničnih kristalnih i amorfnih lamela debljine oko 9 do 10 nm. Kristalne lamele odgovaraju bočnim lancima (klasterima) amilopektina, dok amorfne lamele odgovaraju mjestima grananja (Zhu, 2017; Bertoft, 2017).

Ovisno o rasporedu dvostrukih uzvojnica unutar kristalnih lamela, rendgenskom difrakcijom razlikuju se tri glavna polimorfna tipa škrobne kristalnosti: A-tip, karakterističan za škrobove žitarica poput ječma i pšenice (povezan s kraćim lancima amilopektina i gušćim pakiranjem dvostrukih uzvojnica); B-tip, svojstven škrobovima gomolja i podanaka (rizoma) te škrobovima s visokim udjelom amiloze (povezan s dužim lancima i rahlijim pakiranjem); te C-tip, koji predstavlja mješavinu A- i B-tipa i tipičan je za škrobove mahunarki. Dodatno, nakon želatinizacije, a u prisutnosti lipida, može nastati V-tip kristalne strukture, koji odgovara kompleksima amiloze s masnim kiselinama ili monoglicerolima (Zhu, 2017; Bertoft, 2017).

Zrna ječma i pšenice karakterizira bimodalna raspodjela škrobnih granula na veće A-granule (promjera većeg od 10 do 30 μm) u obliku te manje, sferične B-granule (promjera manjeg od 10 μm) (Ao i Jane, 2007; Zhu, 2017). Ove se dvije vrste granula razlikuju ne samo veličinom i oblikom nego i unutarnjom molekularnom strukturom. A-granule sadrže amilopektin s većim udjelom dugih lanaca, dok B-granule sadrže amilopektin s većim udjelom kratkih lanaca, što se odražava na razlike u temperaturi želatinizacije, brzini enzimske razgradnje i tehnološkom ponašanju tijekom sladovanja i mljevenja (Ao i Jane, 2007; Zhu, 2017). Uz amilozu i amilopektin, granule sadrže i manje udjele proteina, lipida (slobodnih i vezanih) te fosfornih spojeva vezanih na C6 poziciju glukoznih jedinica, a njihov udio uvelike varira ovisno o

genotipu i metodi izolacije škroba te izravno utječe na svojstva bubrenja, topljivosti i viskoznosti tijekom kuhanja (Zhu, 2017).

2.3.6.2 Želatinizacija škroba i stvaranje škrobne paste

Želatinizacija je jedno od ključnih funkcionalnih svojstava škrobnih zrnaca koje određuje njihovu primjenu u prehrambenoj industriji. Prerada škrobnih sirovina obično uključuje narušavanje strukturnog reda unutar zrnaca tijekom zagrijavanja u vodi. To narušavanje molekularnog reda unutar škrobnih zrnaca dovodi do nepovratnih promjena, kao što su bubrenje škrobnih zrnaca, taljenje nativnih kristala, gubitak birefringencije i otapanje škroba. Navedene promjene dovode do povećanja viskoznosti medija te se nazivaju želatinizacija (Atwell i sur.,1988; Horstmann, Lynch, i Arendt, 2017). Stoga se želatinizacija škroba može promatrati kao složeni endotermni i ireverzibilni fizikalno-kemijski proces koji se odvija kada se vodena suspenzija škrobnih granula zagrijava iznad kritične temperature, često nazvane temperatura želatinizacije (T_g). Želatinizacija ovisi o visokom unosu energije, a rezultira potpunim kolapsom i gubitkom uređenosti nativnih kristalastih lamela unutar škrobne granule (Matignon i Tecante, 2017).

Na molekularnoj razini zagrijavanje u prisutnosti vode najprije uzrokuje prodiranje molekula vode u amorfna područja granule, što dovodi do njihova bubrenja i hidratacije (Wang i sur., 2015). Pri zagrijavanju škrobne suspenzije amiloza izlazi iz škrobnih zrnaca u međugranularni prostor. Izlučivanje amiloze i povećano bubrenje granula dovode do povećanja viskoznosti škrobne suspenzije. Željeno svojstvo zgušnjavanja postiže se kada škrobno zrnce dosegne najveći stupanj bubrenja, ali još nije narušeno. Temperatura pri kojoj škrobna zrnca počinju bubriti naziva se temperatura želatinizacije (Atwell i sur.,1988; Horstmann, Lynch, i Arendt, 2017).

Dodatno zagrijavanje ili djelovanje smicanja u fazi maksimalno nabubrenih škrobnih granula dovodi do njihova razaranja, odnosno prekida vodikovih veza između polimernih lanaca (**Slika 4**). Tada nastaje disperzija amiloze, amilopektina i fragmenata škrobnih granula, što rezultira smanjenjem viskoznosti škrobne paste. Točka između maksimalnog bubrenja i narušavanja strukture škrobnih zrnaca koje dovodi do smanjenja viskoznosti naziva se maksimalna ili vršna viskoznost (PV; engl. *Peak viscosity*).

Atwell i sur. (1988) predložili su razlikovanje procesa razvoja viskoznosti i stvaranja škrobne paste (engl. *pasting*) od želatinizacije te su razvoj viskoznosti definirali kao pojave koje slijede nakon želatinizacije tijekom otapanja škroba. Taj proces uključuje bubrenje škrobnih zrnaca i

njihovo konačno potpuno narušavanje. Ipak, razvoj viskoznosti ne može odvojiti od želatinizacije, već se može opisati kao preklapanje tih pojava. Stoga se u znanstvenoj literaturi pojmovi želatinizacija i razvoj viskoznosti, odnosno stvaranje škrobne paste često rabe naizmjenično (Thomas iAtwell,1988; Horstmann, Lynch, i Arendt, 2017)..

Prilikom mjerenja na rotacijskim viskozimetrima (poput Mikro-viskoamilografa (MVA) ili Rapid viskoanalizatora (RVA), stvaranje škrobne paste se očituje naglim porastom viskoznosti do maksimalne vrijednosti (PV). Nastavkom zagrijavanja i miješanja pri povišenoj temperaturi (oko 95 °C) nabubrene škrobne granule pucaju i dezintegriraju se pod utjecajem smicanja, pri čemu se izlučuje dodatna amiloza, a viskoznost opada do minimalne vrijednosti (Matignon i Tecante, 2017; Hii i sur., 2012)

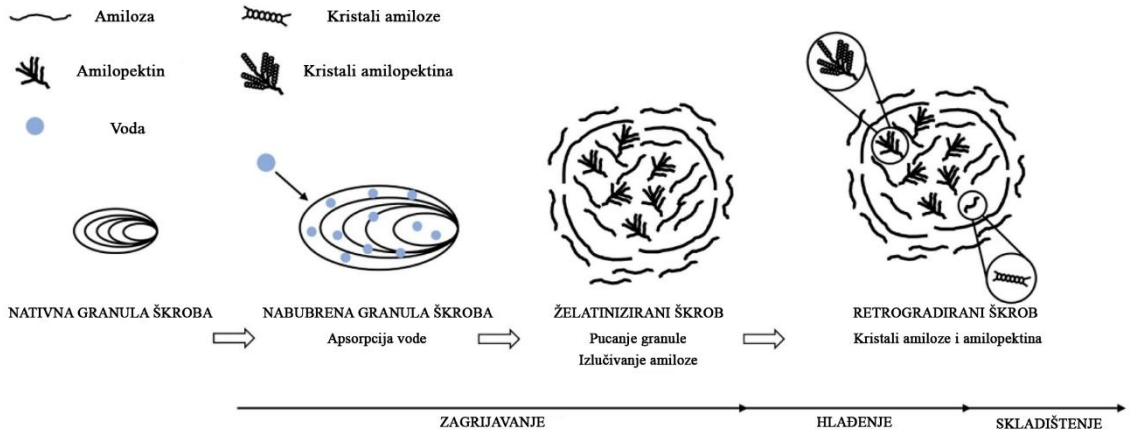
Također, treba napomenuti da je škrob u suhom zrnu otporan na djelovanje amilolitičkih enzima pri sobnoj temperaturi. Međutim, zagrijavanjem škrobne suspenzije iznad temperature želatinizacije (oko 55 do 65 °C za pšenicu i ječam), škrobne granule nabubre i oslabe svoju kristalnu rešetku, čime postaju izrazito podložne brzoj enzimskoj hidrolizi. U uzorcima s visokom amilolitičkom aktivnosšću (poput sladnog brašna), hidrolitičko cijepanje α-(1→4)-glikozidnih veza odvija se paralelno s bubrenjem granula, uzrokujući dramatičan pad maksimalne viskoznosti (PV) (Hii i sur., 2012). Osim toga, bimodalna distribucija škroba kod ječma i pšenice također ima presudan utjecaj na želatinizaciju, što je posebno vidljivo u različitoj podložnosti A- i B-granula prema enzimskoj hidrolizi. Zbog veće specifične površine i prisutnosti površinskih pora i kanala, male B-granule pokazuju bržu inicijalnu adsorpciju amilaza, dok velike A-granule pružaju veći hidrodinamički otpor i dominantno određuju maksimalnu viskoznost u odsustvu enzimske degradacije (Lindeboom Chang, i Tyle, 2004; Shao i sur., 2019).

Fizikalna dinamika želatinizacije i stvaranja škrobne paste izravno ovisi o udjelu prisutne vode u sustavu škrob-voda, pri čemu razlikujemo tri karakteristična režima: s visokim udjelom vode (>60%), niskim udjelom vode (<30%) i umjerenim udjela vode (30-60%) (Donovan, 1979; Matignon i Tecante, 2017). U režimu s visokim udjelom vode proces je izrazito intenzivan. Voda ulazi u amorfne slojeve koji intenzivno bubre i stvaraju snažan destabilizirajući pritisak na susjedne kristalne lamele. To dovodi do destabilizacije i taljenja kristala u dva odvojena koraka.: najprije dolazi do fizikalnog razdvajanja kristalnih lamela, a zatim do disocijacije dvostrukih uzvojnica amilopektina (Waigh i sur., 2000; Matignon i Tecante, 2017). Ovaj proces prati potpuni gubitak birefringencije i nestanak tzv. polarizacijskog malteškog križa (Cooke i Gidley, 1992). U režimu s niskim udjelom vode bubrenje je u potpunosti onemogućeno.

Destabilizacija kristalastih područja odvija se u jednom koraku pri znatno višim temperaturama, pri čemu se kristalne domene tale izravno u amorfne lance pod utjecajem topline (Waigh i sur., 2000; Matignon i Tecante, 2017). Režim umjerenog udjela vode predstavlja intermedijarno stanje u kojem se proces također odvija u dva koraka, pri čemu prvi predstavlja djelomično taljenje u prisutnosti slobodne vode, a drugi naknadno taljenje preostalih kristalnih domena pod utjecajem ograničene hidratacije (Donovan, 1979; Matignon i Tecante, 2017).

2.3.6.3 Retrogradacija

Retrogradacija škroba (**Slika 4**) fizikalni je proces reorganizacije i reasocijacije razgrađenih polimernih lanaca amiloze i amilopektina iz amorfnog stanja u stabilnu uređenu strukturu tijekom hlađenja i skladištenja vruće škrobne paste (Wang i sur., 2015; Matignon i Tecante, 2017). Retrogradacija škrobnih pasta ili otopina može dovesti do povećanja viskoznosti, zamućenja, taloženja netopljivih čestica škroba te izdvajanja vode iz paste, odnosno sinereze (Horstmann, Lynch, i Arendt, 2017). Ovaj proces obuhvaća dvije vremenski i strukturno odvojene faze, kratkoročnu i dugotrajnu retrogradaciju.



Slika 4 Prikaz želatinizacije i retrogradacije škroba. Prilagođeno prema Chen i sur. (2024), uz uvjete licence Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Kratkoročna retrogradacija odvija se vrlo brzo, unutar nekoliko sati nakon hlađenja paste. Budući da je amiloza linearan polimer, njezini se lanci u otopini brzo poravnavaju i formiraju paralelne dvostruke uzvojnice od 40 do 70 glukoznih jedinica stabilizirane intermolekularnim vodikovim vezama, što dovodi do stvaranja kristalne strukture (Jane i Robyt, 1984; Leloup i

sur., 1992). Ova faza retrogradacije odvija se unutar nekoliko sati, a rezultat je stvaranje čvrstog, elastičnog gela. Dugotrajna retrogradacija odnosi se na retrogradaciju amilopektina i odvija se vrlo sporo, tijekom nekoliko dana ili tjedana. Zbog svoje razgranate strukture i prostornih prepreka bočni lanci amilopektina sporije se reasociraju u dvostruke uzvojnice i kristalne domene B-tipa (promjera oko 15 glukoznih jedinica) (Ring i sur., 1987; Hoover, 2001). Retrogradacija je najintenzivnija neposredno nakon želatinizacije te se s produljenjem vremena skladištenja postupno usporava. Također, ubrzana je pri temperaturama između 0 i 5 °C, što je razlog zašto se retrogradacija često povezuje sa bržim starenjem pekarskih proizvoda, ako se čuvaju hladnjaku. Više temperature, poput sobne, usporavaju stvaranje kristalnih struktura (Wang i sur., 2015).

Rekristalizacija amilopektina najizraženija je kod lanaca duljine DP 14–24, dok lanci kraći od DP 10 ili ekstremno dugi lanci ne pogoduju retrogradaciji (Wang i sur., 2015). Zbog toga B-granule škroba pokazuju znatno manju sklonost retrogradaciji u odnosu na velike A-granule, budući da B-granule sadrže veći udio kratkih lanaca amilopektina (Ao i Jane, 2007). Mali molekularni fragmenti amilopektina oslobođeni tijekom želatinizacije mogu ojačati mrežu gela, dok velike molekule amilopektina prostorno ograničavaju otpuštanje dugih amiloznih lanaca, čime slabe gel (Gong i sur., 2024; Ulbrich i sur., 2023). Škrobovi s višim sadržajem amiloze imaju veću sklonost retrogradaciji, jer linearne molekule amiloze brže formiraju dvostruke uzvojnice. Škrobovi bogati amilopektinom, poput voštanih škrobova, sporije retrogradiraju zbog razgranatosti svojih molekula (Hoover, 2001).

Opseg i brzina retrogradacije snažno ovise o sadržaju vode u sustavu, pri čemu se maksimum retrogradacije postiže pri sadržaju vode od približno 40 do 45%. Izvan tog optimuma retrogradacija je ograničena, pa tako pri sadržaju vode ispod približno 20% ili iznad 90% rekristalizacija amilopektina u pravilu izostaje, dok je pri niskim i srednjim razinama vode (60 do 80%) njezin opseg dodatno moduliran udjelom amiloze, budući da amiloza olakšava reorganizaciju amilopektinske mreže (Wang i sur., 2015).

Amilolitički enzimi značajno reduciraju retrogradaciju. Enzimskom hidrolizom dugih lanaca amiloze i vanjskih ogranaka amilopektina nastaju kratki dekstrini niske molekulske mase koji gube sposobnost reasocijacije u dvostruke uzvojnice (Jukić i sur., 2023). Na intenzitet retrogradacije mogu utjecati i različite tvari koje se prirodno nalaze u brašnu ili se dodaju kao aditivi u recepturama za proizvodnju pekarskih proizvoda. Šećeri inhibiraju retrogradaciju jer vežu vodu, čime smanjuju njezinu dostupnost za formiranje vodikovih veza između molekula škroba. Na sličan način djeluju i prehrambena vlakna, poput β-glukana, koja usporavaju

retrogradaciju jer kompetitivno vežu slobodnu vodu i stvaraju fizičku barijeru, gustu mrežu koja onemogućuje kretanje i poravnavanje škrobnih polimera (Li i sur., 2016; Satrapai i Suphantharika, 2007). Lipidi, osobito lizofosfolipidi i slobodne masne kiseline, mogu stvarati komplekse s amilozom (V-tip kristalne rešetke) i smanjiti mogućnost retrogradacije. Nadalje, zbog natjecanja lipida u stvaranju veza sa škrobom, stvaranje lipidno-škrobnih kompleksa mijenja molekularnu strukturu škroba i sprječava formiranje vodikovih veza između molekula amilopektina. Osim toga, poznato je da su kompleksi amiloze i lipida otporni na enzimsku razgradnju, pa stvaranje tih kompleksa može povećati udio rezistentnog škroba u hrani bogatoj škrobom (Mariscal-Moreno i sur., 2017).

Retrogradacija ima značajan utjecaj na teksturu i stabilnost prehrambenih proizvoda. Ovaj proces često može biti koristan, ali s druge strane nerijetko predstavlja izazov. Retrogradirana amiloza ima važnu ulogu u teksturi proizvoda kao što su želei, pudinzi i gotova jela, u kojima je poželjna stabilna struktura (Tester, Karkalas i Qi, 2004; Hoover, 2010). Jedna od negativnih posljedica retrogradacije jest izlučivanje vode iz gela, pojava poznata kao sinereza. Ovaj fenomen smanjuje kvalitetu proizvoda poput umaka, juha i pudinga tijekom. Dugotrajna retrogradacija amilopektina glavni je uzrok starenja pekarskih proizvoda te uzrokuje postupan gubitak svježine i stvrdnjavanje sredine kruha (Karim i sur., 2000).

Retrogradacija škroba koristi se i za proizvodnju rezistentnih škrobova, koji se funkcionalno smatraju prehrambenim vlaknima, imaju sniženu probavljivost i smanjuju glikemijski indeks proizvoda. Prehrambena industrija primjenjuje različite strategije za kontrolu retrogradacije, uključujući izbor škroba s niskim udjelom amiloze, dodavanje aditiva poput šećera i lipida te optimizaciju temperature skladištenja. Modificirani škrobovi, koji su kemijski ili fizički tretirani, također se upotrebljavaju kako bi se smanjila sklonost retrogradaciji (Walsh i sur., 2022; Singh, Kaur i McCarthy, 2007).

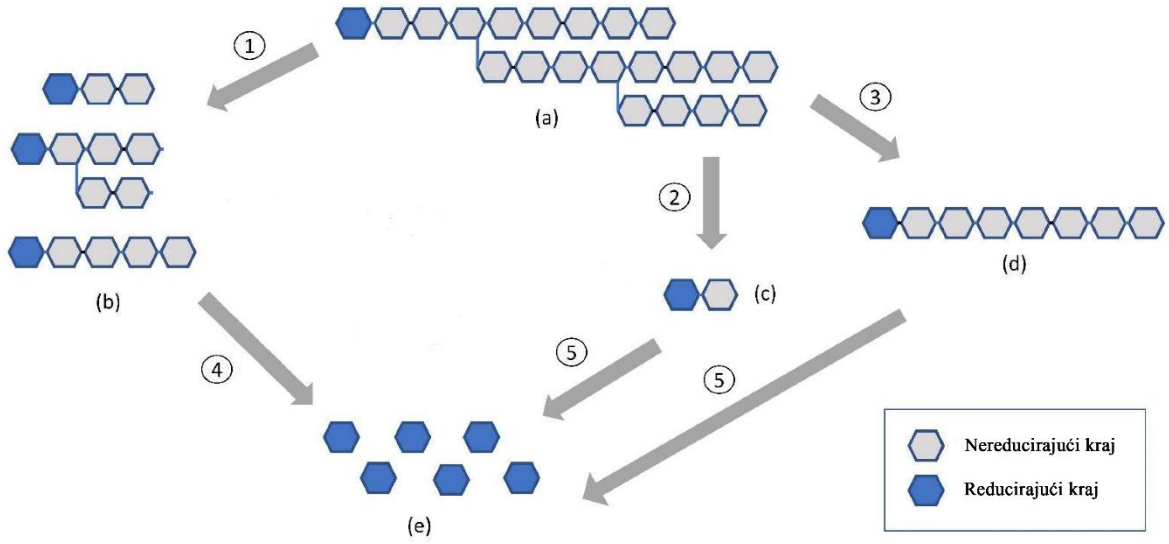
2.4. Enzimski sustav zrna ječma i pšenice

Uz kemijski sastav, enzimski sustav zrna predstavlja drugu ključnu determinantu tehnološke kvalitete pšenice i ječma, budući da upravo enzimska aktivnost određuje brzinu i opseg mobilizacije rezervnih tvari tijekom klijanja, a time i kakvoću slada, brašna i finalnih prehrambenih proizvoda. Zrelo zrno žitarica karakterizira izrazito nizak metabolički intenzitet, no s početkom klijanja u klici se pokreće hormonski kontrolirana (giberelinska) signalna kaskada koja mobilizira nekoliko funkcionalno različitih enzimskih skupina odgovornih za

razgradnju pohranjenih zaliha ugljikohidrata, proteina i lipida (Guzmán-Ortiz i sur., 2019). Enzimi prisutni u zrelom i proklijalom zrnu mogu se prema svojoj funkciji i supstratnoj specifičnosti svrstati u pet glavnih skupina: amilaze, proteaze, lipaze i lipoksigenaze, fitaze i hemicelulaze.

2.4.1. Amilolitički enzimi

S obzirom na način djelovanja na škrobni polimer, amilolitičke enzime uobičajeno je svrstati u četiri temeljne funkcionalne skupine: endoamilaze, koje nasumično cijepaju α-(1→4)-glikozidne veze u unutrašnjosti lanca (α-amilaza); egzoamilaze, koje djeluju isključivo od nereducirajućeg kraja lanca (β-amilaza, α-glukozidaza); enzime za uklanjanje grananja, koji hidroliziraju α-(1→6)-glikozidne veze na mjestima grananja (granična dekstrinaza, pululanaza, izoamilaza); te transferaze, koje ne hidroliziraju, nego prenose glikozidne ostatke uz stvaranje novih veza (npr. amilomaltaza) (**Slika 5**). U zrnu ječma i pšenice fiziološki su prisutne i djeluju prve tri skupine, dok se transferaze pojavljuju tek u kontekstu specifičnih biotehnoloških primjena slada i škrobnih hidrolizata (Hii i sur., 2012; Duke i Henson, 2008; Evans, Li i Eglinton, 2010).



Slika 5 Enzimska hidroliza škroba. Prilagođeno prema Compart i sur. (2023), uz uvjete licence Creative Commons Attribution (CC BY 4.0). ((a) škrob, (b) α-granični dekstrin i jednostavni oligosaharidi, (c) maltoza, (d) linearni oligosaharid, (e) glukoza; (1) α-amilaza, (2) β-amilaza, (3) α-amilaza, (4) granična dekstrinaza i α-glukozidaza, (5) α-glukozidaza.)

Postoji temeljna razlika u podrijetlu i vremenskoj dinamici nastanka i aktivacije amilolitičkih enzima u zrnu. Dok se β-amilaza već nalazi u zrelom zrnu i zahtijeva samo oslobađanje iz proteinskog kompleksa, α-amilaza i granična dekstrinaza nastaju *de novo* sintezom tijekom klijanja, primarno pod utjecajem giberelina sintetiziranih i oslobođenih iz štitčića (Bak-Jensen i sur., 2007; Evans i sur., 2010). Ova je spoznaja ključna za razumijevanje razlika između zrelog pšeničnog zrna, u kojem je α-amilaza prisutna samo u tragovima, osim kod preranog proklijavanja ili pojave tzv. amilaze kasne zrelosti (LMA), i sladnog brašna, u kojem je aktivnost α-amilaze iznimno visoka zbog kontroliranog klijanja (Mares i Mrva, 2014; Kalb i sur., 2020; Duke i Henson, 2008).

2.4.1.1 α-amilaza

α-amilaza (EC 3.2.1.1) katalizira nasumičnu hidrolizu unutarnjih α-(1→4)-glikozidnih veza škrobnog lanca bez značajnijeg neposrednog oslobađanja slobodne glukoze. Primarni produkti enzimske razgradnje škroba uzrokovane djelovanjem α-amilaze jesu maltoza, linearni oligosaharidi (poput maltotrioze) i α-granični dekstrini koji zaostaju zbog nemogućnosti cijepanja α-(1→6)-veza. U ječmu je kodirana s deset gena raspoređenih u dvije multigenske skupine koje daju dva glavna izoenzimska oblika: AMY1 (niska izoelektrična točka, podrijetlom najvećim dijelom iz klice i aleurona tijekom kasnije faze klijanja) i AMY2 (visoka izoelektrična točka, dominantan oblik koji nastaje *de novo* sintezom u aleuronskom sloju pod djelovanjem giberelina te čini glavninu α-amilazne aktivnosti slada) (Bak-Jensen i sur., 2007; Evans i sur., 2010).

Unutar AMY2 skupine dodatno se razlikuju posttranslacijski modificirani podoblici (npr. AMY2-1 i AMY2-2), koji se međusobno razlikuju u afinitetu prema supstratu i brzini djelovanja, a istraživanja na različitim sortama ječma potvrđuju da upravo AMY2 najčešće predstavlja predominantan α-amilazni izoenzim u zrelom sladu. Strukturno, α-amilaza je Ca^{2+}-ovisni metaloenzim u kojem je ion kalcija ključan za održavanje tercijarne strukture i stabilnosti aktivnog mjesta (Saburi i Mori, 2024; Evans i sur., 2010).

2.4.1.2 β-amilaza

β-amilaza (EC 3.2.1.2) hidrolizira α-(1→4)-veze od nereducirajućeg kraja lanca, otpuštajući isključivo maltozu. Budući da ne može zaobići α-(1→6)-točke grananja, njezino se djelovanje na amilopektinu zaustavlja na granicama grana, ostavljajući tzv. β-granični dekstrin. U ječmu je kodirana dvama genima, Bmy1 i Bmy2, pri čemu je Bmy1 znatno jače izražen i smatra se endospermski specifičnim izoenzimom odgovornim za većinu β-amilazne aktivnosti zrelog

zrna (Saburi i Mori, 2024). β-amilaza je najvećim dijelom prisutna u nativnom, neaktiviranom zrnu, vezana disulfidnim mostovima za proteine endosperma, a proteolitičko oslobađanje tijekom rane faze klijanja aktivira postojeću zalihu enzima bez potrebe za opsežnom *de novo* sintezom (Evans i sur., 2010).

2.4.1.3 Granična dekstrinaza

Granična dekstrinaza (EC 3.2.1.142) jedini je amilolitički enzim sposoban hidrolizirati α-(1→6)-glikozidne veze na točkama grananja amilopektina, te je stoga ključan za potpunu razgradnju graničnih dekstrina koje za sobom ostavljaju α- i β-amilaza. U ječmu je kodirana jednim genom čiji promotor sadrži elemente odgovora na giberelinsku kiselinu, zbog čega se njezina ekspresija, slično kao kod α-amilaze, pojačava u aleuronskom sloju tijekom klijanja. Specifičnost ovog enzima očituje se i u tome što se u zrnu djelomično nalazi u neaktivnom obliku, kompleksiran s endogenim proteinskim inhibitorom, što dodatno usporava i regulira ukupnu brzinu uklanjanja grananja škroba tijekom sladovanja (Evans i sur., 2010).

Prema klasifikaciji enzima koji hidroliziraju α-(1→6)-glikozidne veze, biljna granična dekstrinaza pripada skupini takozvanih direktnih enzima za uklanjanje grananja, koji, za razliku od indirektnog enzima amilo-(1→6)-glukozidaze (svojstvenog životinjskom i kvaščevom metabolizmu), mogu izravno hidrolizirati α-(1→6)-vezu na nemodificiranom supstratu (Hii i sur., 2012). Granična dekstrinaza funkcionalno i strukturno je srodna mikrobnim pululanazama tipa I te se od srodnog enzima izoamilaze razlikuje po supstratnoj specifičnosti. Dok pululanaza i granična dekstrinaza najučinkovitije hidroliziraju α-(1→6)-veze u pululanu i amilopektinu, izoamilaza pokazuje znatno veći afinitet prema supstratima s višim molekulskim masama, poput glikogena, dok slabije hidrolizira pululan (Hii i sur., 2012). Ova razlika u specifičnosti objašnjava zašto je upravo granična dekstrinaza, a ne izoamilaza, fiziološki najvažniji enzim za uklanjanje grananja u zrnu žitarica tijekom klijanja.

2.4.1.4 α-glukozidaza

α-glukozidaza (EC 3.2.1.20) egzoenzim je koji katalizira otpuštanje pojedinačnih molekula glukoze s nereducirajućeg kraja kratkih malto-oligosaharida i dekstrina nastalih djelovanjem prethodna tri enzima, čime zaokružuje potpunu enzimsku pretvorbu škroba u fermentabilnu glukozu. Slično α-amilazi i graničnoj dekstrinazi, sintetizira se *de novo* u stanicama aleuronskog sloja pod utjecajem giberelina tek nakon inicijacije klijanja (Evans i sur., 2010; Saburi i Mori, 2024).

2.4.2. Proteolitički enzimi (proteaze i peptidaze)

Proteolitički sustav zrna obuhvaća složenu mrežu endopeptidaza i egzopeptidaza (karboksipeptidaza i aminopeptidaza) koje pripadaju četirima glavnim skupinama proteaza: cisteinskim, serinskim, aspartatnim i metaloproteazama (Guzmán-Ortiz i sur., 2019; Jones, 2005; Zhang & Jones, 1995).

2.4.2.1 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze (C1A i C13 tip) predstavljaju najzastupljeniju i fiziološki najvažniju skupinu proteaza u klijajućem zrnu, odgovornu za čak 80 do 90% ukupne endoproteolitičke aktivnosti (Diaz-Mendoza i sur., 2019; Szewińska i sur., 2016). Sintetiziraju se *de novo* u aleuronskom sloju pod izravnom transkripcijskom indukcijom giberelinske kiseline (GA) posredstvom GAMYB faktora (Panahi i sur., 2026). Među cisteinskim proteazama dominantnu ulogu imaju enzimi papainskog tipa (C1A skupina) te legumainskog tipa (C13 skupina) (Diaz-Mendoza, Diaz i Martinez., 2019; Panahi i sur., 2026). Njihova aktivnost u zrnu regulirana je endogenim proteinskim inhibitorima fitocistatinima (cistatinima), koji sprječavaju preranu ili nekontroliranu proteolizu tijekom razvoja i mirovanja zrna (Szewińska i sur., 2016; Martínez i sur., 2009).

2.4.2.2 Serinske proteaze

Serinske karboksipeptidaze (S10 skupina) i aminopeptidaze djeluju kao egzooenzimi na oligopeptide nastale prethodnim djelovanjem endopeptidaza. Serinske karboksipeptidaze postupno odcjepljuju pojedinačne aminokiseline s C-terminalnog kraja proteinskog lanca, dok aminopeptidaze (poput aleuraina lokaliziranog u vakuolama aleuronskog sloja) djeluju na N-terminalni kraj (Diaz-Mendoza i sur., 2019; Guzmán-Ortiz i sur., 2019). Sinergijskim djelovanjem endo- i egzoproteaza dolazi do akumulacije slobodnih aminokiselina i malih peptida koji pridonose stvaranju slobodnog aminodušika (FAN, engl. *Free Amino Nitrogen*) (Guzmán-Ortiz i sur., 2019; Panahi i sur., 2026).

2.4.2.3 Aspartatne proteaze i metaloproteaze

Aspartatne proteaze (prisutne u šest oblika u zrelom zrnu i četiri u sladu) te metaloproteaze lokalizirane su u aleuronskom sloju i endospermu zelenog cjelovitog slada, gdje sudjeluju u ranoj fazi razgradnje i otapanja proteina (Guzmán-Ortiz i sur., 2019; Jones, 2005; Zhang & Jones, 1995).

2.4.3. Hemicelulolitički i citolitički enzimski sustav

Stanične stijenke endosperma i aleuronskog sloja žitarica predstavljaju primarnu fizikalnu barijeru koja onemogućuje kretanje vode i enzima unutar zrna. Kod ječma dominiraju mješovito povezani β-glukani, dok kod pšenice prevladavaju arabinoksilani (Stone, 2006; Rakha i sur., 2012). Potpuna razgradnja staničnih stijenki endosperma eliminira pojavu tzv. stanične enkapsulacije, omekšava zrno i omogućuje slobodnu difuziju amilaza i proteaza (Guzmán-Ortiz i sur., 2019).

2.4.3.1 β-glukanaze

β-glukanaze obuhvaćaju endo-β-(1→3, 1→4)-D-glukanaze (EC 3.2.1.73) i endo-β-(1→3)-D-glukanaze. Sintetiziraju se *de novo* u aleuronskom sloju i štitčiću nakon namakanja zrna, pod utjecajem giberelina (Panahi i sur., 2026). Njihova aktivnost naglo raste već od 1. dana klijanja, dostižući maksimum između 3. i 4. dana (Guzmán-Ortiz i sur., 2019). Djelovanjem na β-glukanski kostur staničnih stijenki β-glukanaze prevode visokomolekularne, viskozne polisaharide u manje oligosaharide, čime se sadržaj netopljivog β-glukana u ječmu smanjuje za 70 do 80% u odnosu na nesladovano zrno (Guzmán-Ortiz i sur., 2019).

2.4.3.2 Ksilanaze

Ksilanaze/endopentozanaze obuhvaćaju endo-β-(1→4)-D-ksilanaze (EC 3.2.1.32) i pripadajuće enzime uklanjanja grananja (arabinofuranozidaze i feruloil esteraze) koji razgrađuju arabinoksilanski lanac (Guzmán-Ortiz i sur., 2019). U ječmu se razlikuju dva glavna izoenzima: ksilanaza X-I (u štitčiću i aleuronskom sloju tijekom klijanja) i ksilanaza X-II (prisutna u mladim korjenčićima i izdancima). Za razliku od β-glukanaza, aktivnost ksilanaza u prvim danima klijanja izrazito je niska te značajno raste tek između 5. i 8. dana klijanja (Caspers i sur., 2001; Guzmán-Ortiz i sur., 2019). Djelovanje ksilanaza u zrnu dodatno je modulirano prisutnošću endogenih proteinskih inhibitora (TAXI, XIP i TLXI tipa), čija razina opada u kasnijim fazama klijanja (Guzmán-Ortiz i sur., 2019).

2.4.4. Fitaze

Fitaze (myo-inozitol-heksakisfosfat fosfohidrolaze, EC 3.1.3.8 / 3.1.3.26) sintetiziraju se *de novo* i aktiviraju u aleuronskom sloju i štitčiću tijekom namakanja i klijanja (Guzmán-Ortiz i sur., 2019). Fitaza postupno odcjepljuje fosfatne skupine s molekule fitinske kiseline (IP6),

prevodeći je u niže inozitol-fosfate (IP5 do IP1) i slobodni anorganski fosfat potreban za rast klice (Guzmán-Ortiz i sur., 2019; Aslam i sur., 2018).

Aktivnost fitaze u ječmu i pšenici izrazito raste već od prvih dana klijanja. Pri temperaturama od 20 do 25 °C maksimum aktivnosti postiže se 4. dana klijanja (uz 5 do 6 puta višu aktivnost u odnosu na nesladovano zrno), dok pri nižoj temperaturi (15 °C) maksimalna aktivnosti dostiže se 7. dana (Sung i sur., 2005; Guzmán-Ortiz i sur., 2019). Nakon dostizanja maksimuma aktivnost fitaza u kasnijim fazama postupno opada zbog njezine proteolitičke inaktivacije cisteinskim proteazama (Guzmán-Ortiz i sur., 2019).

2.4.5. Lipaze i lipoksigenaze

Iako su lipidi prisutni u relativno malom udjelu, njihov metabolizam tijekom klijanja ima izniman fiziološki i tehnološki značaj.

2.4.5.1 Triacilglicerol lipaze

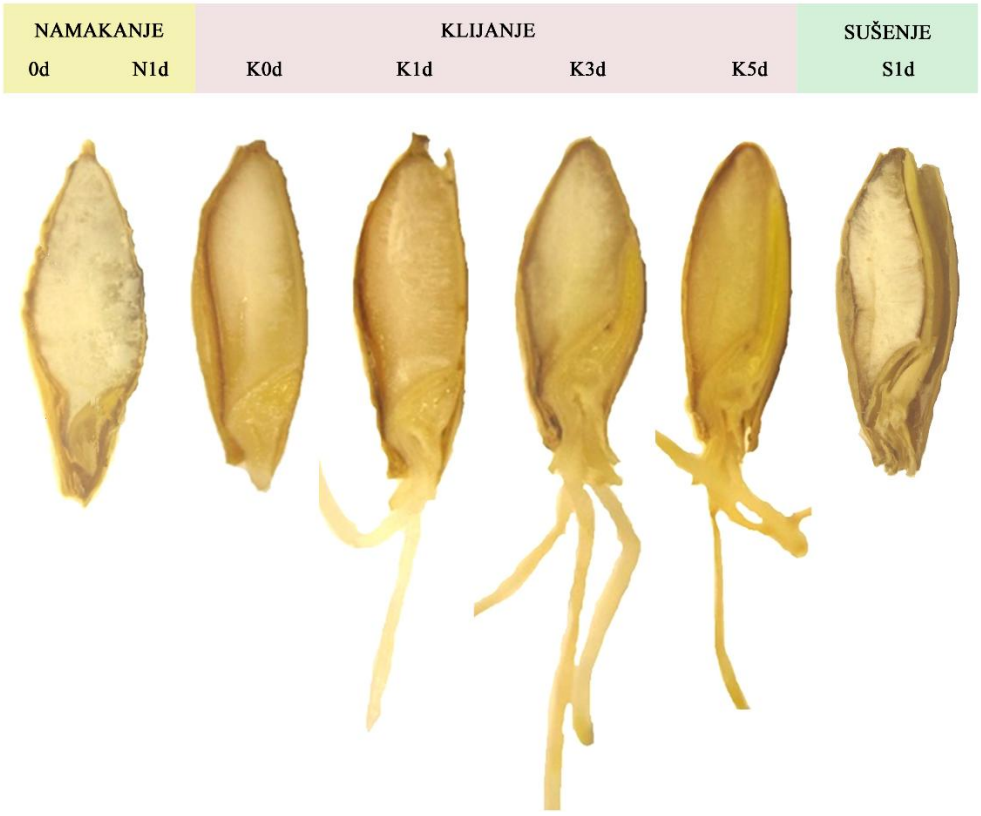
Triacilglicerol lipaze (EC 3.1.1.3) prisutne su ponajprije u klici i aleuronskom sloju, dok su u škrobnom endospermu zastupljene tek u tragovima (Guzmán-Ortiz i sur., 2019; Day, 2004). Lipaze kataliziraju hidrolizu estera u triacilglicerolima, pri čemu nastaju slobodne masne kiseline i glicerol. Budući da se rezerve lipida u klici mobiliziraju prve, prije intenzivne razgradnje škroba, lipaze osiguravaju rani izvor energije za izbijanje klicina korjenčića. Aktivnost lipaza značajno raste s napredovanjem klijanja (kod ječma i do 16 puta nakon 7 dana klijanja) (Guzmán-Ortiz i sur., 2019).

Lipoksigenaze (LOX, EC 1.13.11.12) su enzimi koji kataliziraju dioksigenaciju nezasićenih masnih kiselina koje sadrže cis,cis-1,4-pentadijensku strukturu (prvenstveno linolne i linolenske kiseline) u odgovarajuće hidroperokside (Day, 2004). U ječmu su identificirana dva glavna izoenzima: LOX-1 (lokaliziran u klici) i LOX-2 (u endospermu).

2.5. Sladovanje ječma i pšenice

Sladovanje je strogo kontroliran biotehnološki proces usmjerenog klijanja zrna žitarica nakon kojega slijedi sušenje radi zaustavljanja fizioloških aktivnosti i stabilizacije dobivenog proizvoda – slada (Panahi i sur., 2025).

Ječam predstavlja tradicionalnu i tehnološki najzastupljeniju sirovinu za proizvodnju slada i piva, ponajprije zbog specifične građe zrna s priraslom pljevicom i povoljnog enzimskog profila (Briggs, 1998). Pšenica se, s druge strane, koristi u proizvodnji specijalnih pšeničnih piva te predstavlja važnu sirovinu u pekarskoj industriji (Faltermaier i sur., 2014). Iako se obje žitarice podvrgavaju istim temeljnim fazama sladovanja (namakanju, klijanju i sušenju) njihove morfološke, fizikalne i kemijske razlike, prvenstveno odsutnost pljevice kod pšenice te razlike u sastavu staničnih stijenki endosperma i strukturi skladišnih proteina, zahtijevaju specifične prilagodbe tehnoloških režima (Faltermaier i sur., 2013; Faltermaier i sur., 2014). Proizvodnja slada uključuje nekoliko faza: odabir sirovine i priprema zrna, namakanje zrna, proces klijanja, sušenje i dorada zrna (otklicavanje) Na **Slici 6** prikazan je izgled zrna ječma tijekom različitih faza sladovanja.



Slika 6 Zrno ječma tijekom sladovanja. Prilagođeno prema Gorzolka i sur. (2017), uz uvjete licence Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

2.5.1. Postupak sladovanja

2.5.1.1 Priprema zrna za sladovanje

Tehnološka kvaliteta gotovog slada izravno ovisi o fizikalno-kemijskim i fiziološkim svojstvima polaznog zrna. Za industrijsko sladovanje odabiru se zrna visoke apsolutne mase, ujednačene veličine, visoke klijavosti (u pravilu iznad 95%) te niske razine oštećenja zrna i mikrobiološke kontaminacije (Krstanović i sur., 2020; Rani i Bhardwaj, 2021). Neujednačene dimenzije zrna uzrokuju nejednoliko upijanje vode i heterogeno klijanje unutar iste šarže, što rezultira zrnenom masom nedovoljno i prekomjerno modificiranih zrna. Nakon čišćenja i sortiranja na sitima zrno se u pravilu skladišti određeno vrijeme (obično najmanje dva mjeseca) kako bi se prevladala posliježetvena dormantnost zrna, fiziološko stanje koje bi u suprotnom usporilo i učinilo neujednačenim naknadno klijanje (Krstanović i sur., 2020). Za pivarski slad osobito su važni klijavost, sadržaj proteina, prinos ekstrakta, dijastatska snaga i sposobnost razgradnje staničnih stijenki, a konačni pokazatelji kvalitete podjednako ovise o genotipu, uvjetima uzgoja i odabranom režimu sladovanja (Rani i Bhardwaj, 2021). U proizvodnim se pogonima parametri stoga ne standardiziraju univerzalno, nego se trajanje, temperatura, prozračivanje i ciljana vlažnost svake faze prilagođavaju vrsti žitarice, sorti, sezoni uzgoja i željenom tipu slada.

2.5.1.2 Namakanje

Namakanje je prva i ključna operacija sladovanja kojom se sadržaj vode u zrnu povećava s početnih oko 12% na ciljanih 42 do 48%, čime se zrno prevodi iz stanja fiziološkog mirovanja (anabioze) u aktivno metaboličko stanje (Panahi i sur., 2025). Proces se provodi u izmjeničnim ciklusima uranjanja u vodu (mokro namakanje) pri 14-16 °C i odležavanja na zraku (zračne stanke), pri čemu je aeracija potrebna jer intenzivno disanje embrija i sintetske aktivnosti zahtijevaju stalan dotok kisika. U suprotnome dolazi do nakupljanja toksičnih produkata anaerobnog metabolizma (etanola i mliječne kiseline) i ometanja klijanja (Briggs, 1998; Panahi i sur., 2025). Vlažnost zrna i opskrba kisikom stoga se moraju upravljati zajednički, a ne kao odvojeni parametri. Voda u zrno ulazi ponajprije kroz mikropilarnu regiju te postupno hidratizira klicu i štitčić, potom aleuronski sloj, dok se škrobni endosperm hidratizira posljednji i najsporije (Ritchie, Swanson i Gilroy, 2000). Ovlaživanjem zrna omekšavaju ovojnice, aktiviraju se već prisutni latentni enzimi, a embrij počinje sintetizirati i lučiti fitohormone, ponajprije giberelinsku kiselinu (GA), koja je glavni signal za pokretanje daljnje modifikacije zrna (Ritchie, Swanson i Gilroy, 2000). Stoga uloga namakanja nije hidroliza škroba, nego

prvenstveno uspostavljanje hidratacijskih i hormonskih uvjeta potrebnih za kasniju mobilizaciju rezervi.

2.5.1.3 Klijanje

Tijekom klijanja (engl. *germination*) zrno se održava pri kontroliranoj temperaturi (uobičajeno 16 do 20 °C) 4 do 7 dana, visokoj relativnoj vlažnosti zraka (iznad 95%) te uz stalno ili povremeno prevrtanje radi odvođenja topline disanja i ujednačavanja uvjeta unutar zrnene mase (Krstanović i sur., 2020; Panahi i sur., 2025). Cilj sladovanja pritom nije maksimalan rast biljke, nego postizanje optimalne razine modifikacije endosperma uz minimalne gubitke suhe tvari uslijed disanja i rasta klice.

Hormonalna regulacija i dinamika modifikacije

Giberelinska kiselina, sintetizirana u klici i štitčiću, difundira u aleuronski sloj, gdje se veže na GID1 receptore, a posljedična razgradnja DELLA represorskih proteina oslobađa transkripcijske faktore (među kojima je i GAMYB) odgovorne za *de novo* sintezu hidrolitičkih enzima (Panahi i sur., 2025). Prostorna organizacija anatomskih dijelova zrna određuje redoslijed kojim se modifikacija odvija. Budući da giberelini difundiraju iz klice prema aleuronu, razgradnja endosperma napreduje od skutelarnog pola prema distalnom vrhu zrna, a ne trenutačno i jednoliko u cijelom zrnu (Ritchie, Swanson i Gilroy, 2000). Aleuronski sloj stoga postaje glavno mjesto sinteze i izlučivanja hidrolitičkih enzima prema škrobnom endospermu, dok štitčić dodatno sudjeluje u lučenju hidrolaza te u transportu topljivih produkata razgradnje prema rastućoj klici (Ritchie, Swanson i Gilroy, 2000).

Amilolitička modifikacija škrobnog endosperma

Enzimska razgradnja škroba tijekom klijanja odvija se sinergijskim djelovanjem α-amilaze, β-amilaze, granične dekstrinaze i α-glukozidaze. S tehnološkog gledišta sladovanja posebno je važna njihova razvojna dinamika. Dok je β-amilaza već prisutna u zrelom zrnu u neaktivnom obliku, vezana disulfidnim vezama, te se tijekom klijanja oslobađa djelovanjem proteaza, α-amilaza, granična dekstrinaza i α-glukozidaza sintetiziraju se *de novo*, pretežno u aleuronskom sloju, pod izravnim utjecajem giberelinske kiseline (Evans i sur., 1997; Georg-Kraemer, Mundstock i Cavalli-Molina, 2001).

Iako dijastatska snaga kao zbirna mjera amilolitičkog potencijala slada tradicionalno najviše korelira s aktivnošću β-amilaze, budući da je ona kvantitativno najzastupljeniji amilolitički enzim u zrnu (Sun i Henson, 1991), sustavna usporedba pokazala je da upravo aktivnost *de*

novo sintetizirane α-amilaze znatno bolje korelira s ukupnom akumulacijom fermentabilnih šećera tijekom sladovanja nego aktivnost β-amilaze ili granične dekstrinaze (Duke i Henson, 2009). α-glukozidaza, iako prisutna u manjoj količini od preostala tri enzima, dovršava saharifikaciju oslobađanjem slobodne glukoze iz kratkih malto-oligosaharida te sudjeluje u sinergijskoj razgradnji nativnih škrobnih granula zajedno s α-amilazom (Stanley i sur., 2011; Sun i Henson, 1991).

Proteolitička modifikacija skladišnih proteina

Proteoliza skladišnih proteina hordeina kod ječma te glijadina i glutenina kod pšenice odvija se usporedno s amilolizom, ali s različitom kinetikom i supstratnom specifičnošću. Endopeptidaze (uključujući cisteinske proteaze) najprije cijepaju unutarnje peptidne veze skladišnih proteina i oslobađaju veće polipeptidne fragmente, dok egzopeptidaze, ponajprije karboksipeptidaze, potom te fragmente razgrađuju do kratkih peptida i slobodnih aminokiselina (Wallace i Lance, 1988). Sinteza i aktivnost proteolitičkih enzima nije trenutačna. U suhom zrnu endoproteolitička aktivnost je minimalna, potom se intenzivno razvija tijekom prvih dana klijanja i približava se maksimumu oko trećega dana (Jones, Marinac i Fontanini, 2000; Rastogi i Oaks, 1986).

Citoliza staničnih stijenki endosperma

Citolitička razgradnja obuhvaća razgradnju staničnih stijenki endosperma, čiji sastav značajno razlikuje ječam od pšenice. Stanične stijenke ječmenog endosperma pretežno sadrže mješovito vezane β-(1→3)-(1→4)-glukane (~60%) i arabinoksilane (~35%), uz manji udio pektina (~5%) (Langenaeken i sur., 2020). Endo-β-(1→3)-(1→4)-glukanaze i ksilanaze/arabinofuranozidaze tijekom klijanja postupno otvaraju strukturu stijenki, čime se omogućuje pristup proteazama i amilazama unutarnjim rezervama endosperma (Langenaeken i sur., 2020; Autio i sur., 2001). Nasuprot ječmu, kod pšenice u staničnim stijenkama endosperma dominiraju arabinoksilani, dok je udio β-glukana vrlo nizak, pa je u zrnu pšenice ključna razgradnja arabinoksilana djelovanjem endoksilanaza (Faltermaier i sur., 2014).

Fitin, fitaza i mobilizacija mineralnog fosfora

Fitin, odnosno soli fitinske kiseline, glavni su oblik pohranjenog fosfora u zrnu, osobito u tkivima povezanima s embrijem i aleuronskim slojem. Tijekom klijanja aktivnost fitaze raste, pri čemu enzim postupno defosforilira fitat u niže inozitol-fosfate i anorganski fosfat, čime se

dio fosfora, zajedno s magnezijem i kalcijem, mobilizira za metabolizam rastuće klice, a istodobno se smanjuje antinutritivni potencijal zrna (Azeke i sur., 2011).

2.5.1.4 Sušenje i dorada slada

Klijanje se prekida sušenjem, kojim se sadržaj vode u zrnu uobičajeno snižava na ispod 5%, čime se postiže skladišna stabilnost, zaustavlja rast klice i fiksira postignuti enzimski profil (Panahi i sur., 2025). Sušenje se u pravilu odvija u dva stadija: prva faza je uklanjanje vlage pri nižim temperaturama (45 do 55 °C), tijekom koje se nastoji sačuvati aktivnost termolabilnih enzima, a druga faza je prženje odnosno dozrijevanje pri višim temperaturama (80 do 85 °C za svijetle bazne sladove ili više od 100 °C za specijalne i tamne sladove) (Panahi i sur., 2025). Enzimska aktivnost pritom ne opada jednoliko: temperatura, vlaga, pH i trajanje zagrijavanja različito utječu na enzime, pri čemu su β-glukanaze i fitaza općenito osjetljivije na toplinsku inaktivaciju, dok se ukupna proteolitička aktivnost može djelomično očuvati ili čak neznatno povećati pred kraj sušenja (Essery, 1951; Jones, Marinac i Fontanini, 2000).

Tijekom faze prženja, pri višim temperaturama i sniženom sadržaju vode, odvijaju se neenzimatske reakcije posmeđivanja (Maillardove reakcije) između reducirajućih šećera i slobodnih aminokiselina oslobođenih tijekom proteolize, pri čemu nastaju melanoidini odgovorni za razvoj karakteristične boje, arome i okusa slada (Panahi i sur., 2025). Sušenje termolabilniju β-amilazu pogađa znatno izraženije nego α-amilazu, zbog čega se konačni omjer aktivnosti amilolitičkih enzima u gotovom sladu razlikuje od onoga u zelenom (nesušenom) sladu (Krstanović i sur., 2020). Nakon sušenja slijedi mehaničko otklicavanje (uklanjanje korjenčića i klice) te hlađenje i skladištenje gotovog slada radi stabilizacije preostale enzimske aktivnosti.

2.5.2. Promjene tijekom sladovanja i povećanje biodostupnosti nutrijenata

Proces sladovanja predstavlja kontroliranu biokemijsku transformaciju nesladovanog, metabolički dormantnog zrna žitarica u visoko funkcionalnu sirovinu s bogatim enzimskim potencijalom i modificiranim matriksom rezervnih tvari (Mäkinen i Arendt, 2015; Panahi i sur., 2026). Sladovanjem se zrno fiziološki aktivira, dolazi do dubokih strukturnih promjena endosperma te se potiče *de novo* sinteza i/ili aktivacija kompleksa hidrolitičkih enzima koji su ključni za daljnju razgradnju makromolekula tijekom ukomljavanja (Gupta, Abu-Ghannam i Gallaghar, 2010). U pivarskoj industriji slad je osnovni izvor ekstrakta, fermentabilnih šećera, slobodnog aminodušika (FAN, engl. *Free Amino Nitrogen*) te prekursora boje, arome i pjene

piva (Rani i Bhardwaj, 2021). Nativno zrno pšenice i ječma evolucijski je prilagođeno zaštiti klicinih zaliha od prerane hidrolize i vanjskih faktora. Zbog toga se većina esencijalnih mikronutrijenata, proteina i ugljikohidrata u nativnom zrnu nalazi u fizikalno ili kemijski teško dostupnom obliku za gastrointestinalnu apsorpciju u humanoj i životinjskoj prehrani. Sladovanje uklanja te barijere nizom usklađenih fizikalnih, kemijskih i biokemijskih promjena, čime se značajno povećava bioraspoloživost i biodostupnost minerala, aminokiselina, topljivih vlakana, fenolnih spojeva i energije (Aslam i sur., 2018; Mäkinen i Arendt, 2015).

Tijekom klijanja cisteinske proteaze i serinske karboksipeptidaze intenzivno hidroliziraju netopljive skladišne proteine endosperma. Rezultat ove proteolitičke razgradnje jest značajan pad udjela visokomolekularnih proteina te akumulacija topljivih oligopeptida i slobodnih aminokiselina. Ti spojevi imaju dvojaku tehnološku važnost: dio je izvor dušika za kvasac tijekom fermentacije, a istodobno njihova koncentracija određuje vrijednost tzv. slobodnog aminodušika, jednog od ključnih pokazatelja stupnja proteolitičke modifikacije slada. Cilj sladarske proizvodnje pritom nije maksimalna, nego optimalna razgradnja proteina, budući da prekomjerna proteoliza smanjuje količinu proteina raspoloživih za stvaranje i stabilizaciju pjene piva, dok nedovoljna proteoliza ograničava razvoj slobodnog dušika i otežava prehranu kvasca tijekom fermentacije (Gupta i sur., 2010). Proteoliza je stoga sastavni dio tzv. modifikacije endosperma tijekom klijanja jer razgradnja proteinskog matriksa, zajedno s razgradnjom staničnih stijenki, postupno oslobađa škrobne granule i čini ih dostupnima za djelovanje amilolitičkih enzima (Diaz-Mendoza i sur., 2019; Mäkinen i Arendt, 2015; Guzmán-Ortiz i sur., 2019; Panahi i sur., 2026). Osim toga, proteolitičkim cijepanjem disulfidnih veza i proteina Z oslobađa se neaktivna, vezana β-amilaza u slobodni aktivni oblik. Sinergijskim djelovanjem *de novo* sintetizirane α-amilaze te aktivirane β-amilaze, granične dekstrinaze i α-glukozidaze škrobne granule u endospermu podliježu parcijalnoj hidrolizi. Sadržaj netopljivog škroba opada, dok raste udio fermentabilnih šećera (maltoze, glukoze, maltotrioze) i topljivog ekstrakta (Guerin i sur., 1992; Evans i Eglinton, 2010; Jukić i sur., 2023; Mäkinen i Arendt, 2015).

Ključni mehanizam kojim se povećava biodostupnost hranjivih tvari jest citolitička razgradnja staničnih stijenki endosperma i aleuronskog sloja (Mäkinen i Arendt, 2015; Panahi i sur., 2026). U nativnom zrnu mineralne tvari (poput željeza, cinka, kalcija i magnezija) te značajan dio antioksidacijskih fenolnih spojeva (prvenstveno ferulinske kiseline) lokalizirani su unutar stanica aleuronskog sloja (Aslam i sur., 2018). Istraživanja pokazuju da biljne stanične stijenke ostaju izrazito otporne tijekom standardnog mehaničkog mljevenja, žvakanja i probave,

stvarajući fizičku barijeru (staničnu enkapsulaciju) koja sprječava oslobađanje i gastrointestinalnu apsorpciju minerala (Aslam i sur., 2018).

Inicijacijom klijanja *de novo* se sintetiziraju i aktiviraju citolitički enzimi, β-glukanaze i endo-ksilanaze (Mäkinen i Arendt, 2015; Panahi i sur., 2026). Hidrolizom glikozidnih veza unutar β-glukana i arabinoksilana dolazi do poroznosti te djelomičnog ili potpunog raspada staničnih stijenki endosperma i aleuronskog sloja. Razgradnjom ove stanične barijere mineralni kationi i nutrijenti zarobljeni unutar stanica aleurona postaju višestruko biodostupniji u odnosu na nativno zrelo zrno. Istodobno, djelomična razgradnja netopljivih neškrobnih polisaharida prevodi dio prehrambenih vlakana u topljivi oblik (Aslam i sur., 2018; Mäkinen i Arendt, 2015). Razgradnja staničnih stijenki ima i izravnu tehnološku važnost jer nepotpuna razgradnja β-glukana ostavlja visokomolekularne polimere koji povisuju viskoznost sladovine te otežavaju bistrenje i filtraciju u pivovari, zbog čega je učinkovita β-glukanoliza jedan od ključnih pokazatelja kvalitete sladarske sirovine (Jin i sur., 2004; Celus, Brijs i Delcour, 2006).

Nadalje, aktivacija staničnog metabolizma tijekom klijanja uzrokuje akumulaciju slobodnih fenolnih spojeva (ferulinske, p-kumarinske i vanilinske kiseline), biljnih sterola te vitamina B-skupine (posebno folata, čija se koncentracija tijekom klijanja zrna može povećati i do tri puta). Budući da su u nativnom zrnu fenolske kiseline esterifikacijom čvrsto vezane za arabinoksilane staničnih stijenki, djelovanje ksilanaza i esteraza tijekom sladovanja oslobađa ove spojeve u slobodnom, biološki dostupnom obliku (Aslam i sur., 2018; Mäkinen i Arendt, 2015). Porast razine fenolnih kiselina i *de novo* sinteza antioksidativnih enzima predstavljaju prirodni obrambeni mehanizam zrna protiv reaktivnih oblika kisika (ROS; engl. *Reactive Oxygen Species*) koje nastaju intenziviranim disanjem tkiva klice, čime slad dobiva izrazito povišen ukupni antioksidacijski kapacitet (Mäkinen i Arendt, 2015).

Fitinska kiselina i njezine soli (fitati) predstavljaju najznačajniji antinutritivni faktor u zrnu žitarica. Zbog izrazito visokog negativnog naboja pri fiziološkom pH-u, fitinska kiselina tvori iznimno stabilne, netopljive helatne komplekse s esencijalnim multivalentnim kationima, prvenstveno željezom (Fe^{2+}/Fe^{3+}), cinkom (Zn^{2+}), kalcijem (Ca^{2+}) i magnezijem (Mg^{2+}), sprječavajući njihovu apsorpciju u tankom crijevu (Mäkinen i Arendt, 2015; Aslam i sur., 2018). Tijekom namakanja i klijanja *de novo* se aktiviraju endogene biljne fitaze koje postupno odcjepljuju fosfatne skupine s molekule fitata, prevodeći ih u niže inozitol-fosfate i slobodni anorganski fosfat. Niži inozitol-fosfati pokazuju znatno slabiji afinitet vezanja minerala, čime se kationi oslobađaju u topljivi, biološki dostupan oblik. Na taj način se sladovanjem

biodostupnost cinka može udvostručiti, a biodostupnost željeza povećati za ~50% u usporedbi s nesladovanim zrnom (Mäkinen i Arendt, 2015; Guzmán-Ortiz i sur., 2019).

2.5.3. Vrste slada i njihove namjene

2.5.3.1 Primjena slada u pivarstvu

Pivarski sladovi dijele se na dvije osnovne skupine: bazni i specijalni sladovi.

Bazni sladovi čine 70 do 100% sirovine pri ukomljavanju. Suše se pri blažim temperaturnim režimima (80 do 85 °C) kako bi zadržali visoku enzimsku aktivnost i dijastatsku snagu potrebnu za konverziju vlastitog škroba, kao i eventualno dodanih nesladovanih sirovina (nesladovani ječam, kukuruz, riža). Najvažniji predstavnici su svijetli ječmeni slad (Pilsner i Pale Ale) i pšenični slad.

Specijalni i obojeni sladovi uključuju karamelne ili kristalne sladove (npr. Pils, Carahell, Crystal) i pržene, odnosno specijalne sladove (npr. čokoladni, crni). Proizvode se podvrgavanjem vlažnog, proklijalog zrna procesu saharifikacije unutar samog zrna pri 60 do 70 °C, nakon čega slijedi prženje pri znatno višim temperaturama (110 do 220 °C). Odlikuju se visokim sadržajem melanoidina te intenzivnom bojom i aromom (karamel, kava, čokolada), ali gotovo bez preostale enzimske aktivnosti zbog toplinske denaturacije proteina (Gupta, Abu-Ghannam i Gallagher, 2010).

2.5.3.2 Pekarske i prehrambene primjene slada

Izvan pivarstva, slad je vrijedan funkcionalni dodatak u pekarskoj i prehrambenoj industriji.

Dijastatski slad (u obliku brašna ili ekstrakta) dodaje se pšeničnom brašnu s nedostatnom enzimskom aktivnošću, obično u udjelu od 0,2 do 0,5%. Prisutne α- i β-amilaze razgrađuju oštećena škrobna zrnca u brašnu u fermentabilne šećere (prvenstveno maltozu), čime se ubrzava aktivnost pekarskog kvasca, povećava volumen tijesta, poboljšava poroznost te razvija privlačna karamelizirana boja kore i aroma kruha (Vasyukova i sur., 2020). Doziranje mora biti pažljivo odmjereno, jer prekomjerna amilolitička aktivnost može dovesti do prevelike razgradnje škroba i posljedično ljepljive, vlažne sredine kruha.

Nedijastatski slad dobiva se izlaganjem slada visokim temperaturama pri kojima se enzimi u potpunosti inaktiviraju. Koristi se prvenstveno kao prirodno bojilo, poboljšivač okusa (karakterističan sladni profil) i prirodni zaslađivač u proizvodnji peciva, keksa, dječje hrane i žitnih pahuljica (Mäkinen i Arendt, 2015).

2.6. Direktne metode određivanja amilolitičke aktivnosti

Kvantifikacija aktivnosti amilolitičkih enzima, s posebnim naglaskom na α-amilazu, predstavlja temeljni analitički izazov u kontroli kvalitete žitarica, mlinarskih proizvoda i slada (McCleary i sur., 2002). Budući da slad prirodno sadrži sva četiri amilolitička enzima istodobno, tradicionalni analitički sustavi koji se oslanjaju na nespecifične fizikalno-kemijske promjene otežavaju točnu i izravnu procjenu doprinosa same α-amilaze u prisutnosti miješane enzimske aktivnosti (Wainwright i Buckee, 1977).

Određivanje ukupne aktivnosti amilolitičkih enzima u sladu i sladnom brašnu uobičajeno se provodi metodom određivanja dijastatske snage (DP). Na nju utječu svi prisutni amilolitički enzimi (α- i β-amilaza, granična dekstrinaza i α-glukozidaza), a u najvećoj mjeri β-amilaza. DP vrijednosti se izražavaju u stupnjevima Windisch-Kolbacha (°*WK*), koje propisuje Europski pivarski kongres (EBC; engl. *European Brewery Convention*), ili u stupnjevima Lintnera (°*L*), sukladno standardima Američkog društva pivarskih kemičara (*ASBC; engl. American Society of Brewing Chemists*) (Duke i Henson, 2008). Ako se želi odrediti samo aktivnost α-amilaze, moraju se koristiti druge specifične metode koje se mogu podijeliti u nekoliko skupina: a) saharogeni postupak, odnosno spektrofotometrijsko određivanje reducirajućih šećera nastalih djelovanjem α-amilaze na supstrat (škrob) uz upotrebu različitih reagensa; b) amiloklastične metode u kojima se prati promjena boje ili zamućenja otopine; c) kromogene metode koje mjere oslobađanje boje koja je prethodno bila vezana na škrob; d) ELISA test; e) spektrofotometrijske metode sa sintetičkim supstratima koji pri reakciji oslobađaju boju (McCleary i sur., 2002; Muralikrishna i Nirmala, 2005).

2.6.1. Saharogene metode

Jedna od najpoznatijih saharogenih metoda za određivanje amilolitičke aktivnosti je metoda koja koristi alkalnu otopinu 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNS) koja se u prisutnosti reducirajućih šećera pri povišenoj temperaturi reducira u narančasto crvenu 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu, čiji se intenzitet obojenja mjeri spektrofotometrijski na 540 nm (Miller, 1959). Somogyi-Nelsonova metoda, s druge strane, koristi dvostupanjski postupak: reducirajući šećeri najprije reduciraju dvovalentne bakrene ione (Cu^{2+}) u jednovalentni bakrov(I) oksid (Cu_2O) u alkalnom mediju, nakon čega nastali bakar reagira s kiselim arsenomolibdatnim reagensom (Nelsonov reagens), stvarajući intenzivno plavo obojeni kompleks molibdenskog plavila, čija se apsorbancija mjeri na 500 ili 520 nm (Somogyi, 1952).

Iako su saharogene metode standardizirane i široko primjenjivane za čiste enzimske preparate, njihova izravna primjena na sladna brašna i ekstrakte žitarica suočava se s bitnim analitičkim ograničenjima. Sladna brašna već prirodno sadrže vrlo visoke koncentracije nativnih reducirajućih šećera (ponajprije maltoze i glukoze), nastalih intenzivnom razgradnjom škroba tijekom klijanja (Wainwright i Buckee, 1977). Ti šećeri uzrokuju izrazito visoke vrijednosti slijepe probe, čime se znatno smanjuje osjetljivost i točnost mjerenja te saharogene metode postaju praktički neupotrebljive za rutinsku procjenu aktivnosti α-amilaze u sladu bez prethodnih, zahtjevnih koraka pročišćavanja (McCleary i Sheehan, 1987).

2.6.2. Amiloklastične metode

Amiloklastične metode, među kojima su najpoznatije metode po Farrandu i Wohlgemuthu, temelje se na smanjenju intenziteta plave boje kompleksa škroba i joda. Nativni škrob s jodom tvori karakterističan, intenzivno plavo obojeni kompleks uslijed ugradnje joda u spiralnu strukturu amiloze. Djelovanjem α-amilaze sposobnost te ugradnje opada, a boja se mijenja od plave, preko ljubičaste i crveno-smeđe, do potpunog gubitka obojenja u tzv. akromatskoj (obezbojenoj) točki (McCleary i Sheehan, 1987). Aktivnost se izražava vremenom potrebnim za postizanje akromatske točke ili postotnim smanjenjem apsorbancije. Glavni je nedostatak ovih metoda je izražena ovisnost o podrijetlu, strukturi i stabilnosti korištenog škrobnog supstrata, što uzrokuje slabu međulaboratorijsku ponovljivost i zahtijeva učestalu ponovnu standardizaciju (McCleary i sur., 2002).

U amiloklastične metode ubrajamo i nefelometrijske metode koje se temelje se na enzimskoj hidrolizi standardiziranog, stabilnog koloidnog supstrata škroba pomoću α-amilaze izolirane iz uzorka samljevenog zrna. Na samom početku, netopljive čestice škroba visoke molekularne mase tvore vrlo mutnu suspenziju koja snažno raspršuje upadnu svjetlost, dajući visoku početnu vrijednost nefelometrijskog signala. Dodatkom ekstrakta žitarica, α-amilaza nasumično cijepa unutrašnje α-(1→4)-glikozidne veze u škrobu, brzo razgrađujući velike polimere u manje, topljive dekstrine i oligosaharide. Ova progresivna enzimska razgradnja dovodi do vidljivog bistrenja suspenzije, što rezultira kontinuiranim padom zamućenosti koji je izravno proporcionalan katalitičkoj aktivnosti α-amilaze prisutne u uzorku brašna ili zrna (Fretzdorff, i Weipert, (1983).

2.6.3. Kromogene metode

Metode s obojenim, netopljivim supstratima, poput Phadebas metode, koriste polimerni škrobni supstrat kovalentno vezan za organsko modro bojilo (Cibacron blue) i umrežen tako da bude netopljiv u vodi. Djelovanjem α-amilaze dolazi do kidanja glikozidnih veza unutar umrežene mreže, pri čemu se oslobađaju topljivi, obojeni oligomerni fragmenti, a nakon centrifugiranja ili filtracije intenzitet modrog obojenja filtrata mjeri se na 620 nm i izravno je proporcionalan aktivnosti enzima (Visvanathan i sur., 2020; Barnes i Blakeney, 1974). Iako Phadebas metoda pokazuje znatno bolju specifičnost od saharogenih metoda, u miješanim sustavima poput slada i dalje je pod značajnim utjecajem β-amilaze. Iako sama β-amilaza ne može hidrolizirati umreženi supstrat i osloboditi bojilo, ona sinergijski ubrzava razgradnju topljivih fragmenata koje je prethodno oslobodila α-amilaza, čime se konačno očitanje umjetno povećava (McCleary i Sheehan, 1987).

2.6.4. ELISA test

Određivanje α-amilaze u žitaricama pomoću imunoenzimskog testa (ELISA; engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) omogućuje izravno mjerenje masene koncentracije samog enzimskog proteina, umjesto njegove katalitičke aktivnosti. Za razliku od tradicionalnih, koji mogu ovisiti o kvaliteti prisutnog škroba i proteina u zrnu, ELISA koristi specifična monoklonska ili poliklonska protutijela koja selektivno prepoznaju i vežu izoenzime pšenične α-amilaze. Time se postiže iznimno niska granica detekcije (~0,5–1,0 ng/mL) i visoka specifičnost koja eliminira lažno pozitivne rezultate, a brzi terenski ELISA formati omogućuju izvođenje analize u svega petnaestak minuta, izravno na mjestima otkupa žitarica (Verity, Hac, i Skerritt, 1999).

2.6.5. Spektrofotometrijske metode sa sintetičkim supstratima

Ova skupina metoda za određivanje aktivnosti α-amilaze obuhvaća suvremene, visoko standardizirane postupke temeljene na primjeni topljivih, kemijski modificiranih sintetskih oligosaharida koji na jednom kraju lanca sadrže vezanu signalnu molekulu (kromogen ili fluorogen). Temeljni princip ovih metoda počiva na kinetičkom praćenju enzimske hidrolize u stvarnom vremenu, pri čemu α-amilaza djeluje kao endoenzim i specifično cijepa unutrašnje veze supstrata, što u kaskadnoj reakciji s pomoćnim egzogenim enzimima (poput α-glukozidaze) ili izravno dovodi do oslobađanja mjerljivog signala.

U kliničkoj medicini i humanoj dijagnostici često se upotrebljava metoda koja koristi supstrat EPS-G7 (4,6-etiliden-p-nitrofenil-maltoheptaozid), pri čemu uvođenje etilidenske skupine na terminalni kraj lanca učinkovito blokira neželjeno djelovanje egzohidrolaza (poput β-amilaze), osiguravajući apsolutnu specifičnost isključivo za α-amilazu, dok se brzina oslobađanja žuto obojenog p-nitrofenila (PNP) pomoću pomoćnog enzima α-glukozidaze kontinuirano prati fotometrijski na 405 nm. Drugi ključni predstavnik u rutinskoj medicinskoj dijagnostici je izravna metoda sa supstratom CNPG3 (2-kloro-4-nitrofenil-α-D-maltotriosid) koja, zbog specifične molekularne strukture, ne zahtijeva prisutnost pomoćnih enzima u reagensu, nego α-amilaza izravno oslobađa klor-nitrofenol (CNP) čija se apsorbancija također mjeri na 405 nm (Foo i Rosalki, 1986; Gella i sur., 1997). U ovu skupinu metoda ubrajaju se i metode koje koriste kraće oligosaharide poput maltotetraoze, pri čemu se kinetika reakcije prati u UV području na 340 nm mjerenjem porasta koncentracije reduciranog koenzima NADH u sparenoj enzimskoj kaskadi s maltoza-fosforilazom i glukoza-6-fosfat dehidrogenazom (Whitlow i sur., 1979).

U agronomiji i industriji žitarica najznačajniji predstavnik ove skupine metoda za određivanje aktivnosti α-amilaze je Ceralpha metoda (odobrena kao AOAC metoda 2002.01, AACC metoda 22-02.01 i ICC metoda 303), koja kao supstrat koristi definirani oligosaharid, kemijski blokirani p-nitrofenil-maltoheptaozid (BPNPG7), a razvijena je kako bi se osigurala apsolutna specifičnost mjerenja aktivnosti α-amilaze u uzorcima koji sadrže visoke koncentracije drugih, ometajućih amilolitičkih enzima, uključujući β-amilazu, graničnu dekstrinazu i α-glukozidazu (McCleary i sur., 2002; McCleary i Sheehan, 1987).

Strukturno, BPNPG7 supstrat je na svom nereducirajućem kraju modificiran uvođenjem kemijske blokirajuće skupine (najčešće etilidenske ili benzilidenske skupine na terminalnoj glukoznoj jedinici) (Rahman i sur., 2021). Ova modifikacija u potpunosti onemogućuje pristup i djelovanje egzoenzima poput β-amilaze, koje za početak sukcesivnog cijepanja zahtijevaju slobodan nereducirajući kraj (McCleary i sur., 2002). Na reducirajućem je kraju oligosaharidnog lanca kovalentno vezana kromogena skupina p-nitrofenola (pNP). Biokemijska kaskadna reakcija odvija se u prisutnosti viška pomoćnog enzima, termostabilne α-glukozidaze, koja je sastavni dio reagensne smjese. Budući da je nereducirajući kraj supstrata BPNPG7 blokiran, prisutna α-glukozidaza nema djelovanja na nativni supstrat, čime se osiguravaju iznimno niska vrijednost slijepe probe i visoka stabilnost reagensa. Reakciju inicira isključivo endoenzim α-amilaza, koja nasumično cijepa unutarnje α-(1→4)-glikozidne veze unutar heptaozidnog lanca BPNPG7 (McCleary i Sheehan, 1987; McCleary i sur., 2002). Tim

se početnim cijepanjem oslobađaju kraći, neblokirani p-nitrofenil-maltosaharidni fragmenti (poput pNP-maltotrioze ili pNP-maltotetraoze) koji na svom nereducirajućem kraju više nemaju blokirajuću skupinu. Nastali fragmenti trenutačno postaju supstrat za prisutnu α-glukozidazu, koja ih potpuno i kvantitativno hidrolizira do slobodne glukoze i slobodnog p-nitrofenola (McCleary i Sheehan, 1987).

Kinetika ove dvostupanjske kaskadne reakcije temelji se na činjenici da je brzina oslobađanja p-nitrofenola izravno ograničena prvim korakom, odnosno endoaktivnošću α-amilaze, dok je drugi stupanj gotovo trenutačan zbog velikog viška α -glukozidaze (McCleary i Sheehan, 1987). Reakcija se prekida dodavanjem visoko alkalne otopine trinatrij-fosfata (pH oko 11), što uzrokuje trenutačnu denaturaciju enzima i istodobno prevodi oslobođeni p-nitrofenol u intenzivno žuto obojeni fenolatni anion. Spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na 400 nm kvantificira se količina oslobođenog p-nitrofenola, koja linearno korelira s koncentracijom aktivne α-amilaze u reakcijskoj smjesi (McCleary i Sheehan, 1987; McCleary i sur., 2002).

Kinetički model Ceralpha metode definiran je u uvjetima zasićenja supstratom. U standardnim uvjetima Ceralpha testa, pri pH 5,2 do 5,4, koncentracija supstrata BPNPG7 u reakcijskoj smjesi iznosi 2,0 mM, što je znatno iznad Michaelisove konstante za kinetiku enzimskih reakcija. Pri takvom suvišku supstrata brzina reakcije približava se maksimalnoj vrijednosti, postaje neovisna o malim promjenama koncentracije supstrata te je izravno proporcionalna isključivo koncentraciji prisutnog enzima (McCleary i Sheehan, 1987; McCleary i sur., 2002).

Jedna Ceralpha jedinica (CU) aktivnosti definira se kao količina enzima koja, u prisutnosti viška α-glukozidaze, oslobađa jedan µmol p-nitrofenola iz supstrata BPNPG7 u jednoj minuti, pod strogo definiranim uvjetima temperature (40 °C) i pH (5,2–5,4) (McCleary i sur., 2002).

2.7. Indirektne metode određivanja amilolitičke aktivnosti (reološke metode)

Različite neizravne reološke metode prate promjene viskoznosti škrobne paste uzrokovane djelovanjem enzima. Međutim, one se uobičajeno ne koriste za određivanje aktivnosti α-amilaze u sladnom brašnu jer je amilolitička aktivnost previsoka, pa je likvefakcija vruće škrobne paste vrlo intenzivna te se viskoznost smanji do te mjere da se ne može odrediti uređajima kojima se provode ova ispitivanja.

2.7.1. Metoda određivanja broja padanja (FN) prema Hagberg-Pertenu

Metoda određivanja broja padanja (FN) po Hagberg-Pertenu predstavlja najraširenij, globalno standardizirani fizikalno-kemijski i autolitički postupak za neizravnu procjenu aktivnosti α-amilaze izravno u brašnu žitarica. Ovu je metodu, formalno prihvaćenu od vodećih međunarodnih udruženja (uključujući ICC, AACC, ISO i ASBC), početkom šezdesetih godina 20. stoljeća razvio švedski istraživač Sven Hagberg, a kasnije ju je dodatno unaprijedio Harald Perten (Hagberg, 1960; Perten, 1964). Osnovni princip metode se ne temelji na izravnom mjerenju molekula enzima ili produkata katalize, nego na praćenju izrazitih reoloških promjena, odnosno brzog pada viskoznosti vruće škrobne paste podvrgnute kontroliranoj enzimskoj hidrolizi tijekom želatinizacije (He i sur., 2019).

Standardni FN test provodi se miješanjem 7,0 g brašna (na bazi 14,0% vlage) s 25,0 mL destilirane vode u precizno definiranoj staklenoj kiveti (viskozimetrijskoj epruveti unutarnjeg promjera 21,0 mm). Nakon energičnog protresanja, radi dobivanja jednolike suspenzije bez grudica, u kivetu se umeće standardizirana metalna miješalica (mase 25,0 g), a cijeli se sklop uranja u kipuću vodenu kupelj uređaja (temperatura 100 °C) (AACC International, 2010).



Slika 7 Uređaj za određivanje broja padanja prema Hagberg-Pertenu (Izvor: fotografija autora).

Uređaj (**Slika 7**) se aktivira te automatski započinje faza predgrijavanja (5 s) i miješanja koje traje točno 55 s (ukupno 60 s). Tijekom prvih pet sekundi epruveta miruje u vrućoj kupelji, a zatim mehanički sustav pokreće miješalicu gore-dolje brzinom od točno dva hoda u sekundi (ukupno 110). Tijekom te prve minute, pod utjecajem brze izmjene topline, škrobne granule intenzivno apsorbiraju vodu, bubre i gube kristalnu strukturu, što dovodi do njihove brze želatinizacije i naglog porasta viskoznosti suspenzije uz stvaranje guste škrobne. Istodobno se, s porastom temperature paste iznad temperature želatinizacije (55 do 65 °C), prisutna α-amilaza brzo aktivira i započinje endohidrolitički napad na nabubrene škrobne granule paste (He i sur., 2019).

Nakon točno 60 sekundi miješanja mehanički sustav podiže miješalicu do gornjeg položaja i u potpunosti je oslobađa, dopuštajući joj da, pod utjecajem vlastite težine, slobodno propada kroz vruću škrobnu pastu prema dnu kivete. Ukupno vrijeme, mjereno u sekundama od trenutka uranjanja kivete u vruću vodenu kupelj do trenutka kada miješalica dotakne dno kivete (prešavši zadanu udaljenost od 68 mm), definira se kao broj padanja (FN). Odnos između rezultata mjerenja FN i aktivnosti α-amilaze je obrnuto proporcionalan i nelinearan.

Kada metalna miješalica prolazi kroz izrazito ukapljenu pastu niske viskoznosti, uzlazni tok tekućine koji se stišće između rubova miješalice i stijenke epruvete stvara hidrodinamički otpor na dnu epruvete. Taj povratni pritisak usporava pad miješalice neposredno prije dodira s dnom, što rezultira prividnim produljenjem vremena padanja (povišenjem FN vrijednosti) koje ne odražava stvarnu viskoznost paste (Chang i sur., 2002). Ovaj efekt stvara sustavnu pogrešku i nelinearnost pri modeliranju visoke enzimske aktivnosti, zbog čega se u znanstvenoj praksi preporučuje konverzija FN u likvefakcijski broj (LN, engl. *Liquefaction number*) (Perten, 1964).

Za transformaciju broja padanja u likvefakcijski broj koristi se klasična Pertenova empirijska formula (**1**):

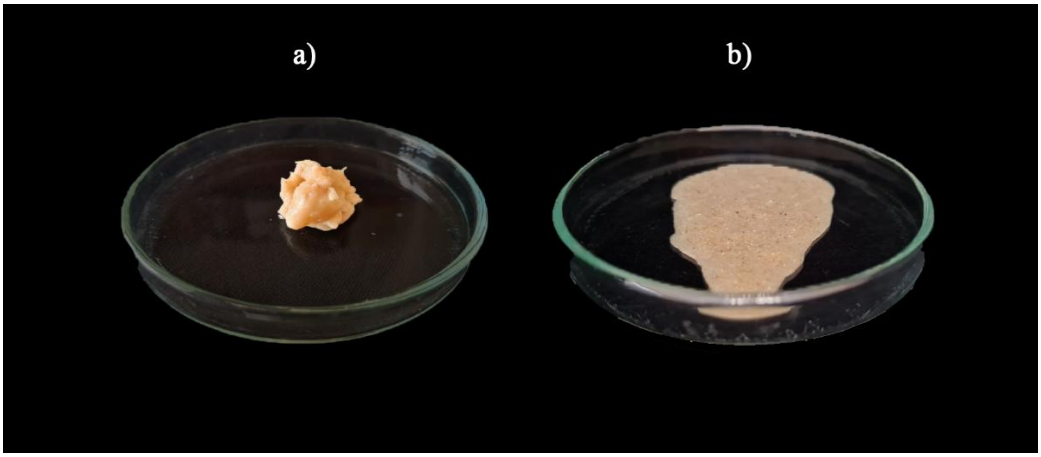
$$LN\ (s^{-1}) = 6000 / (FN\ (s) - 50) \quad (1)$$

Konstanta 50 u nazivniku predstavlja približno procijenjeno vrijeme (u sekundama) potrebno da se hladna suspenzija škroba u epruveti zagrije do kritične temperature želatinizacije (oko 55–65 °C), tijekom kojeg enzim još ne može učinkovito hidrolizirati škrobne granule. LN vrijednosti, za razliku od FN-a, pokazuju izravno proporcionalan i linearan odnos s aktivnošću α-amilaze te su primjenjive pri izradi smjesa brašna, što ih čini ključnim alatom u industrijskoj primjeni i matematičkom modeliranju enzimskih sustava (Perten, 1964).

U uzorcima sa zanemarivom aktivnošću α-amilaze (tzv. zdravo, neproklijalo zrno) nastala škrobna pasta zadržava visoku viskoznost i mehaničku čvrstoću te pruža velik otpor prolasku miješalice te se u tim slučajevima pad miješalice odvija sporo pa se bilježe visoke vrijednosti FN-a, često iznad 350 do 400 sekundi. Nasuprot tome, ako uzorak sadrži povišenu razinu aktivnosti α-amilaze (primjerice uslijed priježetvenog proklijavanja), enzim brzo razgrađuje želatinizirani škrob u kratke dekstrine (likvefakcija), što uzrokuje trenutačan i značajan pad viskoznosti paste. Otpor prolasku miješalice se gubi, ona brzo propada na dno kivete te se bilježe niske vrijednosti FN-a, često ispod 150 do 200 sekundi (He i sur., 2019).

2.7.1.1 Reološko ograničenje standardne FN metode kod sladnih brašna

Iako je standardna FN metoda po Hagberg-Pertenu izvrstan i nezamjenjiv alat u industriji prerade žitarica za detekciju ranih faza proklijavanja pšenice, njezina se izravna primjena na sladna brašna suočava s teško premostivim reološkim ograničenjem. Razina aktivnosti α-amilaze u sladnom brašnu žitarica (koja može premašiti 100, pa i 300 CU/g) za nekoliko je redova veličine viša od razina aktivnosti koje se susreću u proklijaloj, ali nesladovanoj pšenici (obično ispod 5 CU/g) (Jukić i sur., 2023).



Slika 8 Škrobna pasta nakon određivanja broja padanja: a) niska aktivnost α-amilaze; b) visoka aktivnost α-amilaze (Izvor: fotografija autora).

Pri izravnoj analizi čistog sladnog brašna u standardnom FN uređaju, ekstremno visoka koncentracija aktivne α-amilaze dovodi do brze likvefakcije, odnosno gotovo trenutačne razgradnje škrobne paste već u prvim sekundama zagrijavanja (Raschke i sur., 1995). Škrob se u potpunosti ukapljuje u vodenastu otopinu dekstrina niske viskoznosti, pa nakon 60 sekundi miješanja mehanički oslobođena miješalica gotovo trenutačno i bez ikakvog otpora propada na

dno kivete (Jukić i sur., 2023) (**Slika 8**). Uređaj tako bilježi vrijednost od 61-62 sekunde (zbroj 60 sekundi propisanog miješanja i vremena slobodnog pada miješalice kroz rijetku suspenziju, odnosno škrobnu pastu). Ovu donju fizikalnu granicu metode ustanovila su već ranija istraživanja primjene FN uređaja na sladu, koja su pokazala analogno, potpuno zasićenje reološkog odgovora pri visokoj enzimskoj aktivnosti (Raschke i sur., 1995).

Budući da se ta granična vrijednost (61 s) postiže već pri relativno niskoj aktivnosti α-amilaze, od svega oko 5 CU/g, standardnom FN metodom nije moguće razlikovati uzorke slada različite kvalitete niti pratiti dinamiku sinteze enzima tijekom sladovanja, jer će svi uzorci s aktivnošću većom od te granice dati praktički identičan rezultat. Zbog toga se u pivarskoj i mlinarskoj kontroli kvalitete α-amilaza slada tradicionalno mjerila isključivo skupljim i dugotrajnijim biokemijskim metodama, poput Ceralpha metode, dok je potencijal brzog i jeftinog reološkog FN testa za tu namjenu ostao neiskorišten (Jukić i sur., 2023). Sličan problem nedostatne osjetljivosti kod uzoraka visoke enzimske aktivnosti dokumentiran je i za srodne, ali koncepcijski različite testove, poput Amylase SD testa, koji je prvotno razvijen kao brzi prediktor kvalitete pekarskih proizvoda iz brašna s umjereno povišenom aktivnošću α-amilaze, a ne iz slada (Mangan i sur., 2016).

2.7.2. Viskografske metode

Ispitivanje želatinizacijskih i retrogradacijskih svojstava škroba te neizravna procjena amilolitičke aktivnosti u brašnu žitarica u suvremenim se laboratorijima prvenstveno provode primjenom rotacijskih viskozimetara s programiranim temperaturnim režimom, među kojima su najznačajniji Rapid Visco Analyser (RVA) i mikro-viskoamilograf (MVA) (**Slika 9**) (Balet i sur., 2019; Rittenauer, Gastl i Becker, 2017). Ovi uređaji predstavljaju značajnu evoluciju u odnosu na klasični Brabenderov amilograf, jer zahtijevaju višestruko manje količine uzorka (svega 3 g u RVA testu te 10-15 g u MVA testu, u odnosu na oko 65 g kod klasičnog amilografa) i omogućuju provedbu cjelokupnog testa u znatno kraćem vremenu (13 do 30 minuta, u usporedbi s oko 2 sata kod klasičnog sustava) (Balet i sur., 2019; Yoshida i Yamada, 1970).

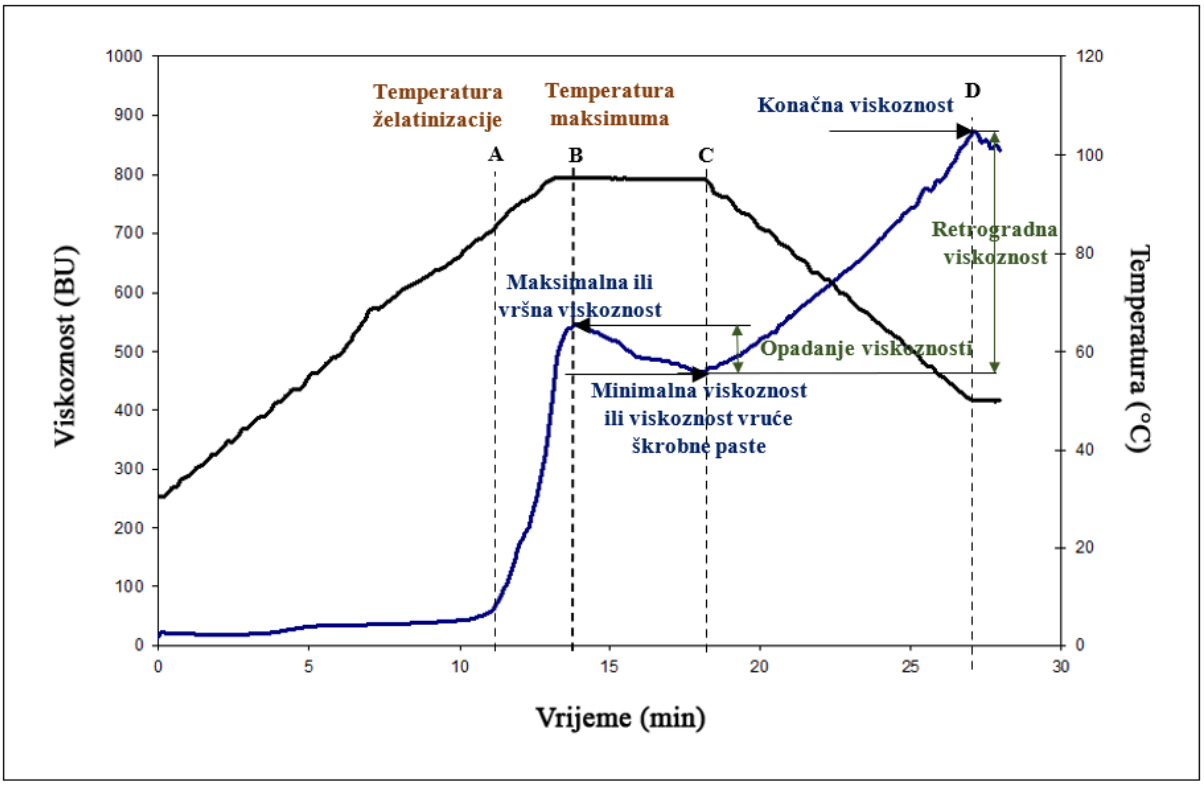
Fizikalni princip rada MVA i RVA temelji se na rotacijskoj viskozimetriji unutar geometrije koncentričnih cilindara (tzv. Couetteovo strujanje), pri čemu se izmjereni zakretni moment potreban za rotaciju miješalice konstantnom brzinom unutar posudice s uzorkom pretvara u dinamičku viskoznost, izraženu u Brabenderovim jedinicama (BU) ili centipoazima (cP, pri čemu je 1 cP = 1 mPa·s) (Rittenauer i sur., 2017).



Slika 9 Brabenderov Mikro-viskoamilograf (Izvor: fotografija autora).

Tijekom testa suspenzija brašna (ili škroba) i vode izložena je definiranom smičnom polju, odnosno konstantnoj brzini rotacije miješalice radi potpune disperzije uzorka (Balet i sur., 2019). Budući da su polumjeri miješalice i posude fiksni geometrijski parametri uređaja, brzina smicanja izravno je linearno ovisna o konstantnoj brzini vrtnje. Održavanje strogo konstantne brzine vrtnje ključno je jer su želatinizirane škrobne paste izrazito nenjutnovske tekućine koje pokazuju pseudoplastično ponašanje (smanjenje viskoznosti s porastom brzine smicanja). Izmjereni otpor strujanju definira se kao smično naprezanje, a dobivena torzijska sila na osovini izravno se pretvara i bilježi kao viskoznost (Balet i sur., 2019).

Standardni temperaturni ciklus u RVA testu uobičajeno započinje temperiranjem vodene suspenzije škroba 1 min na 50 °C, nakon čega slijedi linearno zagrijavanje do 95 °C brzinom od 12 °C/min, zatim zadržavanje 2,5 min pri 95 °C te hlađenje natrag do 50 °C. Kod MVA testa mjerenje viskoznosti započinje pri 30 °C, a temperatura se zatim povećava do 90-95 °C brzinom koja može varirati od 1,5 do 10 °C/min. Nakon toga, slijedi zadržavanje temperature pri 95 °C određeno vrijeme, nakon čega, kao i kod RVA testa, slijedi hlađenje do 50 °C. Često se temperatura još određeno vrijeme zadržava na 90 °C kako bi se ispitala otpornost nastalog gela na daljnje smicanje. Tijekom mjerenja bilježi se kontinuirana krivulja viskoznosti – viskogram ili amilogram (Balet i sur., 2019; Fox i sur., 2014).



Slika 10 Karakteristična krivulja viskoznosti dobivena pomoću Brabenderovog mikro-viskoamilografa (Vlastiti izvor).

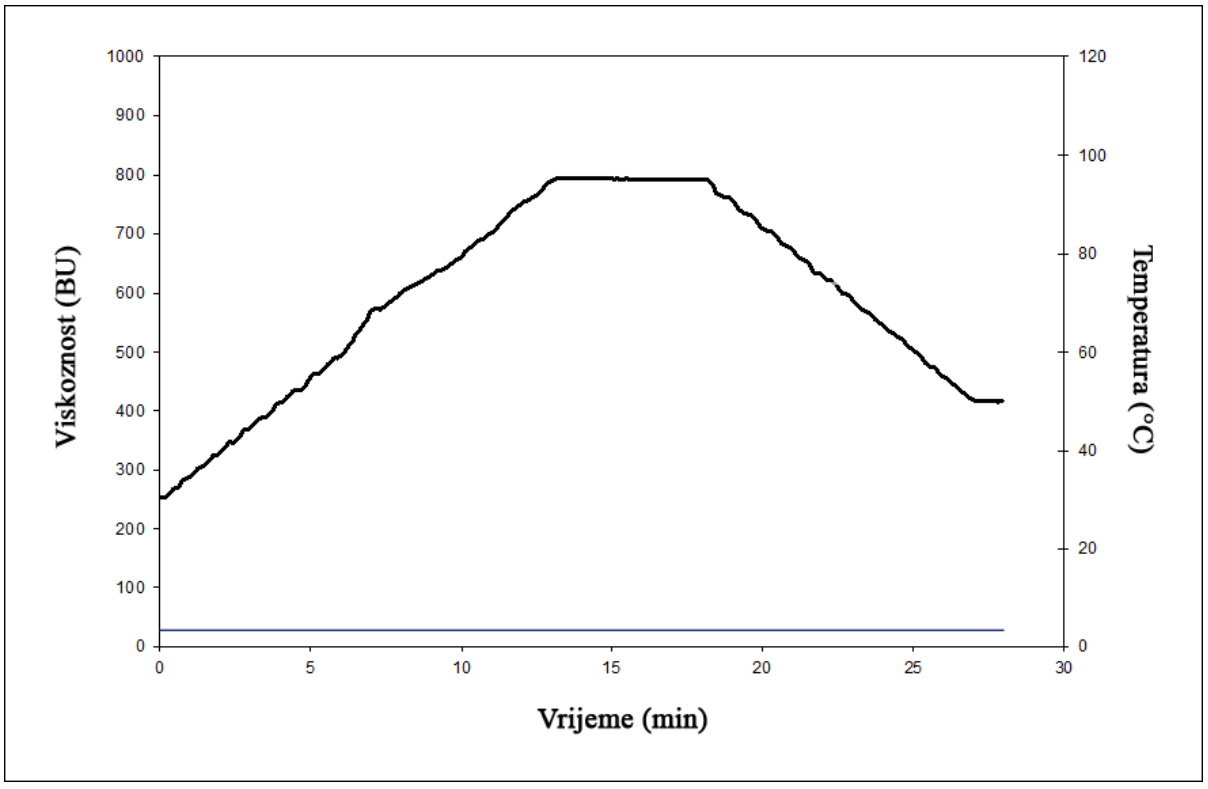
Na krivulji (**Slika 10**) se očitava nekoliko ključnih reoloških parametara s jasno definiranim fizikalno-kemijskim značenjem:

- Temperatura želatinizacije (PT): temperatura pri kojoj viskoznost počinje rasti iznad bazne linije, što označava početak nepovratnog bubrenja škrobnih;
- Temperatura maksimuma (PVT; engl. *Peak viscosity temperature*): temperatura pri maksimalnoj viskoznosti škrobne paste;
- Maksimalna ili vršna viskoznost (PV): najveća postignuta viskoznost tijekom faze zagrijavanja, koja odražava najveći stupanj hidratacije i bubrenja škrobnih granula prije početka njihova mehaničkog i toplinskog raspadanja; vrijednost PV obrnuto je proporcionalna aktivnosti α-amilaze;
- Minimalna viskoznost ili viskoznost vruće škrobne paste (TV; engl. *Trough/Hot paste viscosity*): najniža postignuta viskoznost na kraju faze zadržavanja na 95 °C, rezultat kidanja nabubrenih granula uslijed kontinuiranog smicanja i toplinske degradacije;
- Opadanje viskoznosti (BD; engl. *Breakdown viscosity*, BD = PV − TV): reološki pokazatelj stabilnosti nastalog škrobnog gela pri visokim temperaturama i smicanju;

- Konačna viskoznost (FV; engl. *Final viscosity*): viskoznost na kraju ciklusa hlađenja na 50 °C, koja odražava sposobnost reasocijacije i rekristalizacije izlučenih lanaca amiloze u trodimenzionalnu mrežu (gel) tijekom retrogradacije (Leman i sur., 2005; Rahman i sur., 2021).
- Retrogradna viskoznost (SV = FV – TV; engl. *Setback viscosity*): mjera intenziteta retrogradacije i stvrdnjavanja škrobnog gela (Balet i sur., 2019; Rahman i sur., 2021).

2.7.2.1 Problematika analize sladnih brašna u rotacijskim viskozimetrima

Kao i kod metode broja padanja, izravna viskozimetrijska analiza čistog sladnog brašna u MVA i RVA uređajima nije moguća zbog izrazito visokog enzimskog potencijala slada (Raschke i sur., 1995). Tijekom standardnog temperaturnog programa α-amilaza slada aktivira se znatno prije nego što škrob pšeničnog ili ječmenog brašna postigne temperaturu želatinizacije (Fox i sur., 2014). Kada pojedinačne škrobne granule počnu bubriti i želatinizirati, aktivni ih enzim gotovo trenutačno hidrolizira, čime se sprječava stvaranje viskoznog sustava (Rittenauer i sur., 2017). Posljedično, na viskogramu se ne pojavljuje vrh maksimalne viskoznosti PV, nego se bilježi gotovo ravna crta (**Slika 11**) na razini minimalne viskoznosti uređaja (Raschke i sur., 1995).



Slika 11 MVA amilogram uzorka sladnog brašna s visokom aktivnošću α-amilaze (Vlastiti izvor).

2.8. Kemijska inhibicija amilolitičkih enzima u reološkim mjerenjima

Cerealna α-amilaza je metaloenzim koji sadrži barem jedan strukturno ugrađen ion kalcija (Ca^{2+}) po molekuli, neophodan za stabilizaciju i pravilno prostorno oblikovanje aktivnog mjesta. Ioni kalcija ključni su za strukturnu stabilnost i otpornost α-amilaze na visoke temperature te sudjeluju u procesu vezanja enzima za supstrat. Termostabilnost proizlazi iz interakcije kalcija s lizinskim ostacima unutar proteinske strukture. Prilikom izlaganja povišenim temperaturama proces inaktivacije započinje odvajanjem kalcija od nativne molekule, što u konačnici dovodi do ireverzibilne denaturacije enzima (McCleary i sur., 2002).

Ioni teških metala poput Ag^{+}, Hg^{2+} i Zn^{2+} mogu stupiti u kompeticiju s ionima kalcija, djelomično ih istiskujući iz njihove koordinacijske sfere unutar enzima, čime se dodatno narušava katalitička geometrija aktivnog mjesta i otežava vezanje škrobnog supstrata, odnosno dolazi do inaktivacije enzima. Među različitim kemijskim spojevima, srebrov nitrat ($AgNO_3$) u znanstvenoj se literaturi smatra jednim od najdjelotvornijih i najpouzdanijih inhibitora α-amilaze žitarica (Rahman i sur., 2021). Mehanizam kojim ioni srebra (Ag^{+}) inhibiraju rad α-amilaze je višestruk (Rahman i sur., 2021). Ioni srebra, kao teški metal s visokim afinitetom prema sumporu, reagiraju sa slobodnim sulfhidrilnim (tiolnim, –SH) skupinama cisteinskih ostataka unutar proteinske strukture enzima (Meredith, 1970). Vezanjem iona srebra na slobodne tiolne skupine nastaju stabilni srebrovi merkaptidi (R–S–Ag), što uzrokuje konformacijske promjene u tercijarnoj i kvartarnoj strukturi proteina. Ako se ti cisteinski ostaci nalaze u blizini katalitičkog mjesta ili su ključni za održavanje prostorne geometrije aktivnog mjesta, enzim u velikoj mjeri gubi svoju katalitičku sposobnost (McCleary i Sheehan, 1987).

Zbog toga je jedan od najučinkovitijih pristupa u reološkom istraživanju pšeničnog i ječmenog brašna te slada upravo primjena srebrovog nitrata, odnosno iona srebra, koji specifično blokiraju amilolitički sustav *in vitro*, čime se omogućuje procjena nativnih svojstava škroba bez uplitanja enzimske razgradnje (Fox i sur., 2014; Rittenauer i sur., 2017). Primjena više koncentracije $AgNO_3$ (~20 mM, što odgovara masenoj koncentraciji od približno 1 % m/V) osigurava brzu, robusnu inaktivaciju cjelokupnog amilolitičkog i dijelom proteolitičkog sustava slada, neovisno o visokoj početnoj koncentraciji enzima (Rahman i sur., 2021). Pri takvoj, praktički zasićenoj koncentraciji, višak iona srebra uspješno nadvladava nespecifično vezanje na ostale proteine i omogućuje znatno potpuniju blokadu enzima, čime viskogram slada postaje znatno vjerniji odraz isključivo nativnih fizikalnih svojstava škroba (Fox i sur., 2014; Zhou i Mendham, 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je prilagoditi i modificirati reološke metode određivanja broja padanja (FN) i mikro-viskoamilografskog (MVA) testa radi određivanja aktivnosti α-amilaze u uzorcima sladnog brašna, na način da se dobiveni rezultati mogu lako usporediti s vrijednostima dobivenima standardnim spektrofotometrijskim metodama. Prema tome je postavljena hipoteza i specifični ciljevi istraživanja.

Hipoteza predloženog istraživanja:

- Prilagodbom metoda amilografskog ispitivanja i određivanja broja padanja moguće je odrediti aktivnost α-amilaze u uzorcima sladnog brašna.

S obzirom na hipotezu postavljeni su sljedeći ciljevi:

- Odrediti aktivnost α-amilaze tijekom sladovanja pšenice te stočnog, pivarskog i golozrnog ječma standardnom Ceralpha metodom;
- Opisati kinetiku promjene aktivnosti α-amilaze tijekom sladovanja;
- Odrediti u kojoj mjeri dolazi do hidrolize škroba tijekom sladovanja;
- Prilagoditi metode amilografskog ispitivanja i određivanja broja padanja na sljedeće načine:
    1) korištenjem određenih alikvota sladnog brašna i pšeničnog škroba kao supstrata,
    2) korištenjem ekstrakta sladnog brašna i pšeničnog škroba kao supstrata,
    3) parcijalnom inaktivacijom α-amilaze pomoću otopina srebrovog nitrata različitih koncentracija;
- Metodama regresijske analize razviti model za predviđanje aktivnosti α-amilaze sladnog brašna na osnovi rezultata dobivenih prilagođenim metodama te provesti validaciju novih metoda;
- Usporediti rezultate aktivnosti α-amilaze dobivene standardnom Ceralpha metodom i modificiranim reološkim metodama.

3.2. Materijali

Kao polazni materijal za istraživanja u okviru ovog doktorskog rada korišteni su uzorci triju kultivara ozimog ječma (*Hordeum vulgare* L.) i jednog kultivara ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.), prikupljeni tijekom vegetacijske sezone 2021. godine na lokacijama u Republici Hrvatskoj. Odabrani kultivari ječma bili su: Tristan (pivarski dvoredni ječam, Poljoprivredni

institut Osijek), Zlatko (stočni višeredni ječam, Poljoprivredni institut Osijek) i Osvit (golozrni ječam, Poljoprivredni institut Osijek). Kultivar ozime pšenice bio je Lorena, široko zastupljena krušna pšenica visoke kvalitete, nabavljena od Bc Instituta d.d. Zagreb. Svi uzorci zrna prije analiza skladišteni su u kontroliranim uvjetima niske temperature (4 °C) i relativne vlage zraka kako bi se očuvao njihov fiziološki integritet, spriječila prerana enzimska aktivacija te osigurala ujednačena klijavost prije provođenja pokusa sladovanja.

U reološkim ispitivanjima je kao standardni supstrat visoke viskoznosti korišten referentni pšenični škrob (Denes Natura Kft., Mađarska).

3.3. Metode

3.3.1. Postupak mikrosladovanja

Postupak kontroliranog klijanja i sladovanja uzoraka zrna proveden je u potpuno automatiziranom laboratorijskom uređaju za mikrosladovanje Newmalt Micromalter (Joe White Malting Systems, Adelaide, Australija). Svi uzorci ječma i pšenice sladovani su u dvije odvojene šarže. Proces sladovanja bio je podijeljen u tri osnovne faze: namakanje zrna, klijanje (germinator) i sušenje slada. Za svaki kultivar, količina od 500 g očišćenog zrna podvrgnuta je sljedećem temperaturno-vremenskom režimu:

a) Faza namakanja: Ukupno trajanje namakanja iznosilo je 37 sati pri konstantnoj temperaturi od 16 °C kako bi se postigla vlažnost zrna od približno 44-46%. Primijenjen je kombinirani mokro-suhi postupak koji se sastojao od sljedećih intervala: 5 sati potopljenosti u vodi (mokra faza), 12 sati aeracije (suha faza), 6 sati potopljenosti (mokra faza), 12 sati aeracije (suha faza) te završna 2 sata potopljenosti (mokra faza). Tijekom mokrih faza osigurana je kontinuirana aeracija vode zrakom pod tlakom.

b) Faza klijanja: Nakon završetka faze namakanja zrno je podvrgnuto klijanju s kontroliranom temperaturom od 17 °C i relativnom vlagom zraka od 98%. Klijanje je trajalo ukupno 96 sati (4 dana). Automatski sustav prevrtanja zrna u posudama aktivirao se svakih 2 sata.

c) Faza sušenja i stabilizacije: Kako bi se dobili uzorci s različitim razinama enzimske aktivnosti i pratio kinetički razvoj, poduzorci su izuzimani nakon faze namakanja te nakon svakog od četiri dana klijanja (1., 2., 3. i 4. dan). Izuzeti uzorci odmah su podvrgnuti režimu sušenja u trajanju od 20 sati s progresivnim porastom temperature (5 h pri 60 °C, 12 h pri 65 °C, 2 h pri 70 °C i 1 h pri 80 °C) kako bi se postigla vlažnost zrna od 4–6%.

Primjenom ovog eksperimentalnog protokola za četiri kultivara dobiveno je ukupno 20 jedinstvenih uzoraka slada s različitim, široko rasprostranjenim razinama aktivnosti amilolitičkih enzima, ponajprije endoenzima α-amilaze.

Nakon završetka sušenja ohlađeni suhi uzorci slada prebačeni su u laboratorijsku vibracijsku tresilicu Analysette 3 Pro (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Njemačka) kako bi se mehanički uklonili korjenčići. Na metalno sito s otvorima promjera 1 mm postavljene su tri gumene kuglice, a uzorak je potresan tijekom 5 minuta uz amplitudu vibracija od 2 mm. Očišćeno zrno slada zatim je mljeveno na laboratorijskom mlinu IKA MF-10 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka), opremljenom sitom s otvorima promjera 1,0 mm. Dobiveno sladno brašno sakupljeno je u hermetički zatvorene plastične vrećice i pohranjeno u hladnjaku do trenutka provođenja reoloških i biokemijskih analiza.

3.3.2. Ekstrakcija amilolitičkih enzima iz sladnog brašna

Ekstrakcija amilolitičkih enzima iz uzoraka sladnog brašna provedena je uz prilagodbu standardnog postupka opisanog u AACC International Method 22-02.01 (Ceralpha Method). Točno 7,50 ± 0,01 g sladnog brašna izvagano je u staklenu čašu od 250 mL te dispergirano u 150 mL prethodno temperiranog ekstrakcijskog pufera. Ekstrakcijski malatni pufer (pH 5,4) sadržavao je 1 M natrijev malat, 1 M natrijev klorid, 40 mM kalcijev klorid (kao stabilizator α-amilaze) te 0,1% (w/v) natrijev azid kao antimikrobni konzervan). Čaša s pripremljenom suspenzijom sladnog brašna (koncentracija 5 % w/v) postavljena je na magnetsku miješalicu te inkubirana točno 30 minuta na temperaturi od 40,0 ± 0,1 °C uz stalno miješanje. Nakon završetka ekstrakcije suspenzija je pretočena u plastične epruvete te centrifugirana na laboratorijskoj centrifugi pri 1000 × g tijekom 10 minuta na temperaturi od 20 °C. Bistri supernatant (ekstrakt slada) pažljivo je dekantiran u čiste polipropilenske kivete s čepom te pohranjen u hladnjaku na 4 °C do daljnjih analiza.

3.3.3. Određivanje udjela vlage

Udio vlage u polaznim sirovinama i uzorcima dobivenog sladnog brašna određen je gravimetrijskom metodom sušenja prema standardu HRN EN ISO 712 (ISO, 2015). Točno 5,00 ± 0,01 g uzorka brašna izvagano je u aluminijske posudice i sušeno u laboratorijskom sušioniku na temperaturi od 130 ± 1 °C tijekom 2 sata. Nakon sušenja posudice su ohlađene u eksikatoru

do sobne temperature te izvagane. Udio vlage izražen je u masenim postocima (%, w/w). Sve analize provedene su u tri tehnička ponavljanja.

3.3.4. Određivanje udjela ukupnog škroba

Udio škroba u uzorcima određen je primjenom standardne enzimske metode prema AACC International Method 76-13.01 (AACC, 2010), korištenjem komercijalnog enzimskog testa za analizu škroba (Total Starch Assay Kit, Megazyme International, Bray, Irska). Metoda se temelji na dvostupanjskoj enzimskoj hidrolizi škroba do D-glukoze. U prvom stupnju škrob se želatinizira i djelomično depolimerizira u prisutnosti termostabilne α-amilaze pri pH 7,0 na 100 °C. U drugom stupnju nastali maltodekstrini kvantitativno se hidroliziraju do slobodne D-glukoze pomoću visoko pročišćene amiloglukozidaze na 50 °C tijekom 30 minuta. Koncentracija oslobođene D-glukoze određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini 510 nm nakon reakcije s glukoza-oksidaza-peroksidaznim (GOPOD) reagensom. Udio škroba preračunat je i izražen u postocima na suhu tvar sladnog brašna (% s.t.). Sve analize provedene su u najmanje dva tehnička ponavljanja za svaku šaržu uzoraka slada.

3.3.5. Određivanje aktivnosti α-amilaze Ceralpha metodom

Kvantitativno određivanje aktivnosti α-amilaze u svim pripremljenim uzorcima sladnog brašna provedeno je prema standardiziranoj spektrofotometrijskoj metodi AACC International Method 22-02.01 (odnosno AOAC Method 2002.01 i ICC Standard br. 303), uz primjenu specijaliziranog enzimskog testa (Ceralpha Alpha-Amylase Assay Kit, Megazyme International, Bray, Irska).

Sladno brašno (0,25 g) pomiješano je s 50 ml ekstrakcijskog pufera (NaCl (1 %) + $CaCl_2$ (0,02%)) te je provedena ekstrakcija u kiveti 15 20 min pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Nakon ekstrakcije kivete su se centrifugirale 10 min pri 1000 x g. Supernatant (0,25 ml) se dodatno razrijeđivao s 4,75 ml ekstrakcijskog pufera. Nakon toga, 0,1 ml supstrata koji se sastoji od α-glukozidaze i BPNPG7 (Amylase HR Reagent) otpipetirano je na dno staklenih kiveta i inkubiramo u kupelji 5 min pri 40 °C. U isto vrijeme pripremljeni ekstrakti uzoraka su također inkubirani pri istim uvjetima. Nakon 5 min 0,1 ml ekstrakata uzoraka dodani su u kivete u kojima se nalazi Amylase HR Reagent te je provedena inkubacija još točno 10 min. Reakcija je prekinuta dodatkom 1,5 ml alkalnog zaustavnog reagensa koji se sastojao od 2%

(w/v) otopine tri-natrijevog fosfata (pH ≈ 11,0) pri čemu nastaje žuto obojenje. Izmjerena je apsorbancija otopine na valnoj duljini od 400 nm pomoću UV–VIS spektrofotometra UV-1280 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Aktivnost α-amilaze izračunata je na temelju specifičnog koeficijenta ekstinkcije oslobođenog p-nitrofenola u lužnatom mediju te je izražena u Ceralpha jedinicama po gramu suhe tvari uzorka sladnog brašna (CU/g s.t.). Sve analize provedene su u najmanje dva tehnička ponavljanja za svaku šaržu uzoraka slada.

3.3.6. Modifikacija metode određivanja broja padanja (FN)

Metoda određivanja broja padanja (FN) prema Hagberg-Pertenu standardno je namijenjena analizi pšeničnog brašna radi detekcije priježetvenog klijanja, pri čemu su razine α-amilaze relativno niske (Hagberg, 1960; Perten, 1964). Budući da je enzimska aktivnost u sladnom brašnu ekstremno visoka, izravna primjena standardne FN metode (AACC International Method 56-81.03, ISO 3093:2009) na čistom sladu dovodi do trenutačne likvefakcije škrobne paste, pri čemu miješalica slobodno propada bilježeći donju fizičku granicu detekcije uređaja od 61 s. Za premošćivanje ovog ograničenja u ovom je radu razvijen i validiran modificirani reološki postupak u kojem je kao standardni reološki supstrat visoke viskoznosti korišten referentni pšenični škrob (Denes Natura Kft., Mađarska). Prethodno je utvrđeno da čisti pšenični škrob u količini od 6,00 g (na bazi 14 % vlage) s 25 mL destilirane vode daje stabilnu i ponovljivu FN vrijednost od 350 ± 5 s. Modifikacija metode provedena je na uređaju Perten FN 1500 (Perten Instruments AB, Hägersten, Švedska) kroz dva različita reološka postupka:

Postupak 1 (zamjena dijela škroba sladnim brašnom): u ovom je postupku dio standardnog pšeničnog škroba zamijenjen alikvotima sladnog brašna, pri čemu je ukupna suha tvar u epruveti održavana konstantnom na bazi 6,00 g (14 % vlage). Ispitane su četiri razine dodane mase sladnog brašna: 0,05 g, 0,10 g, 0,20 g i 0,30 g.

Postupak 2 (zamjena dijela vode vodenim ekstraktom slada): u ovom postupku kao reološki supstrat korišteno je točno 6,00 g pšeničnog škroba, dok je dio dodane destilirane vode (ukupno 25 mL) zamijenjen određenim volumenom vodenog ekstrakta slada (5 % w/v) pripremljenog prema prethodno opisanom postupku u poglavlju 3.3.2. Ispitano je sedam različitih volumena alikvota ekstrakta slada: 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL, 5,0 mL i 6,0 mL. Ostatak vode do ukupnog volumena od 25 mL nadopunjen je čistom destiliranom vodom.

Nakon dodavanja svih komponenti u staklenu epruvetu za FN ispitivanje, epruveta je zatvorena gumenim čepom te snažno mehanički protrešena 25 puta u uspravnom položaju kako bi se

dobila potpuno homogena suspenzija bez grudica škroba. Standardna viskometrijska miješalica ubačena je u epruvetu, a cijeli je sklop postavljen u kipuću vodenu kupelj FN uređaja. Nakon automatske zadrške od 5 sekundi započelo je mehaničko miješanje frekvencijom od 2 hoda u sekundi, koje je trajalo točno 55 sekundi (ukupno 60 s). Nakon isteka 60. sekunde miješalica je automatski podignuta u najviši položaj te puštena da slobodno pada pod vlastitom težinom. Ukupno vrijeme od trenutka uranjanja epruvete u vodenu kupelj do trenutka kada miješalica propadne na dno epruvete kroz ukapljenu škrobnu pastu zabilježeno je kao vrijednost FN izražena u sekundama. Osim FN vrijednosti u kasnijoj statističkoj obradi korišten LN vrijednost dobivena preračunavanjem iz FN vrijednosti. Sve analize provedene su u najmanje četiri tehnička ponavljanja za svaku šaržu uzoraka slada.

3.3.7. Modifikacija mikro-viskoamilografskog (MVA) testa

Slično kao i kod metode broja padanja, u ovom je radu razvijena i validirana modificirana MVA metoda u kojoj je kao reološki supstrat korišten standardni pšenični škrob (Denes Natura Kft., Mađarska) (PV = 675 BU, FV = 937 BU, SV = 585 BU) kako bi se uspostavio osjetljiv i precizan reološki sustav.

Priprema uzoraka i suspenzije izvedena je kroz dva paralelna modificirana postupka:

Postupak 1 (zamjena dijela škroba sladnim brašnom): Točna masa od 12,00 ± 0,01 g standardnog pšeničnog škroba (14% vlage) izmjerena je i prenesena u mjernu posudicu MVA uređaja. Uzorak škroba supstituiran je alikvotima sladnog brašna u količinama od 0,05 g, 0,10 g i 0,20 g. Količina dodane destilirane vode iznosila je točno 102,00 g.

Postupak 2 (dodatak sladnog ekstrakta): u mjernu posudicu odvagano je točno 12,00 g pšeničnog škroba, pri čemu je dio destilirane vode zamijenjen alikvotima prethodno pripremljenog ekstrakta slada. Ispitani su sljedeći volumeni ekstrakta: 0,25 mL, 0,50 mL, 1,00 mL, 2,00 mL i 3,00 mL. Ostatak do ukupno 102,00 g suspenzije nadopunjen je destiliranom vodom.

Mjerenje reoloških svojstava u MVA posudici izvedeno je pod stalnim brojem okretaja mjerne miješalice od 250 rpm mjernim rasponom od 300 cmg te točno definiranim temperaturnim profilom:

- početna temperatura: 30 °C
- brzina zagrijavanja: 5 °C/min
- završna temperatura zagrijavanja: 95 °C

- vrijeme zadržavanja na 95 °C: 5 min
- brzina hlađenja: 5 °C/min
- završna temperatura hlađenja: 50 °C
- vrijeme zadržavanja na 50 °C: 1 min

S dobivenih amilografskih krivulja očitani su sljedeći ključni reološki parametri: početna temperatura želatinizacije (PT, °C), maksimalna viskoznost (PV, BU), minimalna viskoznost vruće paste (TV, BU), konačna viskoznost (FV, BU) te su izračunati opadanje viskoznosti (SV = FV – TV, BU) i retrogradna viskoznost (SV = PV – TV, BU).

Sve analize provedene su u najmanje dva tehnička ponavljanja za svaku šaržu uzoraka slada.

3.3.8. Metode inaktivacije amilolitičkog sustava pomoću srebrovog nitrata ($AgNO_3$)

U ovom su istraživanju definirana dva režima inaktivacije amilolitičkih enzima: potpuna i parcijalna. Za potpunu inaktivaciju enzima sladnog brašna pri FN i MVA ispitivanjima korištena je otopina $AgNO_3$ koncentracije 20 mM. Ova koncentracija omogućila je točnu procjenu nativnih fizikalno-kemijskih i reoloških svojstava škroba slada bez utjecaja amilolitičkih enzima na rezultate mjerenja.

Preliminarno su za parcijalnu kemijsku inaktivaciju α-amilaze u sladnom brašnu korištene otopine $AgNO_3$ u širokom rasponu koncentracija (10, 5, 4, 3, 2, 1 i 0,5 mM). Na temelju tih rezultata za regresijsko modeliranje postotne razlike u odnosu na rezultate mjerenja FN i MVA pri potpunoj inaktivaciji enzima (20 mM $AgNO_3$) izabrana je koncentracija $AgNO_3$ od 1 mM. Prema tome, u FN testu umjesto 25 mL vode korišteno je 25 mL otopine $AgNO_3$ (20 mM i 1 mM), a u MVA testu cjelokupna količina vode (102 mL) zamijenjena je istim otopinama.

Analize su provedene prema prethodno opisanim posupcima u poglavljima 3.3.6. i 3.3.7.

3.3.9. Statistička obrada podataka

Radi ispitivanja statističke značajnosti razlika između uzoraka i sorti u različitim fazama sladovanja provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), a srednje vrijednosti uspoređene su Tukeyevim HSD post-hoc testom uz razinu značajnosti $p < 0,05$. Povezanost između aktivnosti α-amilaze izmjerene standardnom Ceralpha metodom i reoloških parametara

dobivenih modificiranim metodama (FN i MVA) procijenjena je pomoću Pearsonovih koeficijenata korelacije (*r*).

Za izradu prediktivnih regresijskih modela za predviđanje aktivnosti α-amilaze (CU/g) primijenjena je linearna regresija u slučaju korištenja likvefakcijskog broja (LN) te nelinearna eksponencijalna regresijska analiza za FN vrijednosti i MVA parametre.

Podudarnost između standardne spektrofotometrijske Ceralpha metode i razvijenih modificiranih reoloških metoda procijenjena je Bland-Altmanovom metodom ponovljenih mjerenja (Bland i Altman, 1999). Izračunata su sustavna odstupanja (engl. *bias*, CU/g), standardna pogreška odstupanja (SE_B), 95%-tni intervali pouzdanosti odstupanja (CI_B), gornja granica kvantifikacije (*ULOQ*; engl. *Upper limit of quantification*) te standardna devijacija ponovljivosti (s_r). Sve statističke analize provedene su pomoću računalnih programa Statistica ver. 14.0.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, SAD) i XLSTAT ver. 2019.2 (Addinsoft, New York, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Svojstva sladnog brašna

Provedena istraživanja u okviru ovog doktorskog rada pokazala su da sadržaj škroba u ječmu i pšenici značajno opada tijekom procesa sladovanja, što je izravan rezultat aktivacije amilolitičkih enzima, ponajprije *de novo* sintetizirane α-amilaze i nativne β-amilaze. U **Tablici 3** prikazane su promjene u udjelu škroba i postotku hidrolize škroba (HŠ) kroz ključne faze procesa sladovanja (zrno prije sladovanja, namakanje i četiri dana klijanja) pri čemu se jasno ističe procesni tijek biokemijskih promjena i njihov opseg, ali i specifičnosti pojedinih ispitivanih uzoraka. Rezultati praćenja hidrolize škroba tijekom sladovanja otkrivaju značajne razlike u dinamici razgradnje škroba između ispitivanih uzoraka ječma i pšenice.

Tablica 3 Udio škroba u uzorcima ječma i pšenice tijekom sladovanja

Uzorak		Stočni ječam „Zlatko“		Golozrni ječam „Osvit“		Pivarski ječam „Tristan“		Ozima pšenica „Lorena“	
		Škrob* (%)	HŠ** (%)	Škrob (%)	HŠ (%)	Škrob (%)	HŠ* (%)	Škrob (%)	HŠ (%)
Zrno		58,9 ± 0,12^{a}	0,0	65,5 ± 0,04^{a}	0,0	64,0 ± 0,22^{a}	0,0	66,6 ± 0,11^{a}	0,0
Namakanje		53,9 ± 0,33^{b}	8,4	57,8 ± 0,52^{b}	11,8	59,9 ± 0,21^{b}	6,5	55,1 ± 0,42^{b}	17,3
Klijanje	1. dan	34,2 ± 0,19^{c}	42,0	38,2 ± 0,72^{c}	41,7	40,4 ± 0,75^{c}	36,9	47,1 ± 0,21^{c}	29,4
	2. dan	24,7 ± 0,48^{d}	58,1	35,0 ± 0,76^{cd}	46,6	35,8 ± 0,92^{d}	44,1	40,4 ± 0,39^{d}	39,4
	3. dan	23,3 ± 0,39^{d}	60,4	36,6 ± 0,47^{cd}	44,2	33,6 ± 0,21^{d}	47,5	39,6 ± 0,34^{d}	40,5
	4. dan	23,1 ± 0,52^{d}	60,8	34,3 ± 0,99^{d}	47,7	32,9 ± 0,34^{d}	48,6	39,5 ± 0,24^{d}	40,7

*Vrijednosti označene istim slovima u stupcu nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Tukeyevom HSD testu
**HŠ – hidroliza škroba

Udio škroba u zrnu prije sladovanja bio je najveći u pšenici (Lorena) i iznosio je 66,6 %, zatim u golozrnom ječmu (Osvit) 65,5 % i pivarskom ječmu (Tristan) 64,0 %, a najmanji u stočnom ječmu (Zlatko) 58,9 %. Značajno je početno smanjenje udjela škroba već u fazi namakanja, što posebno dolazi do izražaja kod pšenice (Lorena) s čak 17,3 % hidrolize već u ovoj najranijoj fazi. Takva intenzivna razgradnja škroba tijekom namakanja može ukazati na raniju aktivaciju enzimskog sustava kod pšenice, kao i na veću dostupnost škroba za hidrolizu već u početnim fazama, što je moguće posljedica kemijskih svojstava pšenice koje se razlikuju od ječma. Najmanji intenzitet hidrolize škroba tijekom namakanja (6,5 %) izmjeren je za pivarsku sortu (Tristan).

Najintenzivniji proces hidrolize zabilježen je kod stočnog ječma (Zlatko) gdje se uočava značajno opadanje udjela škroba sa 58,9 % u nesladovanom zrnu na 23,1 % u sladu nakon četiri dana klijanja, što predstavlja ukupan stupanj hidrolize od 60,8 % u odnosu na sadržaj škroba u

nesladovanom zrnu. Ovaj stupanj hidrolize škroba je vrlo visok i implicira snažnu enzimsku aktivnost, posebice α-amilaze, koja se brzo i efikasno aktivira u ovoj sorti. Sličan trend, iako s nešto nižim intenzitetom, opažamo i kod pivarskog ječma (Tristan) te golozrnoga ječma (Osvit). U njihovom slučaju hidroliza se kreće oko 48%, a udio škroba nakon 4 dana klijanja 32,9 % (Tristan) i 34,3 % (Osvit). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima Stanleya i sur. (2011) koji su utvrdili da se nakon 8 dana klijanja udio škroba u ječmu smanjio za 30 do 40 %. Međutim, oni u svom istraživanju nisu koristili klasično sladovanje ječma nego su klijanje proveli na navlaženom filter papiru. S druge strane, Vinje i sur. (2015) utvrdili su razinu hidrolize škroba od samo 16 % nakon 5 dana klijanja tijekom postupka sladovanja.

Pšenica (Lorena) pokazala je najmanji intenzitet hidrolize s konačnim vrijednostima udjela škroba od 39,5 % te hidrolizi škroba od 40,7 %, što ukazuje na drugačiji mehanizam regulacije enzimske aktivnosti u odnosu na ječam. Značajne razlike u intenzitetu hidrolize škroba između pšenice i ječma, ali i između pojedinih sorti ječma mogu se pripisati, ne samo različitoj brzini sinteze amilolitičkih enzima, nego i strukturalnim razlikama endosperma te razlikama u omjerima amiloze i amilopektina pojedinih sorti (Chu i sur., 2014). Sporija hidroliza škroba u uzorcima koji sadrže više amiloze potvrđena je i u istraživanju drugih autora (Li i sur. (2007), Zhu (2017), You i Izydorczyk (2007)). Budući da je amilopektin razgranat i ima znatno veći broj nereducirajućih krajeva, on se hidrolizira brže i učinkovitije, dok je razgradnja amiloze sporija, naročito u uvjetima niže temperature i u prisutnosti ograničenog broja pristupnih mjesta za enzime.

Statistička analiza Tukeyevim HSD testom potvrdila je da su promjene tijekom vremena značajne unutar svake sorte ($p < 0,05$), iako hidroliza škroba nakon 2. dana klijanja značajno usporava kod svih promatranih uzoraka. Unatoč kontinuiranom porastu aktivnosti α-amilaze tijekom sladovanja, osobito između 2. i 4. dana klijanja (**Tablica 4** i **Slika 12**), uočeno je da se intenzitet hidrolize škroba u toj fazi postupno usporava, a u nekim slučajevima i stabilizira (**Tablica 3**). Ovaj fenomen posebno je izražen kod stočnog i pivarskog ječma (Zlatko i Tristan), gdje α-amilazna aktivnost doseže vrlo visoke vrijednosti, ali se razgradnja škroba između trećeg i četvrtog dana gotovo zaustavlja. Moguće objašnjenje za ovu pojavu je povratna inhibicija α-amilaze produktima njezine vlastite katalize, prvenstveno glukozom i maltozom. Prema Hill i sur. (1997), visoke koncentracije jednostavnih šećera mogu značajno smanjiti aktivnost α-amilaze, a vjerojatan uzrok tome je osmotski učinak uzrokovan vrlo visokim koncentracijama šećera koji smanjuju aktivitet vode u blizini enzimsko-škrobnog kompleksa. Slično tome, Vernon-Carter i sur. (2019) matematičkim modeliranjem pokazali su da glukoza već pri

relativno niskim koncentracijama inhibira daljnju hidrolizu škroba, osobito u kasnijim fazama kada se enzimi natječu s nakupljenim šećerima za vezna mjesta na škrobnim granulama. U kontekstu našeg istraživanja, ovaj mehanizam može objasniti diskrepanciju između visoke aktivnosti α-amilaze i zaustavljanja razgradnje škroba, osobito nakon 2. dana klijanja. Škrob koji preostaje u ovoj fazi vjerojatno se nalazi u manje pristupačnim strukturama, dok istovremeno prisutni šećeri inhibiraju daljnje enzimsko djelovanje. Ovaj efekt vjerojatno je izraženiji kod uzoraka ječma s većom ukupnom razgradnjom škroba, gdje se koncentracije slobodnih šećera akumuliraju brže i dosežu prag inhibicije enzima. U svakom slučaju, dobiveni rezultati pokazuju važnost praćenja procesa u svim fazama sladovanja za svaki pojedini uzorak jer poznavanje utjecaja različitih faktora, poput kemijskog sastava, enzimske aktivnosti i morfologije zrna, može olakšati optimiranje efikasnosti sladovanja.

Tablica 4 Aktivnost α-amilaze u uzorcima sladnog brašna određena Ceralpha metodom

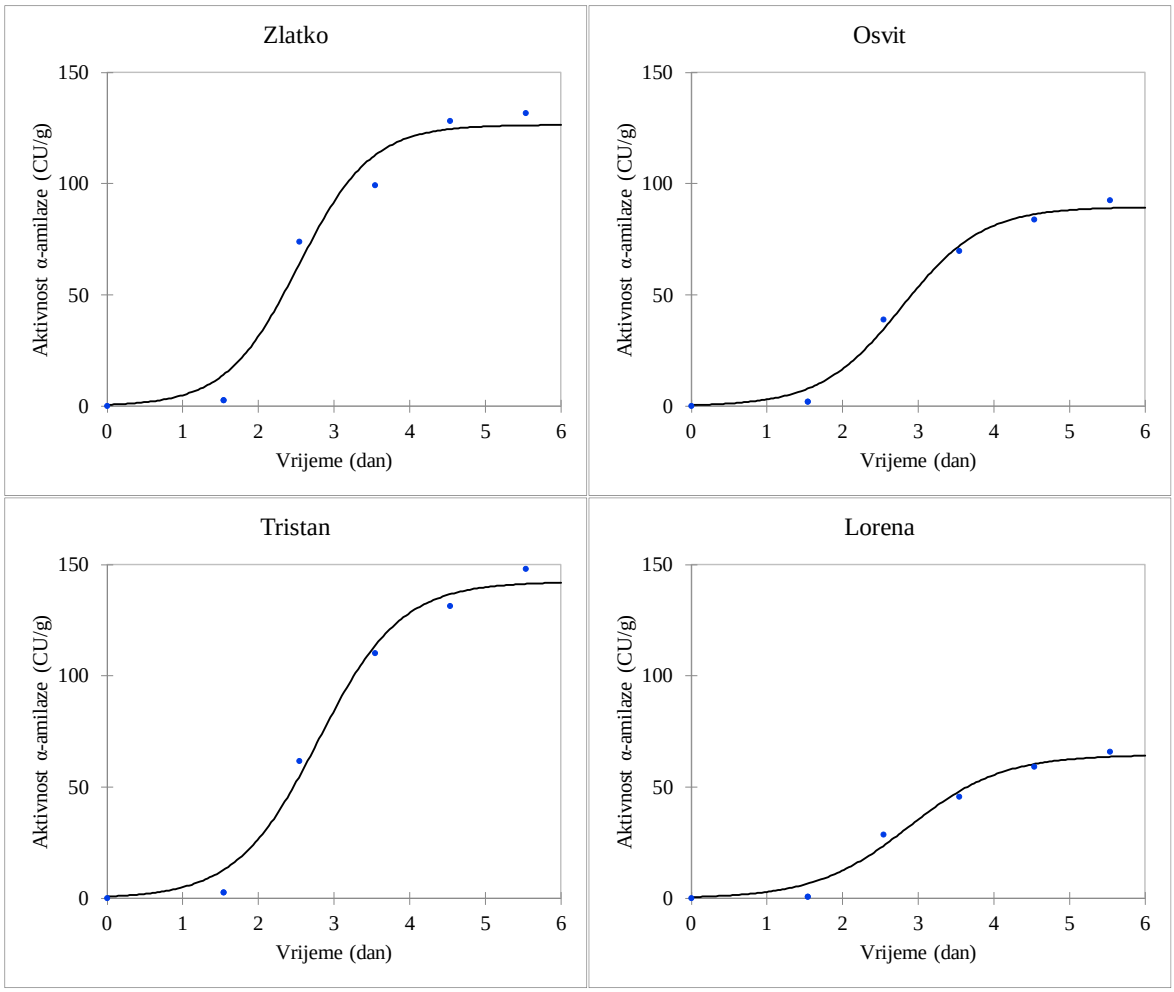
Uzorak		Stočni ječam „Zlatko“ (CU/g)*	Golozrni ječam „Osvit“ (CU/g)	Pivarski ječam „Tristan“ (CU/g)	Ozima pšenica „Lorena“ (CU/g)
Zrno		0,0 ± 0,00^{e}	0,0 ± 0,02^{e}	0,1 ± 0,04^{e}	0,1 ± 0,01^{e}
Namakanje		2.5 ± 0.26^{e}	1.8 ± 0.20^{e}	2.7 ± 0.23^{e}	0.6 ± 0.26^{e}
Klijanje	1. dan	73.8 ± 0.38^{d}	38.7 ± 3.77^{d}	61.5 ± 3.33^{d}	28.4 ± 1.61^{d}
	2. dan	99.2 ± 1.32^{c}	69.6 ± 1.80^{c}	110.0 ± 0.28^{c}	45.5 ± 0.93^{c}
	3. dan	127.9 ± 1.48^{b}	83.7 ± 0.42^{b}	131.2 ± 5.69^{b}	59.0 ± 2.10^{b}
	4. dan	131.4 ± 0.81^{a}	92.5 ± 2.19^{a}	147.9 ± 3.29^{a}	65.8 ± 1.43^{a}

*Vrijednosti označene istim slovima u stupcu nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Tukeyevom HSD testu

U **Tablici 4** prikazani su rezultati određivanja aktivnosti α-amilaze pomoću Ceralpha metode (CU/g) kroz iste faze sladovanja kao što je praćena i hidroliza škroba, što je ključno za razumijevanje enzimske kinetike hidrolize škroba. Rezultati su pokazali da aktivnost α-amilaze značajno raste od gotovo zanemarivih vrijednosti u zrnu (<0,1 CU/g), preko malih aktivnosti tijekom namakanja, do izrazito visokih vrijednosti u fazama klijanja.

Najveći porast aktivnosti zabilježen je kod stočnog ječma (Zlatko), pivarskog ječma (Tristan) i golozrnog ječma (Osvit), dok je ozima pšenica (Lorena) pokazala najnižu ukupnu amilolitičku aktivnost tijekom čitavog procesa. Porast aktivnosti α-amilaze bio je najintenzivniji između 1. i 3. dana klijanja, što je vidljivo i na **Slici 12**, gdje promjene aktivnosti α-amilaze prate sigmoidalnu krivulju. Ova nelinearna kinetika odražava biološki reguliran proces aktivacije enzima tijekom klijanja, s naglim porastom enzimske aktivnosti nakon inicijalne indukcije. Kod ječma, naročito sorte Tristan, zabilježena je najviša maksimalna aktivnost α-amilaze (147,9

CU/g), dok je kod pšenice Lorena ta vrijednost bila gotovo dvostruko niža (65,8 CU/g), što potvrđuje prethodne rezultate o nižoj enzimatskoj aktivnosti pšenice u odnosu na ječam tijekom sladovanja.



Slika 12 Kinetika promjene aktivnosti α-amilaze u uzorcima sladnog brašna (Rezultati nelinearne logističke regresije sigmoidalnog tipa)

Kod sorte „Zlatko“, aktivnost α-amilaze raste s 2,5 CU/g nakon faze namakanja na 131,4 CU/g nakon 4. dana klijanja, što jasno ilustrira snažan enzimatski odgovor i potvrđuje visoku vrijednost ove sorte. Visoka aktivnost α-amilaze na kraju sladovanja u sortama Tristan i Zlatko ukazuju na njihovu dobru kvalitetu u pogledu amilolitičke aktivnosti slada, što može imati implikacije na njihovo uspješno korištenje u daljnjim industrijskim procesima. Slične rezultate su u svom istraživanju promjene aktivnosti α-amilaze tijekom sladovanja ječma i pšenice dobili i Kalb i sur. (2020). Oni su također utvrdili da su početne aktivnosti α-amilaze u nesladovanom zrnu bile vrlo male (0,01−0,04 CU/g), dok su nakon sladovanja aktivnosti u ječmenom sladu bile značajno veće (119,0 – 202,0 CU/g) nego u pšeničnom (23,9 – 56,8 CU/g). Bera, Sabikhi

i Singh (2018) izmjerili su vrijednosti aktivnosti α-amilaze u nekoliko indijskih sorti ječmenog slada koje su se kretale od 149,4 do 223,8 CU/g, a Duke i Henson (2018) od 62,8 do 70,0 CU/g, što također potvrđuje izmjerene vrijednosti u ovom istraživanju. Veću aktivnost α-amilaze u ječmenom u odnosu na pšenični slad ustanovio je u svom istraživanju Bhatty (1996), koji je osim toga zaključio i da slad sorti golozrnog ječma ima nešto manju aktivnost α-amilaze u odnosu na slad pljevičastih sorti.

Tablica 5 Kinetika promjene aktivnosti α-amilaze u uzorcima sladnog brašna (Rezultati nelinearne logističke regresije sigmoidalnog tipa)

Uzorak	Stočni ječam „Zlatko“ (CU/g)*	Golozrni ječam „Osvit“ (CU/g)	Pivarski ječam „Tristan“ (CU/g)	Ozima pšenica „Lorena“ (CU/g)
Koeficijent brzine porasta aktivnosti	$2,1 \pm 0,09^{a}$	$1,9 \pm 0,25^{ab}$	$1,9 \pm 0,10^{ab}$	$1,6 \pm 0,00^{a}$
Poluvrijeme porasta aktivnosti (dani)	$2,5 \pm 0,02^{b}$	$2,8 \pm 0,16^{a}$	$2,8 \pm 0,05^{a}$	$2,9 \pm 0,03^{a}$
Maksimalna aktivnost (CU/g)	$126,4 \pm 1,25^{b}$	$89,6 \pm 3,09^{c}$	$142,2 \pm 5,30^{a}$	$64,5 \pm 1,55^{d}$

*Vrijednosti označene istim slovima u retku nisu statistički značajno različite ($p < 0,05$) prema Tukeyevom HSD testu

U **Tablici 5** prikazana je kvantitativna procjena kinetike porasta aktivnosti α-amilaze pomoću logističke regresije. Rezultati su pokazali da je najbrži porast aktivnosti ostvaren kod stočnog ječma (Zlatko), sa statistički značajno ($p < 0,05$) višim koeficijentom brzine (2,1) i najkraćim poluvremenom porasta aktivnosti α-amilaz (2,5 dana). S druge strane, pšenica (Lorena) imala je najsporiji porast aktivnosti (koeficijent 1,6) i najduže poluvrijeme porasta aktivnosti (2,9 dana). Maksimalna postignuta aktivnost također je bila najniža kod pšenice (64,5 CU/g), što u znatnoj mjeri objašnjava zašto je hidroliza škroba u ovom uzorku bila slabijeg intenziteta, kako je prikazano u **Tablici 3**. Korištenjem parametara logističke regresije iz **Tablice 5** moguće je kvantitativno razlikovati sorte po njihovoj sposobnosti za enzimsku razgradnju škroba, što može biti ključno za odabir optimalnog materijala u tehnološkim procesima proizvodnje slada.

Korelacija između aktivnosti α-amilaze i hidrolize škroba prikazana u **Tablici 6** dodatno potvrđuje ovu povezanost. Kod stočnog ječma (Zlatko), koeficijent korelacije $r = 0,966$ ukazuje na vrlo visoku pozitivnu vezu, čime se jasno potvrđuje ključna uloga α-amilaze u razgradnji škroba tijekom sladovanja. Kod pivarskog ječma (Tristan) korelacija je također bila visoka ($r = 0,918$), dok su kod golozrnog ječma (Osvit) i pšenice (Lorena) bile nešto niža ($r = 0,833$ i $r = 0,842$), što može sugerirati ulogu drugih enzima poput β-amilaze ili granične dekstrinaze, ali i utjecaj strukturnih svojstava zrna na dostupnost škroba (Arends i sur, 1995). Ovi rezultati

slični su i rezultatima istraživanja Dukea i Hensona (2009) koji su utvrdili da povećanje sadržaja ukupnih šećera u sladu tijekom sladovanja, koje služi kao pokazatelj intenziteta hidrolize škroba, mnogo bolje korelira s aktivnošću α-amilaze (r = 0,830), nego s aktivnošću β-amilaze (r = 0,665) i granične dekstrinaze (r = 0,785).

Tablica 6 Pearsonove korelacije između stupnja hidrolize škroba (%) i aktivnosti α-amilaze tijekom sladovanja

Uzorak	*r*
Zlatko	0,966
Osvit	0,833
Tristan	0,918
Lorena	0,842

Zanimljivo je primijetiti da, iako je u pšenici tijekom namakanja utvrđena najveća hidroliza škroba (**Tablica 3**), njezina ukupna razgradnja škroba nakon 4. dana klijanja bila je najniža (40,7 %), što se podudara s najnižim intenzitetom aktivnosti α-amilaze te implicira drugačije mehanizme regulacije enzimske aktivnosti u odnosu na ječam. Ovo ukazuje da je rana aktivacija enzimskog sustava kod pšenice možda bila brža, ali nije bila dovoljna za učinkovitu hidrolizu kompleksnijih škrobnih struktura tijekom klijanja. Jedan od razloga za to mogao bi biti i nešto viši udio amiloze u pšenici u usporedbi s ječmom, koji dodatno otežava djelovanje α-amilaze na škrobne granule. Ove značajne razlike u intenzitetu razgradnje škroba između pšenice i ječma mogu se pripisati specifičnostima strukture endosperma, različitoj brzini sinteze i raspodjele amilolitičkih enzima, ali i strukturalnim razlikama u samim škrobnim granulama, posebice omjeru amiloze i amilopektina (Chu i sur., 2014). Amilopektin je visoko razgranat i posjeduje znatno veći broj nereducirajućih krajeva, što ga čini lakše dostupnim i podložnijim brzoj enzimskoj hidrolizi u usporedbi s linearnom i gusto pakiranom amilozom (Zhu, 2017).

U kontekstu enzimske hidrolize škroba tijekom sladovanja, važno je naglasiti funkcionalnu razliku između dvaju glavnih amilolitičkih enzima: β-amilaze, koja je već prisutna u nativnom zrnu, i α-amilaze, koja se *de novo* sintetizira tijekom klijanja (Bwanganga, Béra i Philippe, 2012). U ranim fazama sladovanja (tijekom namakanja i početka klijanja), β-amilaza preuzima glavnu ulogu u inicijalnoj razgradnji škroba, osobito u hidrolizi amilopektina do maltoze i graničnih dekstrina, dok α-amilaza dominira u kasnijim fazama. Ove tvrdnje može potvrditi i istraživanje Kalba i sur. (2020) koji su utvrdili da je aktivnost β-amilaze čak bila veća u polaznom nesladovanom zrnu ječma i pšenice nego u sladu, dok je s druge aktivnost α-amilaze u nesladovanom zrnu bila vrlo niska, a tijekom sladovanja je značajno rasla. Slične rezultate

dobili su u svom istraživanju i Georg-Kraemer, Mundstock i Cavalli-Molina (2001) u kojem nisu utvrdili statistički značajno povećanje aktivnosti β-amilaze tijekom sladovanja ječma, dok su vrijednosti za aktivnost α-amilaze značajno rasle.

Rezultati ovog rada potvrđuju ovu dinamiku. Kod svih uzoraka zabilježena je određena razina hidrolize škroba već nakon namakanja (**Tablica 3**), iako je aktivnost α-amilaze u toj fazi bila gotovo zanemariva (**Tablica 4**). To implicira da je hidroliza u ranim fazama pretežno rezultat aktivnosti β-amilaze, koja se aktivira bez potrebe za novom sintezom. Ova pojava bila je posebno izražena kod pšenice (Lorena), gdje je udio škroba nakon namakanja pao za čak 17,3 %, što može upućivati na visoku inicijalnu aktivnost β-amilaze, usprkos slabijem ukupnom enzimskom potencijalu za kasniju fazu klijanja. Kasnije tijekom sladovanja, dominaciju preuzima α-amilaza, čija se aktivnost progresivno povećavala, posebno nakon 1. i 2. dana klijanja (**Slika 12**). Razlike u kinetici porasta aktivnosti α-amilaze, kvantificirane logističkom regresijom (**Tablica 5**), usklađene su s različitim sortnim potencijalima za razgradnju škroba. Vrlo visoka korelacija između aktivnosti α-amilaze i stupnja hidrolize škroba kod pljevičastih sorti ječma (**Tablica 6**) potvrđuje da α-amilaza postaje odlučujući faktor razgradnje škroba brže nego li je to slučaj s golozrnim ječmom, a naročito sa pšenicom.

Ovakva višekomponentna regulacija enzimskih aktivnosti objašnjava i zašto dolazi do usporavanja hidrolize škroba (vidljivo u stabilizaciji vrijednosti tijekom 2. dana klijanja) usprkos nastavku rasta aktivnosti α-amilaze, jer su limitirajući faktori tada dostupnost supstrata, prisutnost inhibitora i učinkovitost drugih enzima. Rezultati ovog istraživanja impliciraju da se kroz integralno praćenje kinetičkih, enzimski i kemijskih parametara tijekom sladovanja može steći bolji uvid u složene procese hidrolize škroba tijekom sladovanja. U cjelini, hidroliza škroba tijekom sladovanja rezultat je koordiniranog djelovanja više enzima, čija relativna važnost varira ovisno o sorti, fazi procesa i strukturnim karakteristikama škroba. Razumijevanje ove dinamike ključno je za optimizaciju procesa sladovanja i odabir sorti za različite tehnološke primjene. Konačno, dobiveni rezultati jasno potvrđuju funkcionalnu povezanost između aktivnosti α-amilaze, brzine i intenziteta hidrolize škroba te strukturnih i sortnih svojstava ispitivanih uzoraka. Ovakav pristup omogućuje ciljano upravljanje tehnološkim parametrima sladovanja u svrhu dobivanje slada za različite namijene.

4.2. Prilagodba metode određivanja broja padanja (FN) za uzorke sladnog brašna s visokom aktivnošću α-amilaze

Metoda broja padanja (FN) prepoznata je širom svijeta zbog svoje jednostavnosti i relativno kratkog trajanja postupka. Danas se smatra standardnom metodom za procjenu kakvoće žitarica i za ocjenjivanje brašna i prilagodbu mješavina brašna za pekarsku proizvodnju. FN metoda je vrlo uspješna u detekciji povišene razine α-amilaze u zrelim zrnima uzrokovane priježetvenim proklijavanjem (PHS) ili tzv. amilazom kasnog sazrijevanja (LMA) (Mares i Mrva (2014); Ral i sur. (2016); Newberry, M. i sur. (2018); Cannon i sur. (2022)). Pšenična zrna s FN vrijednostima ispod 250 s smatraju se zrnom lošije kvalitete i obično postižu nižu cijenu na tržištu (He i sur. (2019); Shao i sur. (2019)). Međutim, ove povišene razine α-amilaze izazvane PHS-om i LMA-om i dalje su relativno niske u usporedbi s razinama α-amilaze u sladovanom zrnu.

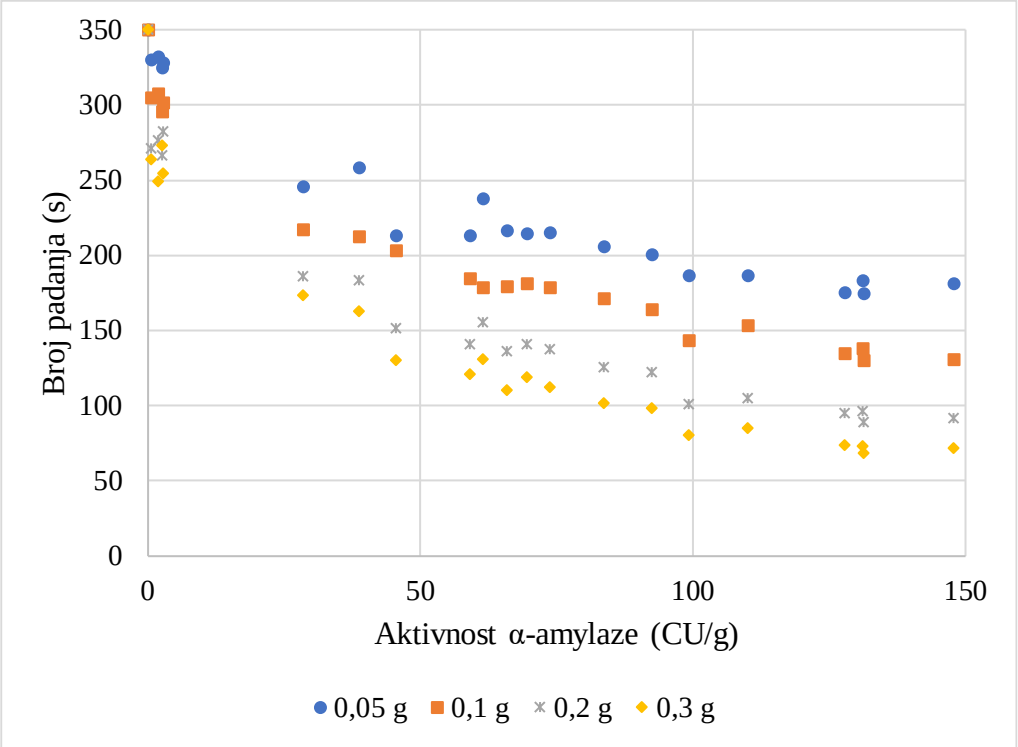
FN metoda nije prikladna za određivanje aktivnosti α-amilaze u sladnom brašnu jer je amilolitička aktivnost previsoka da bi se mogla kvantificirati uređajem za određivanje broja padanja prema Hagberg–Pertenu. Naime, likvefakcija vruće škrobne paste u uzorcima sladnog brašna je vrlo intenzivna, a viskoznost se toliko smanjuje da miješalica FN uređaja odmah propada kroz potpuno ukapljenu pastu, pri čemu uređaj bilježi vrijednost od 61 s. To je vrijeme potrebno da miješalica izmiješa suspenziju brašna i vode (60 s) te slobodno padne kroz potpuno ukapljenu pastu (~1 s) (Raschke, Taylor i Taylor, (1995). Prema nekim ranijim istraživanjima, FN vrijednost od 61 s odgovara aktivnosti α-amilaze od oko 5 (CU/g), što predstavlja maksimalnu razinu aktivnosti α-amilaze koju je moguće izmjeriti standardnom FN metodom (Yu i sur., 2015). Tijekom istraživanja u okviru ovog doktorskog rada nije bilo moguće odrediti FN standardnom metodom već nakon prvog dana klijanja jer je aktivnost α-amilaze u uzorcima bila previsoka i uređaj je dostizao svoju donju granicu detekcije pri 61 s. Najmanja aktivnost α-amilaze nakon prvog dana klijanja je bila 28,4 CU/g (pšenica Lorena), što je značajno veća vrijednost u odnosu na prag detekcije standardne FN metode od 5 CU/g. S obzirom na to da je aktivnost u sladnom brašnu znatno viša i ponekad može premašiti 300 CU/g, ovisno o duljini klijanja tijekom procesa sladovanja i podrijetlu slada (Yu i sur., 2015; Bhatty, 1996; Bera, Sabikhi i Singh, 2018), jasno je da se standardna FN metoda ne može koristiti za uzorke sladnog brašna. To je upravo razlog zašto se za određivanje amilolitičke aktivnosti u sladnom brašnu koriste druge metode. Određivanje ukupne amilolitičke aktivnosti u sladu i sladnom brašnu najčešće se provodi metodom određivanja dijastatske snage, a ako se želi odrediti isključivo

aktivnost α-amilaze, potrebno je koristiti druge specifične metode poput DNS metode, metode prema Farrandu i Wohlgemuthu, nefelometrijske metode, ELISA testa ili Ceralpha metode (Muralikrishna i Nirmala, 2005; McCleary i sur. 2002).

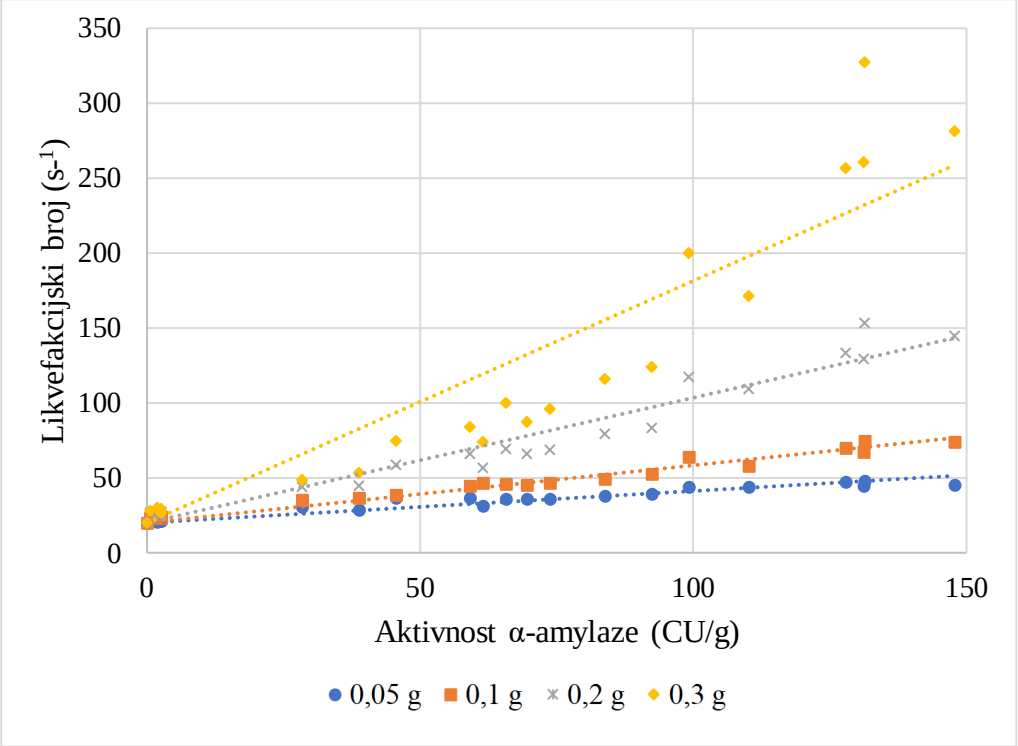
Sve navedene metode općenito su dugotrajne i/ili relativno skupe. Stoga, prilagodba već etabliranih reoloških tehnika, poput FN metode, koje se uobičajeno koriste za analizu žitarica za procjenu amilolitičke aktivnosti u sladnom brašnu predstavlja moguću alternativu. Do sada je, prema dostupnim podacima, samo se u jednom istraživanju pokušalo prilagoditi FN metodu za procjenu amilolitičke aktivnosti u sladnom brašnu. U tom istraživanju korištena je smjesa sladnog brašna sirka (0,2 g) s različitim amilolitičkim aktivnostima i kukuruznog škroba (5,8 g) u FN analizi, a rezultati su uspoređeni s dijastatskom snagom uzoraka sladnog brašna (Raschke, Taylor i Taylor, (1995). Prema tome, u tom istraživanju nije se pratila ovisnost FN o aktivnosti α-amilaze kao u ovom radu, nego samo ovisnost o dijastatskoj snazi, a dobivena je korelacija od r = -0,759.

S obzirom da je standardna FN metoda ograničena u mogućnosti kvantificiranja visokih razina aktivnosti α-amilaze u sladnom brašnu, cilj ovog istraživanja je bio modificirati FN metodu, koja je uobičajeno namijenjena ispitivanju uzoraka brašna s niskom amilolitičkom aktivnošću, na način kako bi se omogućilo kvantificiranje visoke aktivnosti α-amilaze u sladnom brašnu. Modifikacije su provedene na tri načina: korištenjem određenih alikvota (0,05 g, 0,1 g, 0,2 g i 0,3 g) sladnog ječmenog i pšeničnog brašna, upotrebom sladnih ekstrakata (0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml, i 6,0 ml) te parcijalnom inaktivacijom α-amilaze pomoću otopina srebrovog nitrata različitih koncentracija. U slučaju korištenja alikvota sladnog brašna i ekstrakta kao supstrat je korišten standardni pšenični škrob (*FN* = 350 s), a rezultati su uspoređeni s aktivnošću α-amilaze određenom standardnom Ceralpha metodom. U istraživanju je korišteno dvadeset uzoraka slada s različitim aktivnostima α-amilaze koji su pripremljeni mikrosladovanjem triju zimskih sorti ječma i jedne zimske sorte pšenice. Od svake pojedine sorte dobiveno je 5 uzoraka sladnog brašna (uzorci nakon faze namakanja te nakon svakog dana četverodnevnog klijanja).

Rezultati prikazani na **Slikama 13 i 14** pokazuju utjecaj dodatka različitih količina sladnog brašna na FN i LN. Vidljivo je da se FN smanjuje s povećanjem količine sladnog brašna u analizi. FN je pao ispod 200 s već pri dodatku više od 0,1 g sladnog brašna, čak i kod uzoraka s relativnom niskom aktivnošću α-amilaze od 28,4 CU/g. To znači da se korištenjem većih količina sladnog brašna (0,2 i 0,3 g) značajno sužava raspon detekcije i svi analizirani uzorci padaju u raspon od 61–200 s, što može otežati razlikovanje uzoraka prema aktivnosti α-amilaze.

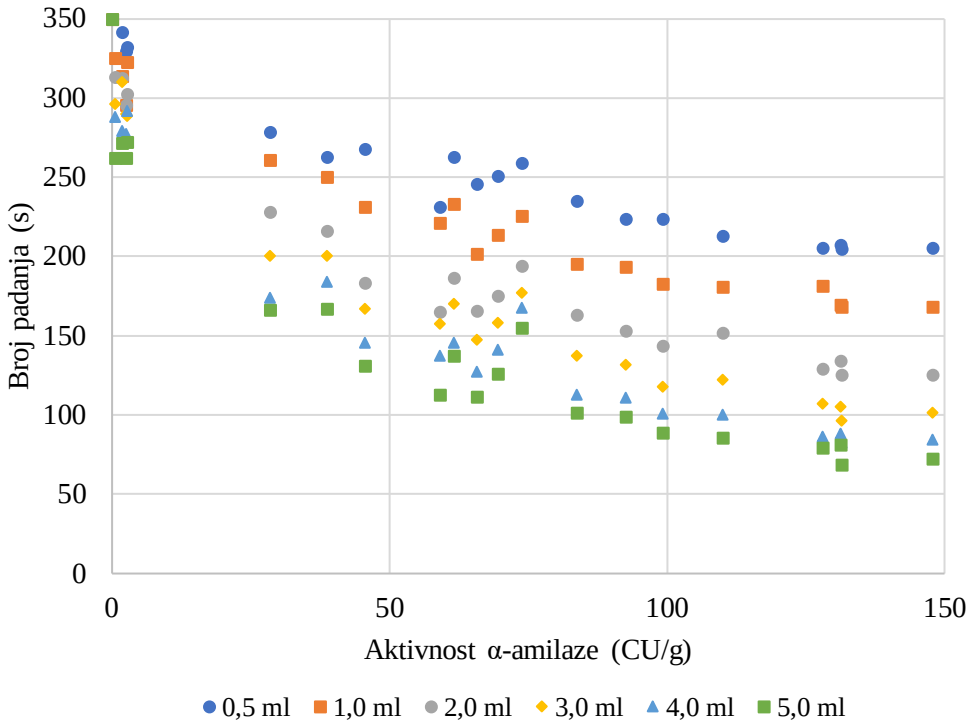


Slika 13 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog brašna na broj padanja (FN)



Slika 14 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog brašna na likvefakcijski broj (LN) (linije pokazuju linearni trend)

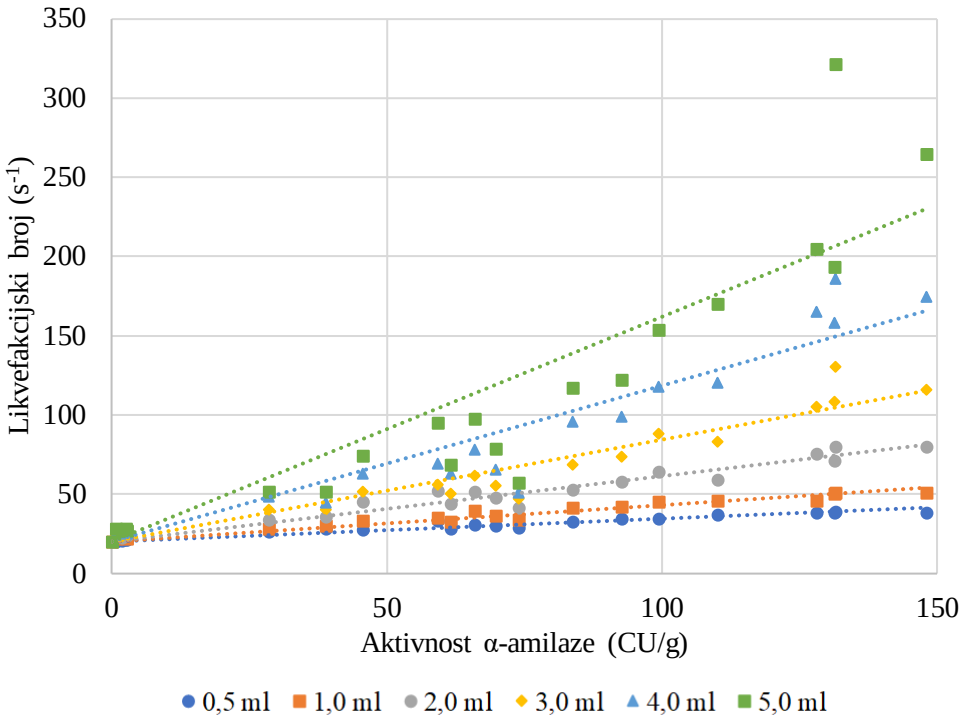
S obzirom na to da odnos između FN vrijednosti i aktivnosti α-amilaze nije linearan, FN vrijednosti se mogu transformirati u LN kako bi se osigurala linearna povezanost s aktivnošću α-amilazne (**Slika 14**), budući da su LN vrijednosti proporcionalne aktivnosti enzima (Perten, 1964; Mangan, Szafranska i McKie, 2016; Kiszonas i sur., 2018). Transformacijom FN vrijednosti u LN postaje moguće primijeniti linearnu regresijsku analizu za uspostavu linearnog odnosa između LN i aktivnosti α-amilaze, čime se omogućuje jednostavnija kvantifikacija. Na taj se način LN vrijednosti mogu koristiti za izradu standardne krivulje za kvantitativnu analizu, čime se povećava preciznost određivanja. Kao što je prikazano na **Slici 3**, nagib pravca rastao je s povećanjem količine sladnog brašna u analizi, što potvrđuje sužavanje raspona detekcije. Odsječak pravca na ordinati je postavljen na 20 s^{-1}, što odgovara FN vrijednosti od 350 s dobivenoj za uzorak standardnog pšeničnog škrob bez amilolitičke aktivnosti.



Slika 15 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog ekstrakta na broj padanja (FN)

Slično rezultatima dobivenim upotrebom sladnog brašna, primjena različitih količina sladnog ekstrakta (5% w/v) također je rezultirala nelinearnim odnosom između FN i aktivnosti α-amilaze (**Slika 15**). FN je pao ispod 200 s kada je korišteno više od 3 mL sladnog ekstrakta za uzorke s aktivnošću α-amilaze većom od 40 CU/g. Analogno rezultatima s dodatkom sladnog brašna, preračunavanjem FN u LN vrijednosti dobivena je linearna ovisnost LN o aktvnosti α-amilaze u uzorcima s dodatkom sladnog ekstrakta. Kao i kod upotrebe većih količina sladnog brašna, i ovdje se povećanjem količine sladnog ekstrakta značajno povećavao nagib pravca,

odnosno sužavao raspon detekcije, što otežava razlikovanje uzoraka s visokom enzimskom aktivnošću (**Slika 16**).

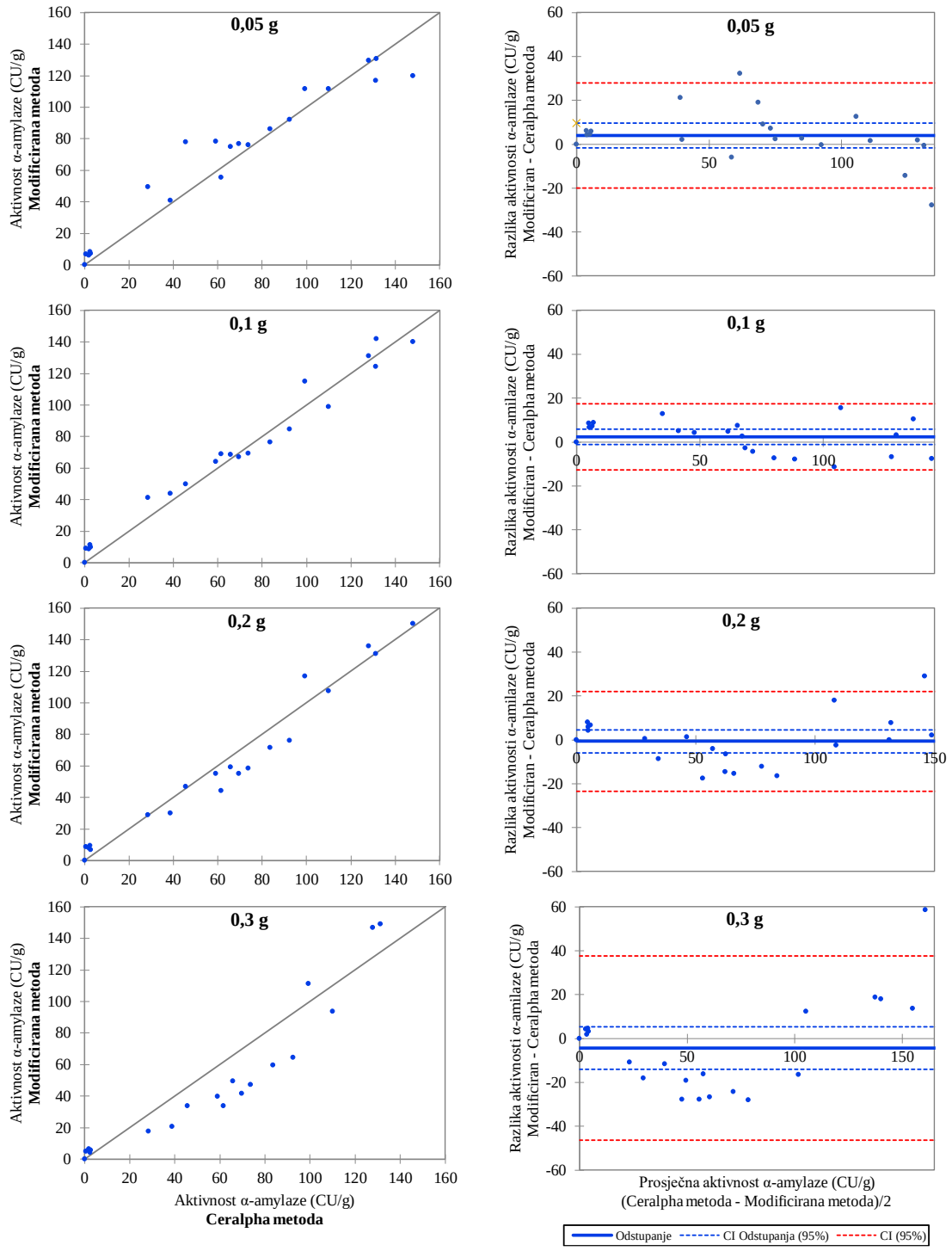


Slika 16 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog ekstrakta na likvefakcijski broj (LN) (linije pokazuju linearni trend)

4.2.1. Linearna estimacija korištenjem likvefakcijskog broja (LN)

Radi procjene slaganja između standardne Ceralpha metode i modificirane FN metode, provedena je Bland-Altman analiza (Bland i Altman,1999). Rezultati prikazani na **Slikama 17 i 18** i u **Tablicama 7 i 8** odnose se na korištenje LN vrijednosti za procjenu aktivnosti α-amilaze u sladnim uzorcima. Za estimaciju je korištena linearna regresijska analiza. Standardna metoda i modificirane metode bile su visoko korelirane za sve količine sladnog brašna i ekstrakta, jer su koeficijenti korelacije bili veći od 0,900. Međutim, primijećeno je da se korelacijski koeficijent smanjuje s povećanjem količina sladnog brašna i ekstrakta. Najviša korelacija utvrđena je između standardne metode i modificirane metode pri korištenju 0,1 g sladnog brašna (r = 0,984; **Tablica 7**) te pri korištenju 2 mL sladnog ekstrakta (r = 0,977; **Tablica 8**).

Ovakvu visoku linearnu povezanost aktivnosti α-amilaze određene Ceralpha metodom i LN utvrdili su i McCleary i Sheehan (1987) pri samim počecima razvoja Ceralpha metode.



Slika 17 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane FN metode s različitim količinama sladnog brašna (linearna estimacija povezanosti likvefakcijskog broja (LN) i aktivnosti α-amilaze)

Utvrdili su da je koeficijent korelacije iznosio $r = 0{,}971$, ali oni su u svom istraživanju koristili uzorke brašna čija je aktivnost α-amilaze bila relativno niska (< 3 CU/g), odnosno iznad praga detekcije uređaja za određivanje FN. To samo potvrđuje potrebu za modifikacijom FN metode,

koja provedena u okviru ovog istraživanja, kako bi se uređaj za određivanje FN mogao upotrijebiti i za uzorke s visokom amilolitičkom aktivnošću.

Međutim, visoka korelacija između dviju metoda ne znači nužno i dobro podudaranje dobivenih rezultata. Drugim riječima, jaka povezanost ne implicira nužno i točnost. To može biti slučaj kada su razlike između rezultata konzistentne, što upućuje na sustavnu, a ne slučajnu pogrešku. U takvim slučajevima, iako korelacija ostaje visoka, rezultati mogu pokazivati odstupanja (Doğan, 2018; Van Stralen i sur., 2008). Upravo zbog toga korištena je i Bland-Altman analiza za dodatnu procjenu podudarnosti metoda.

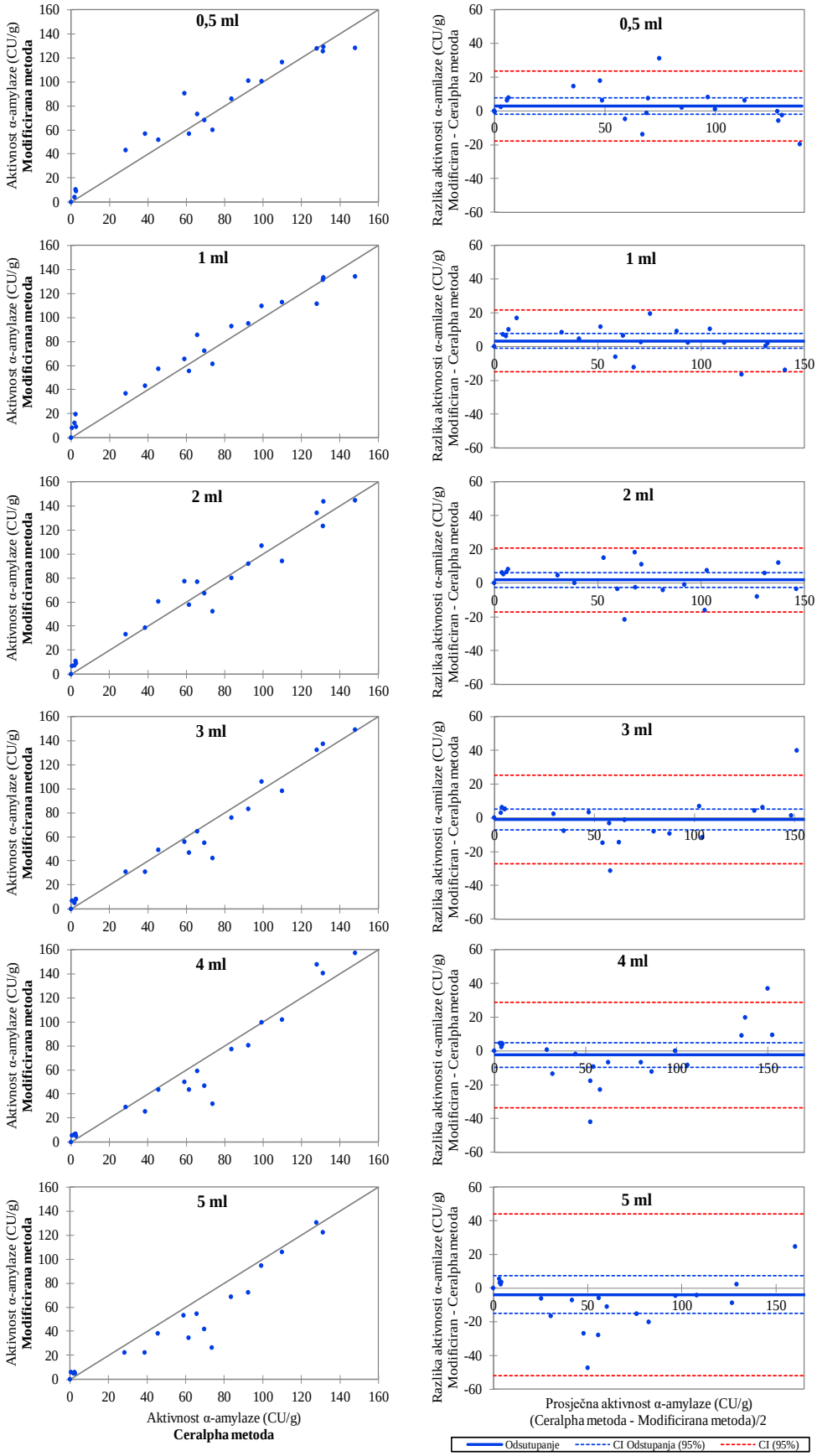
Tablica 7 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane metode određivanja broja padanja (FN) uz dodatak različitih količina sladnog brašna (linearna estimacija povezanosti likvefakcijskog broja (LN) i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladno brašno (g)	**Jednadžba** [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	***s*$_r$ (CU/g)**
0,05	*AA* = (*LN*-20)/0,215	0,956	3,99	12,18	-1,55 - 9,54	2445,1	8,55
0,1*	***AA* = (*LN*-20)/0,386**	**0,984**	**2,41**	**7,64**	**-1,07 - 5,89**	**1363,0**	**6,42**
0,2	*AA* = (*LN*-20)/0,834	0,973	-0,65	11,61	-5,94 - 4,63	629,4	4,69
0,3	*AA* = (*LN*-20)/1,616	0,926	-4,35	21,47	-14,12 ± 5,42	325,2	4,69

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *LN* – Likvefakcijski broj (s^{-1}); *r* – Pearson koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; *s*$_r$ – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

Sustavno odstupanje (engl. *Bias*) prelazio je iz pozitivnih u negativne vrijednosti s povećanjem količine dodanog sladnog brašna ili ekstrakta. Uočen je trend podcjenjivanja aktivnosti α-amilaze pri višim razinama aktivnosti, odnosno vrijednosti za aktivnost α-amilaze dobivene modificiranim metodama bile su u pravilu nešto niže od vrijednosti dobivenih Ceralpha metodom pri upotrebi većih količina sladnog brašna, odnosno sladnog ekstrakta (**Slike 17 i 18** i **Tablice 7 i 8**). Taj se fenomen može pripisati učinku obrnutog toka (engl. *Reverse Flow*) koji se događa kada se miješalica uređaja za određivanje FN približava dnu epruvete. Taj je efekt izraženiji u pastama niske viskoznosti zbog veće brzine uzlaznog toka. Kod uzoraka u kojima visoka aktivnost α-amilaze dovodi do niske konačne viskoznosti paste, miješalica se usporava, što rezultira višim FN vrijednostima, odnosno nižim vrijednostima u odnosu na stvarnu aktivnost α-amilaze. To fizikalno usporavanje rezultira prividno višim FN očitanjem za jednu do dvije sekunde, što u matematičkom modelu izravno uzrokuje sustavno podcjenjivanje (negativno odstupanje) stvarne aktivnosti enzima (Chang, Delwiche i Wang, 1999; Chang, Delwiche i Wang, 2002).



Slika 18 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane FN metode s različitim količinama sladnog ekstrakta (linearna estimacija povezanosti likvefakcijskog broja (LN) i aktivnosti α-amilaze)

Tablica 8 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane metode određivanja broja padanja (FN) uz dodatak različitih količina sladnog ekstrakta (linearna estimacija povezanosti likvefakcijskog broja (LN) i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladni ekstrakt (ml)	Jednadžba [1]	*r*	Odstupanje (CU/g)	SE_B (CU/g)	CI_B (95%) (CU/g)	*ULOQ* (CU/g)	s_r (CU/g)
0,5	*AA* = (*LN*-20)/0,1452	0,970	2,93	10,63	-1,91 - 7,77	3618,8	7,67
1,0	*AA* = (*LN*-20)/0,2304	0,974	3,38	9,35	-0,88 - 7,63	2280,6	5,56
2,0*	***AA* = (*LN*-20)/0,4154**	**0,977**	**1,89**	**9,66**	**-2,50 - 6,29**	**1264,9**	**4,31**
3,0	*AA* = (*LN*-20)/0,6445	0,965	-0,91	13,41	-7,01 - 5,20	815,3	4,91
4,0	*AA* = (*LN*-20)/0,9832	0,954	-2,40	15,95	-9,66 - 4,86	534,4	3,00
5,0	*AA* = (*LN*-20)/1,4179	0,907	-3,87	24,50	-15,03 - 7,28	370,6	3,14

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *LN* – Likvefakcijski broj (s^{-1}); *r* – Pearson koeficijent korelacije; SE_B – Standardna pogreška odstupanja; CI_B – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

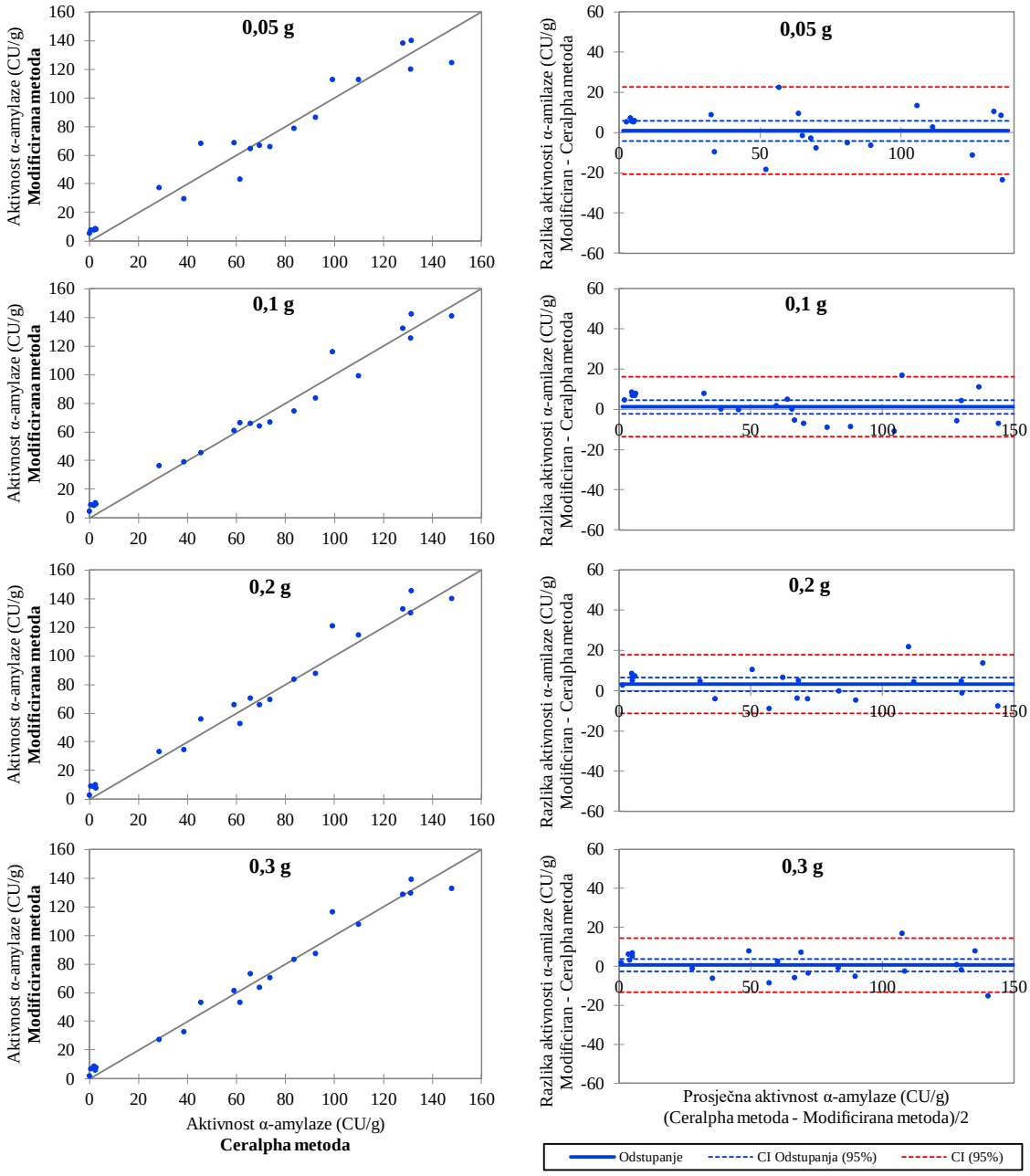
Najmanja apsolutna vrijednost odstupanja izračunata je pri korištenju 0,2 g sladnog brašna (−0,65 CU/g) i 3,0 mL sladnog ekstrakta (−0,91 CU/g). Standardna pogreška odstupanja (SE_B) i 95 % interval pouzdanosti bili su najmanji kod metode s 0,1 g sladnog brašna (SE_B = 7,64; *CI* [−1,07 – 5,89]) i pri korištenju 1 mL sladnog ekstrakta (SE_B = 9,35; *CI* [−1,07 – 5,89]). Gornja granica kvantifikacije (*ULOQ*), definirana kao maksimalna aktivnost α-amilaze koja se može izmjeriti danom metodom, postupno se smanjivala s povećanjem količine sladnog brašna i ekstrakta. Najniža *ULOQ* vrijednost utvrđena je za metodu s 0,3 g sladnog brašna (325,2 CU/g), što ukazuje da se ovom količinom ne može pouzdano kvantificirati aktivnost α-amilaze kod sladova s visokom amilolitičkom aktivnošću.

Standardna devijacija ponovljivosti (sr) rezultata dobivenih modificiranim metoda također se smanjivala s povećanjem količine dodanog sladnog brašna i ekstrakta (Tablice 7 i 8). Ovo je bilo i očekivano jer je poznato da je relativni koeficijent ponovljivosti znatno niži za uzorke s niskim FN vrijednostima nego za one s višim, kako je navedeno u standardnoj metodi ISO 3093 (ISO, 2015).

4.2.2. Nelinearna regresijska procjena aktivnosti α-amilaze pomoću broja padanja (FN)

Za poboljšanje točnosti procjene, korištena je i nelinearna regresija za prilagodbu FN podataka (**Slike 19 i 20**, **Tablice 9 i 10**). U ovom slučaju za estimaciju nisu korištene LN vrijednosti, nego direktno izmjerene FN vrijednosti. Kao što je bilo očekivano, koeficijenti korelacije bili su viši nego kod linearne regresije s korištenjem LN vrijednosti. Najniži koeficijent (*r* = 0,973) dobiven je pri korištenju 0,01 g sladnog brašna i 5 mL sladnog ekstrakta. Za razliku od linearne

procjene LN vrijednosti, sva izračunata odstupanja bila su pozitivna, ali ujedno i niža; u rasponu od 0,68 do 3,10 CU/g kod upotrebe sladnog brašna te između 0,59 i 1,20 CU/g kod upotrebe sladnog ekstrakta.



Slika 19 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane FN metode s različitim količinama sladnog brašna (nelinearna regresijska estimacija povezanosti broja padanja (FN) i aktivnosti α-amilaze)

Modificirana metoda s 0,3 g sladnog brašna ili 3 mL sladnog ekstrakta pokazala je najmanji SE_B i najuži 95 % interval pouzdanosti, sa SE_B vrijednostima od 7,07 i 9,37 te intervalima [−2,53 – 3,90] i [−3,15 – 5,37]. Međutim, *ULOQ* vrijednosti bile su preniske da bi se te količine

sladnog brašna i ekstrakta smatrale prikladnima za izvođenje modificirane procedure, budući da bi uzorci visoko aktivnih sladova bili izvan granica kvantifikacije. Također je uočeno da se standardne devijacije ponovljivosti (s_r) rezultata dobivenih modificiranim metodama smanjuje s povećanjem količine sladnog brašna i ekstrakta (**Slike 19 i 20**, **Tablice 9 i 10**).

Tablica 9 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane metode određivanja broja padanja (FN) uz dodatak različitih količina sladnog brašna (nelinearna regresijska estimacija povezanosti broja padanja (FN) i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladno brašno (g)	**Jednadžba** [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	***s*$_r$ (CU/g)**
0,05	*AA* = 3645,0*exp(-0,019**FN*)	0,973	0,86	11,07	-4,18 - 5,90	1167,5	11,31
0,1*	***AA* = 1114,4*exp(-0,016**FN*)**	**0,987**	**1,24**	**7,64**	**-2,24 - 4,72**	**425,4**	**6,70**
0,2	*AA* = 546,5*exp(-0,015**FN*)	0,987	3,10	7,44	-0,28 - 6,49	222,6	3,86
0,3	*AA* = 401,4*exp(-0,016**FN*)	0,989	0,68	7,07	-2,53 - 3,90	155,5	2,46

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *FN* – Broj padanja (s); *r* – Pearson koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

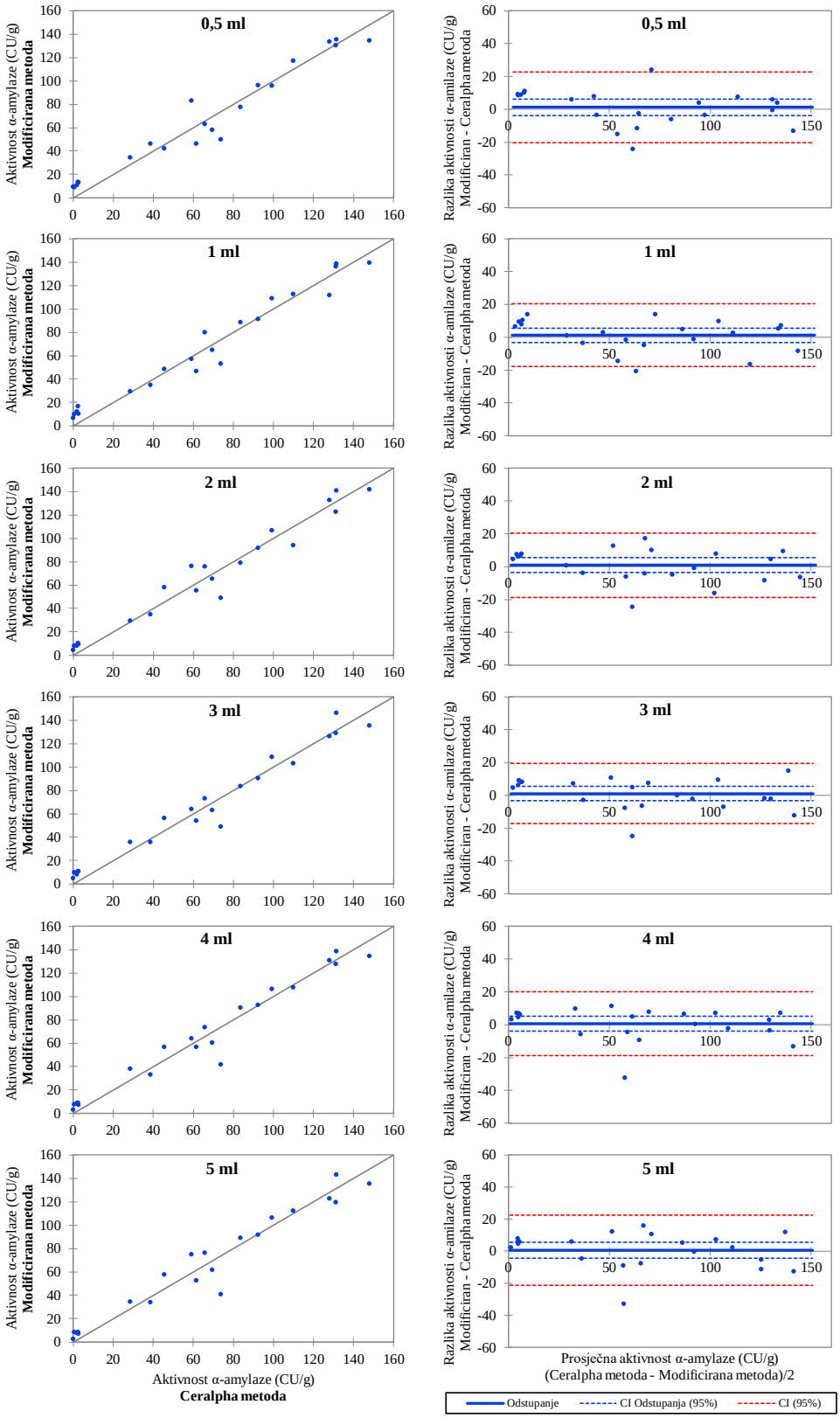
S obzirom na kombinaciju malog odstupanja (<2 CU/g), niskog *SE*$_B$-a (<10 CU/g), uskog 95 % *CI*, visoke *ULOQ* vrijednosti (>400 CU/g) i relativno zadovoljavajuće ponovljivosti (s_r < 10 CU/g), najbolja podudarnost sa standardnom Ceralpha metodom postignuta je kod modificirane metode s dodatkom 0,1 g sladnog brašna i 2 mL sladnog ekstrakta (**Tablice 9 i 10**).

Tablica 10 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane metode određivanja broja padanja (FN) uz dodatak različitih količina sladnog ekstrakta (nelinearna regresijska estimacija povezanosti broja padanja (FN) i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladni ekstrakt (ml)	**Jednadžba** [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	***s*$_r$ (CU/g)**
0,5	*AA* = 6089,6*exp(-0,019**FN*)	0,974	1,20	10,97	-3,79 - 6,20	1961,8	8,61
1,0	*AA* = 2335,6*exp(-0,017**FN*)	0,979	1,18	9,76	-3,26 - 5,62	839,5	6,16
2,0*	***AA* = 962,9*exp(-0,015**FN*)**	**0,978**	**0,93**	**9,99**	**-3,61 - 5,48**	**377,8**	**4,23**
3,0	*AA* = 536,3*exp(-0,014**FN*)	0,981	1,11	9,37	-3,15 - 5,37	235,0	3,92
4,0	*AA* = 442,9*exp(-0,014**FN*)	0,978	0,68	9,99	-3,87 - 5,22	187,1	2,19
5,0	*AA* = 391,7*exp(-0,015**FN*)	0,973	0,59	11,17	-4,50 - 5,67	160,3	1,81

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *FN* – Broj padanja (s); *r* – Pearson koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda



Slika 20 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane FN metode s različitim količinama sladnog ekstrakta (nelinearna regresijska estimacija povezanosti broja padanja (FN) i aktivnosti α-amilaze)

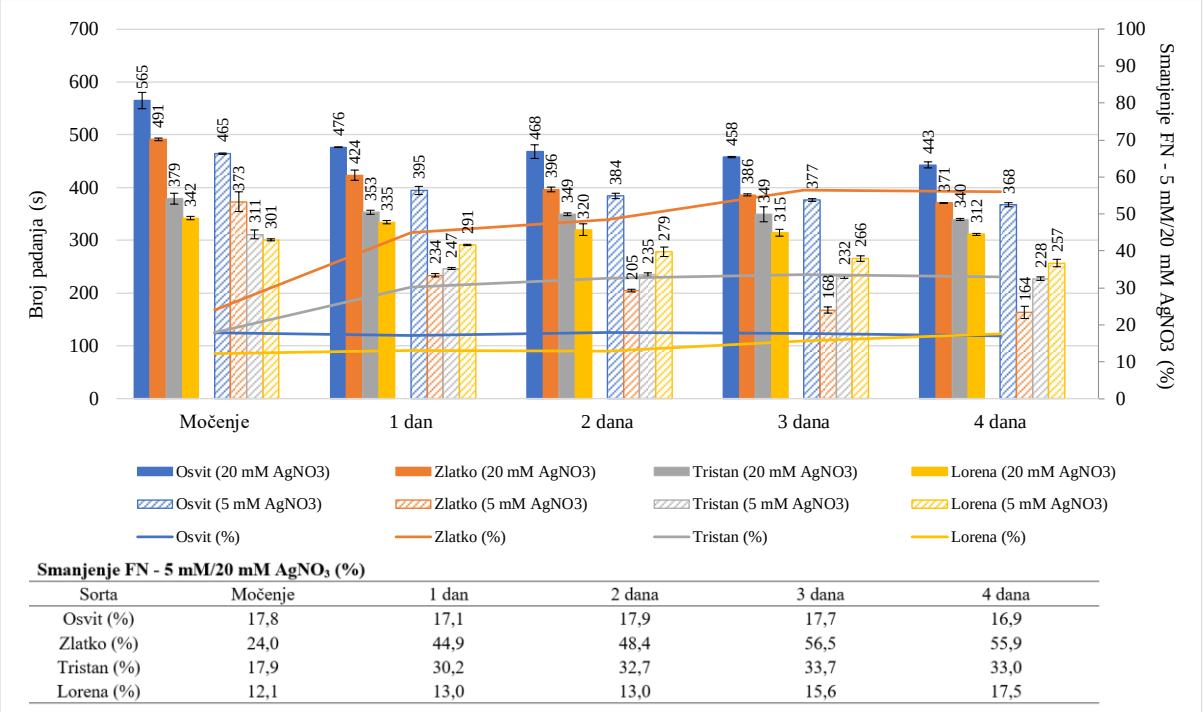
To ukazuje da je modificirana FN metoda pouzdano i praktično sredstvo za procjenu aktivnosti α-amilaze u sladnom brašnu. Ova metoda predstavlja ekonomičnu alternativu konvencionalnim metodama određivanja α-amilaze te ima potencijal postati važno sredstvo u analizi žitarica i brašna, osobito u pivarskoj i destilerskoj industriji, gdje su visoke vrijednosti aktivnosti α-amilaze uobičajene, a modificirana FN metoda može olakšati svakodnevno praćenje procesa sladovanja. Budući da nije zabilježena značajna razlika između podudarnosti rezultata kod metode sa sladnim ekstraktom u odnosu na onu sa sladnim brašnom, može se zaključiti da nije nužno provoditi korak ekstrakcije, čime se vrijeme analize može dodatno skratiti.

Stoga se za procjenu aktivnosti α-amilaze u uzorcima slada predlaže modifikacija FN metode uz korištenje 0,1 g sladnog brašna i standardnog škroba u količini koja odgovara FN vrijednosti od 350 s. U ovom istraživanju korišteno je 6 g pšeničnog škroba, ali ako se koristi neki drugi škrob, količinu je potrebno prethodno prilagoditi kako bi se dobila FN vrijednost od 350 s kako bi se koristile dobivene jednadžbe iz ovog rada. Varijabilnost između škrobova različitog podrijetla, ali i između škrobova istog podrijetla, ali različitih proizvođača, u svom istraživanju primjene škrobnih preparata kao referentnih materijala za provedbu FN analize istraživali su Delwiche, Rausch i Vinyard (2020). Također, potrebna su daljnja istraživanja, osobito međulaboratorijska ispitivanja, kako bi se potvrdili rezultati ovog istraživanja i utvrdila reproducibilnost modificirane metode.

4.2.3. Inaktivacija amilolitičkog sustava otopinama srebrovog nitrata u modificiranoj metodi broja padanja (FN)

Jedna od hipoteza ovog doktorskog rada bila je mogućnost procjene i modeliranja visoke amilolitičke aktivnosti u sladnim brašnima primjenom parcijalne kemijske inaktivacije enzima otopinama srebrovog nitrata ($AgNO_3$). Srebrov nitrat je u literaturi prepoznat kao iznimno učinkovit inhibitor amilolitičkih enzima slada (Zhou i Mendham, 2005). Djelovanje srebrovih iona (Ag+) temelji se na njihovoj sposobnosti da se nepovratno vežu za sulfhidrilne skupine bjelančevina te da istisnu ione kalcija (Ca^{2+}) iz strukture α-amilaze, što dovodi do brze destabilizacije i potpunog gubitka katalitičke aktivnosti ovog metaloenzima (Batey, Curtin i Moore., 1997; Fox i sur., 2014).U svrhu istraživanja količina vode za analizu od 25 mL zamijenjena je otopinama srebrovog nitrata. Preliminarna istraživanja s rasponom koncentracija od 1 do 20 mM pokazala su da su niske koncentracije (1-3 mM) nedostatne za inaktivaciju vrlo

visoke aktivnosti α-amilaze u proklijalim uzorcima (vrlo brzo dolazi do potpune likvefakcije škrobne paste, *FN* = 61 s), dok otopina od 10 mM u slabo aktivnim uzorcima daje slične vrijednosti profile kao i otopina od 20 mM, odnosno u pojedinim uzorcima u potpunosti inaktivira α-amilazu. Na temelju toga, za daljnju regresijsku analizu i modeliranje odabrane su koncentracije od 20 mM (potpuna inaktivacija) i 5 mM (parcijalna inaktivacija). Izračunat je postotak smanjenja FN (*FN%*) u uvjetima s 5 mM $AgNO_3$ u odnosu na potpuno inaktivirani sustav (20 mM $AgNO_3$), te je napravljena krivulja ovisnosti tog postotnog smanjenja o aktivnosti α-amilaze (**Slika 21**). Na temelju postotnog smanjenja provedena je nelinearna regresijska analiza (prirodna logaritamska funkcija s vertikalnim pomakom) i Bland-Altmanova analiza podudarnosti (**Slika 22** i **Tablica 11**).

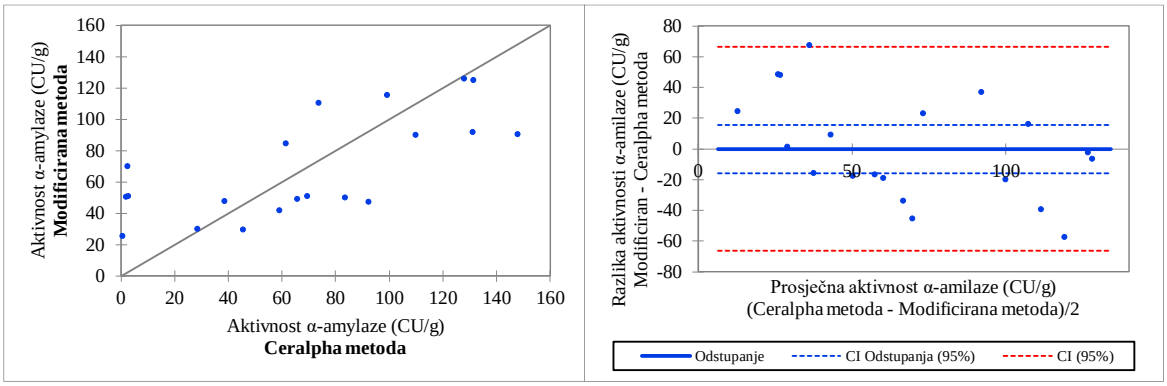


Smanjenje FN - 5 mM/20 mM $AgNO_3$ (%)

Sorta	Močenje	1 dan	2 dana	3 dana	4 dana
Osvit (%)	17,8	17,1	17,9	17,7	16,9
Zlatko (%)	24,0	44,9	48,4	56,5	55,9
Tristan (%)	17,9	30,2	32,7	33,7	33,0
Lorena (%)	12,1	13,0	13,0	15,6	17,5

Slika 21 Utjecaj inaktivacije α-amilaze srebrovim nitratom (5 mM i 20 mM) na Broj padanja (FN)

Rezultati parcijalne inaktivacije pokazali su izrazito lošu podudarnost s Ceralpha metodom, što se očituje u niskom koeficijentu korelacije (r = 0,696), vrlo visokoj standardnoj pogrešci odstupanja (SE_B = 33,82 CU/g) i širokom 95% intervalu pouzdanosti (CI_B = -15,83 do 15,83 CU/g). Ovako nezadovoljavajući rezultati objašnjavaju se kemijskom reaktivnošću iona srebra (Ag^+). Srebro se nespecifično i izrazito snažno veže na slobodne sulfhidrilne (-SH) skupine proteina endosperma i neškrobnih polisaharida, što drastično smanjuje efektivni udio iona srebra dostupnih za specifičnu inhibiciju metaloenzima α-amilaze (Meredith, 1970).



Slika 22 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane metode određivanja broja padanja (FN) uz upotrebu srebrovog nitrata (5 mM i 20 mM) za inaktivaciju α-amilaze (nelinearna regresijska estimacija povezanosti broja padanja (FN) i aktivnosti α-amilaze)

Tablica 11 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane metode određivanja broja padanja (FN) uz upotrebu srebrovog nitrata (5 mM i 20 mM) za inaktivaciju α-amilaze kta (nelinearna regresijska estimacija povezanosti broja padanja (FN) i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Jednadžba [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	***s*$_r$ (CU/g)**
AA = 391,7*exp(-0,015**FN%*)	0,696	0,00	33,82	-15,83 – 15,83	130,6	10,8

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *FN%* – Razlika broja padanja s 1 mM i 20 mM $AgNO_3$ (%); *r* – Pearson koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; *s*$_r$ – Standardna devijacija ponovljivosti
* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

Budući da se proteinski sastav i udio topivih vlakana dramatično mijenjaju po danima sladovanja, reološki se odgovor ne može stabilno modelirati u uvjetima parcijalne inaktivacije. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se prag koncentracije $AgNO_3$ potreban za inhibiciju dramatično mijenja ovisno o količini prisutnog enzima. Kod visokoaktivnih uzoraka slada, koncentracija od 5 mM nije bila dovoljna da spriječi brzu enzimsku likvefakciju, dok je kod manje aktivnih uzoraka uzrokovala gotovo potpunu blokadu, onemogućujući uspostavljanje kontinuirane i osjetljive kalibracijske krivulje kroz cijeli raspon aktivnosti.

Nasuprot tome, primjena otopine od 20 mM AgNO3 osigurava trenutačnu i potpunu inaktivaciju cjelokupnog amilolitičkog sustava (Meredith, 1970; Glennie Holmes, 1995). Izmjereni FN pod potpunom inaktivacijom (20 mM) predstavlja izravan odraz strukturne očuvanosti i nativnih fizikalno-kemijskih svojstava samog škroba slada. Podaci pokazuju jasan i progresivan pad FN vrijednosti s produljenjem vremena klijanja kod svih sorti. Primjerice, kod stočnog ječma Zlatko, FN s 20 mM $AgNO_3$ iznosi 491 s u fazi namakanja te opada na 396

s (nakon 1. dana klijanja), 349 s (nakon 2. dana klijanja), 349 s (nakon 3. dana klijanja) te konačno na 340 s nakon 4. dana klijanja (**Slika 21**).

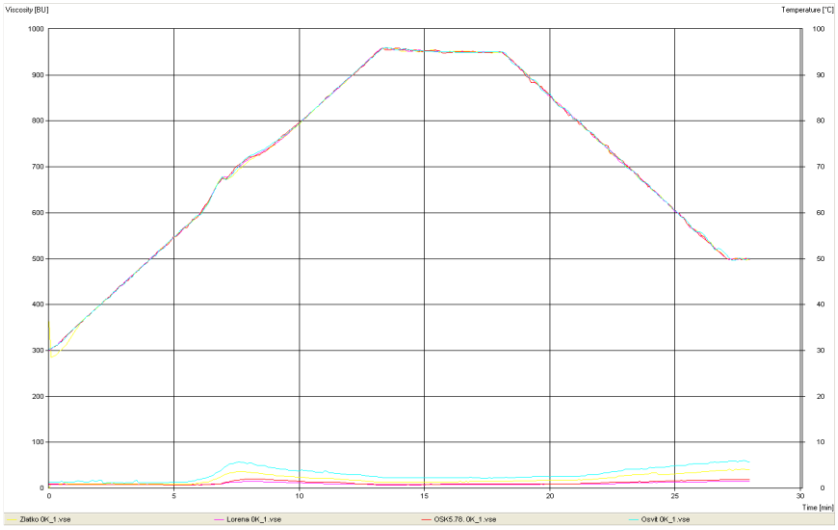
Navedeno smanjenje FN vrijednosti u odsutnosti aktivnih enzima pruža čvrst dokaz o biokemijskim promjenama koje se odvijaju u zrnu tijekom klijanja. Naime, ono se podudara sa povećanjem stupnja hidrolize škroba (HŠ) tijekom sladovanja prikazanim u **Tablici 3**. Ovi eksperimentalni podaci jasno pokazuju da škrob koji preostaje u zrnu nakon klijanja, iako su svi enzimi tijekom analize blokirani s 20 mM $AgNO_3$, gubi fizikalnu sposobnost bubrenja i želatinizacije zbog djelomične amilolitičke razgradnje u samom zrnu tijekom sladovanja, što se u potpunosti slaže sa znanstvenim istraživanjima drugih autora (Glennie Holmes, 1995; Fox i sur., 2014).

4.3. Prilagodba metode određivanja broja padanja (FN) za uzorke sladnog brašna s visokom aktivnošću α-amilaze

Mikro Visko-Amilo-Graf (MVA) je uređaj koji je koncepcijski vrlo sličan, u svijetu poznatijem i raširenijem, Rapid Visco Analizatoru (RVA), a oba se uređaja u suvremenoj analitici žitarica koriste za praćenje reoloških promjena škrobnih suspenzija pod utjecajem strogo kontroliranog temperaturnog ciklusa, miješanja i mehaničkog smicanja. U usporedbi s klasičnim Brabenderovim amilografom, MVA i RVA nude ključne prednosti kao što su znatno manja potrebna količina uzorka, kraće vrijeme analize te mogućnost programiranja preciznih temperaturnih i vremenskih profila (Mariotti i sur., 2005). Osim toga, za razliku od standardne metode određivanja broja padanja (FN) po Hagberg-Pertenu, koja nudi isključivo jedan brojčani podatak (vrijeme u sekundama potrebno da miješalica propadne kroz škrobnu pastu) bez informacija o promjenama viskoznosti tijekom vremena, MVA generira cjeloviti viskogram (krivulju viskoznosti) tijekom cjelokupnog ciklusa zagrijavanja i hlađenja, što osigurava dublji fizikalno-kemijski uvid i rezultira znatno većom ponovljivošću, odnosno manjom varijabilnošću rezultata (Mariotti i sur., 2005).

Tijekom analize, uređaj simulira kuhanje suspenzije škroba (ili brašna) i vode kroz faze zagrijavanja, zadržavanja visoke temperature te naknadnog hlađenja. Time nastaje tipična amilografska krivulja koja odražava fizikalne promjene kroz koje prolaze škrobne granule (bubrenje, želatinizacija i raspad), ali i intenzivne biokemijske procese uzrokovane djelovanjem prisutnih enzima (Balet i sur., 2019; Mariotti i sur., 2005). Međutim, slično kao i kod FN

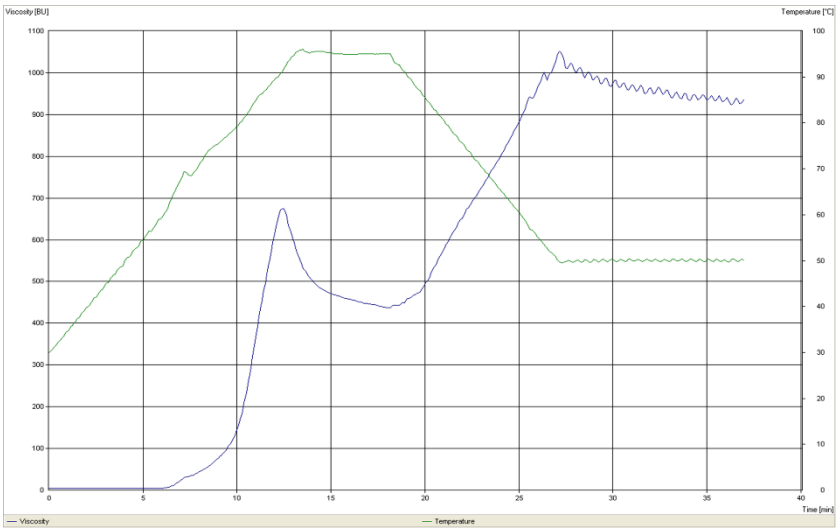
metode, standardna MVA analiza bez prethodne prilagodbe ili razrjeđenja potpuno je neprikladna za analizu uzoraka čistog sladnog brašna. Budući da je amilolitička aktivnost (prvenstveno α-amilaze) u sladu izuzetno visoka, enzimi hidroliziraju škrobne granule znatno brže nego što one stignu nabubriti i formirati viskozni gel. To dovodi do potpune likvefakcije škrobne paste, pri čemu se na amilogramu dobiva gotovo ravna linija s minimalnim, gotovo neprimjetnim promjenama viskoznosti, što u potpunosti maskira razlike između uzoraka različitog stupnja klijanja. Primjer ovog problema je prikazan na **Slici 23** gdje se vidi da su razlike između krivulja vrlo male već nakon faze namakanja dok se za uzorke s većom amilolitičkom aktivnošću dobije gotovo ravna linija viskoznosti bez pikova.



Slika 23 MVA krivulja uzoraka nakon faze namakanja

Kao i kod prethodno opisane FN metode, a kako bi se reološki odgovor sustava vratio u mjerljivo područje MVA uređaja i omogućila precizna kvantifikacija aktivnosti α-amilaze, u ovom radu provedena je prilagodba metode na tri načina: korištenjem alikvota sladnog brašna (0,05 g, 0,1 g i 0,2 g), primjenom različitih volumena sladnih ekstrakata (0,25 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL i 3,0 mL) te parcijalnom inaktivacijom srebrovim nitratom. Kao konstantan reološki supstrat visoke viskoznosti u analizama u kojima su se koristili alikvoti sladnog standardni pšenični škrob (maksimalne viskoznosti PV = 675 BU, konačne viskoznosti FV = 937 BU i retrogradne viskoznosti SV = 585 BU) (**Slika 24**). Preliminarna istraživanja s količinama većim od 0,2 g sladnog brašna i 3,0 mL sladnog ekstrakta pokazala su da visoka amilolitička aktivnost značajno preopterećuje sustav, čineći detekciju razlika otežanom (rezultati nisu prikazani). U nastavku su detaljno opisani i raspravljeni rezultati prilagodbe

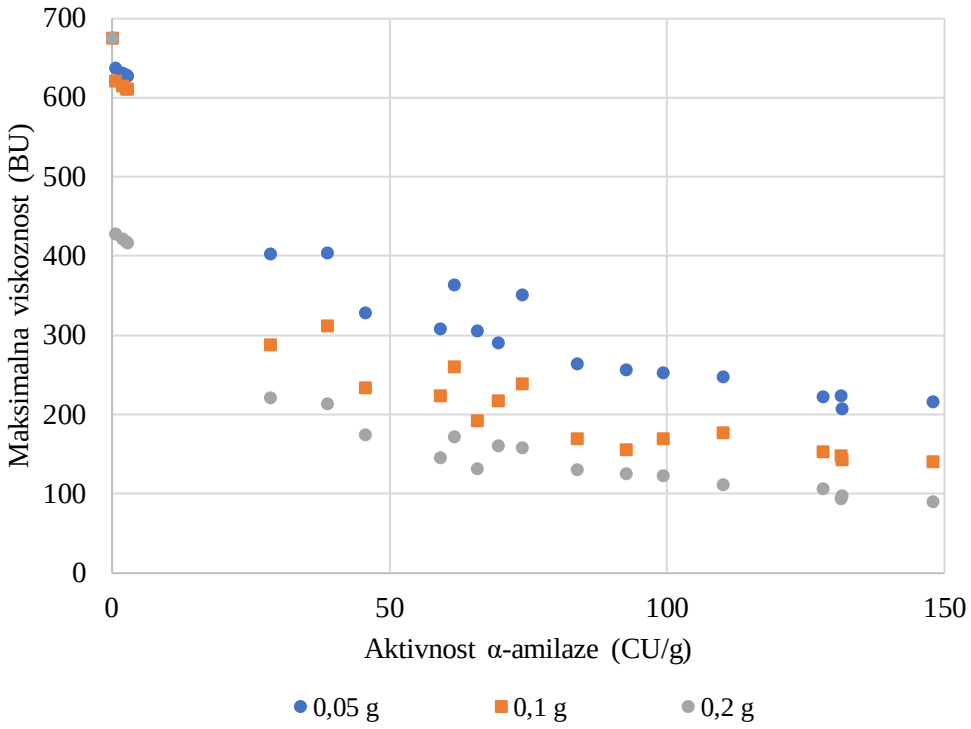
MVA metode za tri ključna amilografska parametra: maksimalnu viskoznost (PV), konačnu viskoznost (FV) i retrogradnu viskoznost (SV), jer se pokazalo da su upravo ovi parametri najosjetljiviji na promjene amilolitičke aktivnosti u uzorcima slada.



Slika 24 MVA krivulja standardnog uzoraka pšeničnog škroba

4.3.1. Upotreba alikvota sladnog brašna i sladnog ekstrakta u procjeni aktivnosti α-amilaze pomoću amilografskog parametra Maksimalna viskoznost (PV)

Maksimalna viskoznost (PV, engl. *Peak Viscosity*) postiže se u trenutku kada se postigne dinamička ravnoteža između procesa povećanja viskoznosti (bubrenje škrobnih granula uslijed apsorpcije vode) i procesa smanjenja viskoznosti (mehaničko i termičko razaranja granula) (Balet i sur., 2019; Mariotti i sur. 2005). Na **Slici 25** primjetan je značajan nelinearni eksponencijalni pad PV vrijednosti s porastom aktivnosti α-amilaze za sve tri ispitivane količine sladnog brašna. Ovaj je trend potpuno očekivan i objašnjava se mehanizmom djelovanja α-amilaze, koja kao endo-enzim nasumično cijepa unutarnje α-1,4-glikozidne veze u amilozi i amilopektinu, brzo smanjujući veličinu molekula škroba i dramatično reducirajući sposobnost škrobnih granula da bubrenjem povećaju viskoznost suspenzije (Goode i sur., 2005). Kvantitativna analiza ovih promjena dana je u **Tablici 12**, gdje nelinearni regresijski modeli pokazuju izrazito visoku korelaciju (r = 0,970 do 0,987) između PV vrijednosti i aktivnosti α-amilaze određene standardnom spektrofotometrijskom Ceralpha metodom.



Slika 25 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog brašna na parametar Maksimalna viskoznost (PV)

Tablica 12 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz dodatak različitih količina sladnog brašna (nelinearna regresijska estimacija povezanosti Maksimalne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

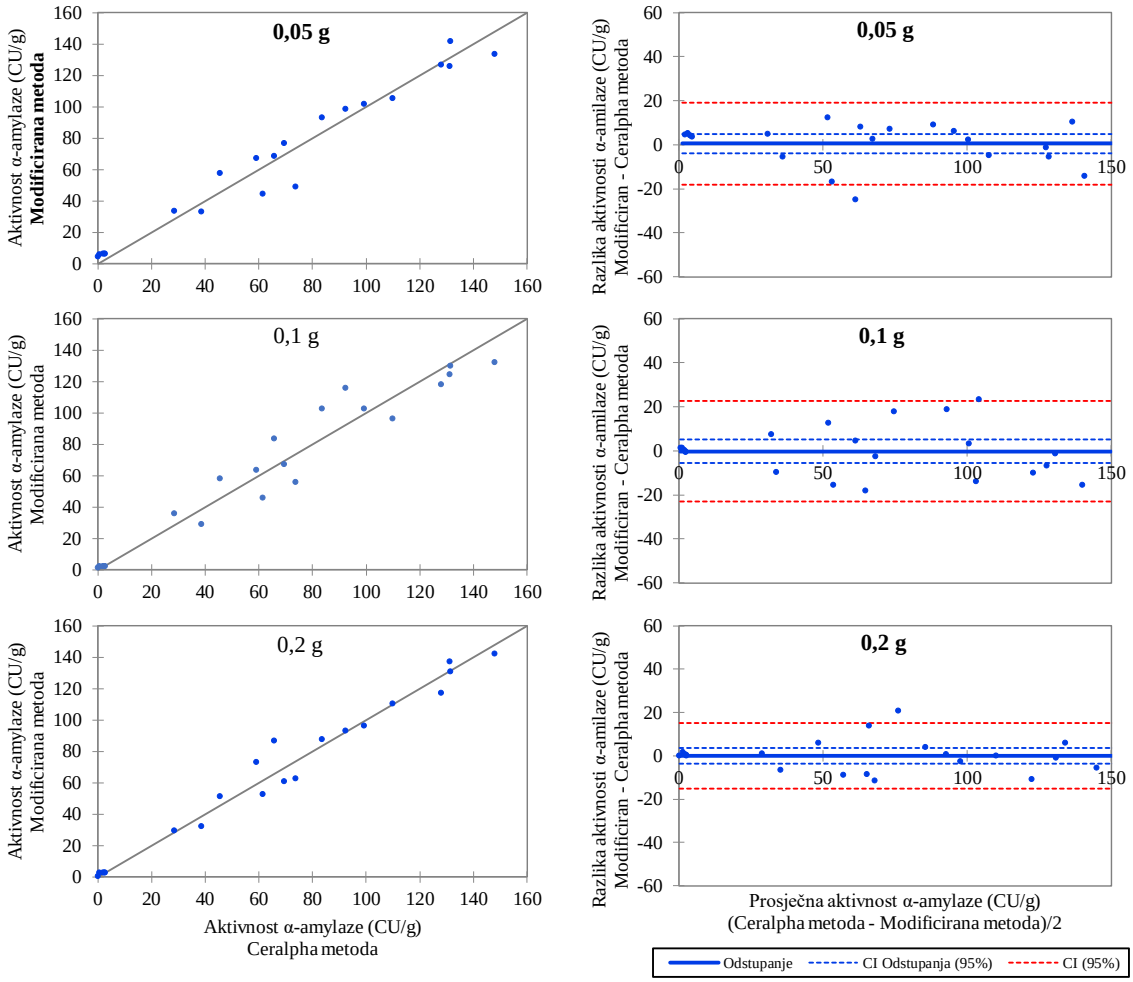
Sladno brašno (g)	**Jednadžba** [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	***s*$_r$ (CU/g)**
0,05	*AA* = 661,5*exp(-0,0074**PV*)	0,980	0,54	9,53	-3,80 - 4,87	661,5	2,87
0,1	*AA* = 460,3*exp(-0,0088**PV*)	0,970	-0,19	11,66	-5,50 - 5,12	460,3	1,97
0,2*	***AA* = 428,1*exp(-0,0121**PV*)**	**0,987**	**-0,03**	**7,75**	**-3,56 - 3,50**	**428,1**	**1,59**

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *PV* – Maksimalna viskoznost (BU); *r* – Pearsonov koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; *s*$_r$ – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

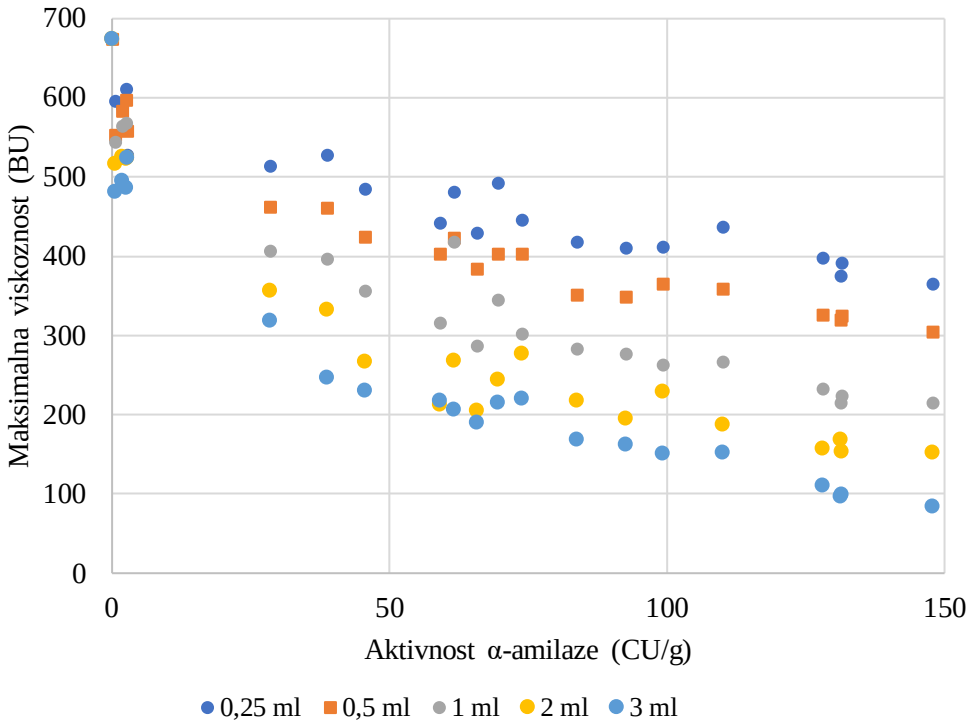
Najbolji statistički pokazatelji podudarnosti dobiveni su pri dodatku 0,2 g sladnog brašna, s eksponencijalnim modelom $AA = 428{,}1 \cdot \exp(-0{,}0121 \cdot PV)$, koji je pokazao izuzetno nisku sustavnu pogrešku (*Bias* = -0,03 CU/g) i najuži 95 %-tni interval pouzdanosti odstupanja (CI_B = -3,56 do 3,50 CU/g) te vrlo dobru ponovljivost (s_r = 1,59 CU/g). Osim toga, gornja granica kvantifikacije (*ULOQ*) od 428,1 CU/g za ovaj model znatno nadmašuje razinu aktivnosti svih analiziranih uzoraka u ovom istraživanju (**Tablica 4**), omogućujući pouzdanu primjenu čak i kod ekstremno aktivnih sladova. Validacija ovog parametra dodatno je potvrđena kroz Bland-Altmanove dijagrame koji pokazuju izvrsnu podudarnost s Ceralpha

metodom, uz minimalna odstupanja za sve tri ispitivane mase sladnog brašna (**Slika 26** i **Tablica 12**).



Slika 26 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane MVA metode s različitim količinama sladnog brašna (nelinearna estimacija povezanosti Maksimalne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze)

U sustavima s dodatkom sladnog ekstrakta uočen je identičan trend eksponencijalnog pada maksimalne viskoznosti (PV) s porastom enzimske aktivnosti (**Slika 27**). Primjenom različitih volumena ekstrakata (0,25 mL do 3,0 mL) reološki odgovor ispitivanih uzoraka doveden je u mjerljivo područje uređaja, a dobiveni statistički parametri nelinearnih modela prikazani su u **Tablici 13**. Koeficijenti korelacije kretali su se u rasponu od r = 0,950 do 0,988, potvrđujući izuzetno čvrstu povezanost reoloških promjena s enzimskom aktivnosti određenom standardnom Ceralpha metodom (McCleary i sur., 2002).



Slika 27 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog ekstrakta na parametar Maksimalna viskoznost (PV)

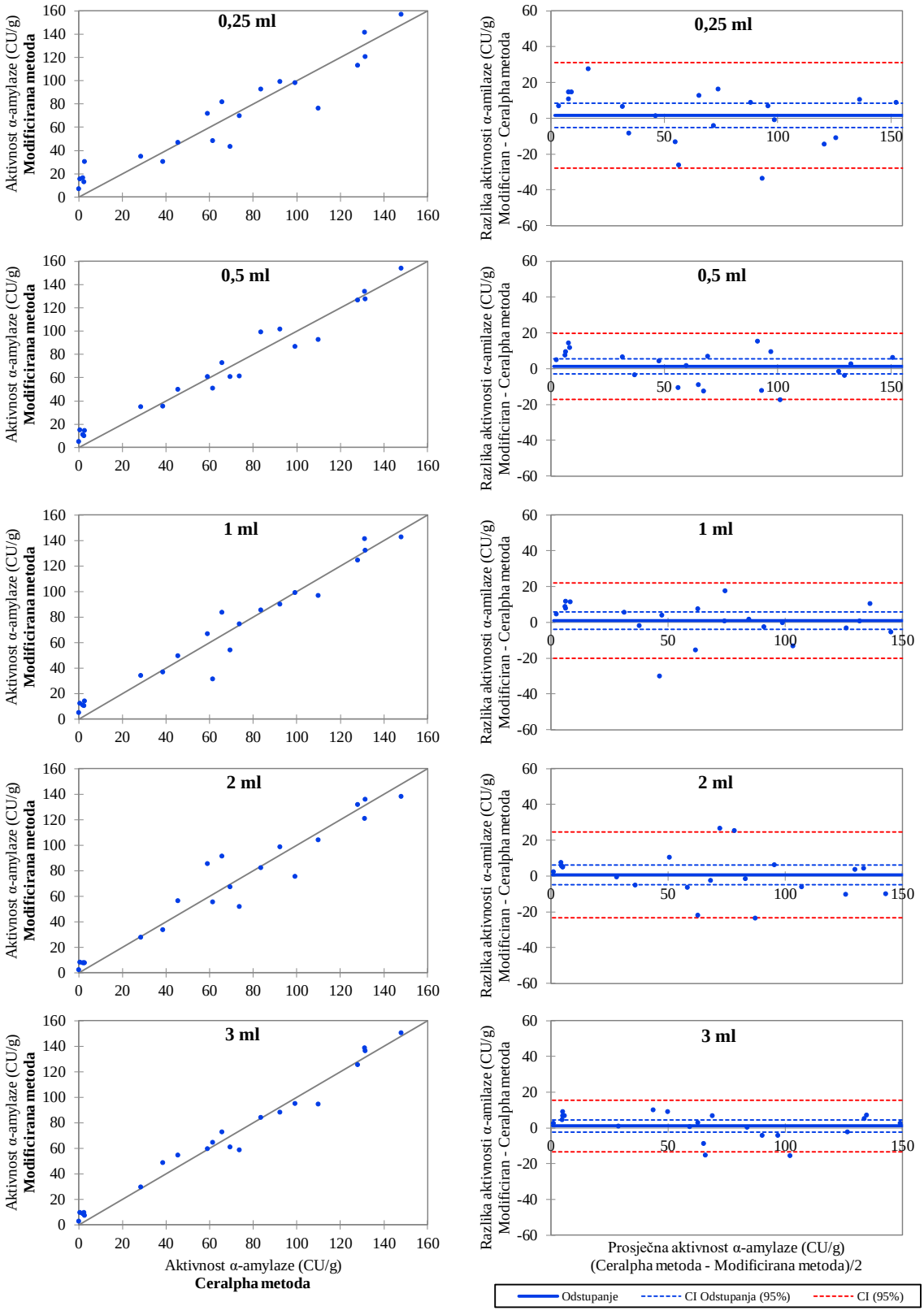
Tablica 13 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz dodatak različitih količina sladnog ekstrakta (nelinearna regresijska estimacija povezanosti Maksimalne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladni ekstrakt (ml)	**Jednadžba** [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	**s_r (CU/g)**
0,25	*AA* =6398,9*exp(-0,0101**PV*)	0,950	1,61	15,01	-5,22 - 8,44	6398,9	2,88
0,5	*AA* = 2723,6*exp(-0,0094**PV*)	0,980	1,36	9,42	-2,93 - 5,65	2723,6	1,69
1,0	*AA* = 706,6*exp(-0,0074**PV*)	0,975	0,94	10,72	-3,95 - 5,82	706,6	1,57
2,0	*AA* = 453,9*exp(-0,0078**PV*)	0,967	0,62	12,28	-4,97 - 6,21	453,9	1,55
3,0*	***AA* = 271,9*exp(-0,0069**PV*)**	**0,988**	**1,10**	**7,39**	**-2,26 - 4,46**	**271,9**	**1,28**

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *PV* – Maksimalna viskoznost (BU); *r* – Pearsonov koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

Kao što se vidi iz rezultata prikazanih u **Tablici 13**, s povećanjem volumena sladnog ekstrakta uočen je pad gornje teoretske granice kvantifikacije (*ULOQ*) s visokih 6398,9 CU/g (za 0,25 mL) na 271,9 CU/g (za 3,0 mL). Međutim, iako manji volumeni poput 0,25 mL teoretski omogućuju širi opseg mjerenja, oni pokazuju znatno veće standardne pogreške (*SE*$_B$ = 15,01 CU/g) i širok interval pouzdanosti.



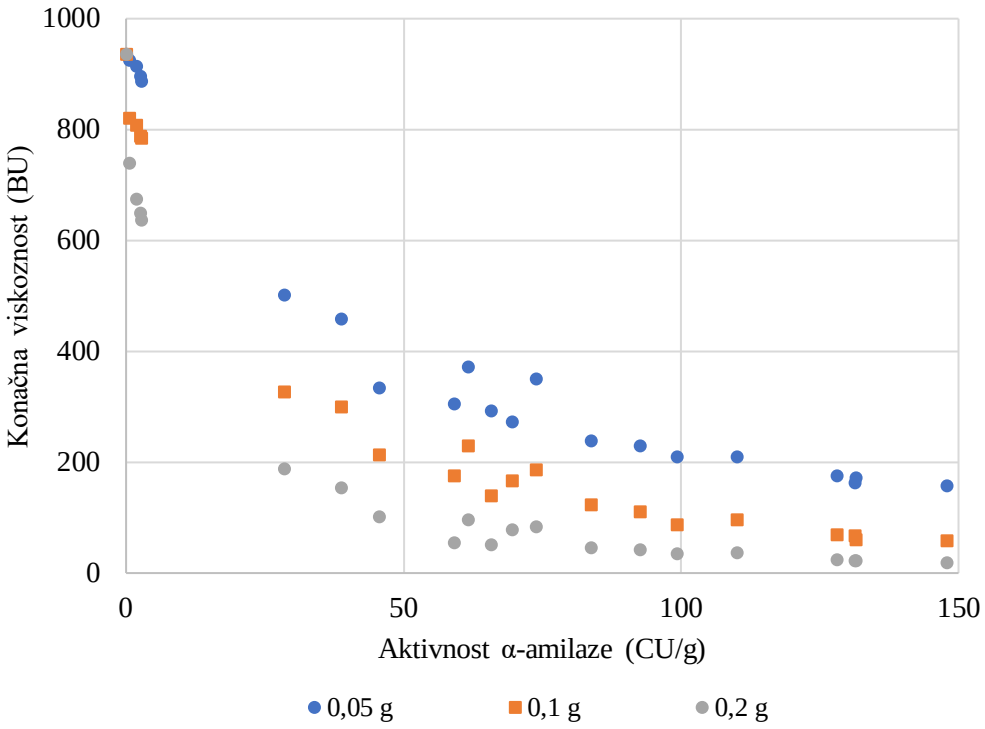
Slika 28 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane MVA metode s različitim količinama sladnog ekstrakta (nelinearna estimacija povezanosti Maksimalne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze)

Uzrok ovome leži u efektu razrjeđenja jer pri iznimno malim količinama sladnog ekstrakta, koncentracija α-amilaze u sustavu je vrlo niska, što smanjuje točnost diferencijacije uzoraka s bliskim vrijednostima enzimske aktivnosti. Nasuprot tome, volumen od 3,0 mL sladnog ekstrakta pokazao se prosječno optimalan za parametar PV, s jednadžbom $AA = 271{,}9 \cdot \exp(-0{,}0069 \cdot PV)$, najvećim koeficijentom korelacije ($r = 0{,}988$), najnižom standardnom pogreškom (SE_B = 7,39 CU/g) i najužim 95 %-tnim intervalom pouzdanosti odstupanja (CI_B = -2,26 do 4,46 CU/g), uz prihvatljivo sustavno odstupanje (*Bias* = 1,10 CU/g) i izvrsnu ponovljivost (s_r = 1,28 CU/g). Iako je *ULOQ* za ovaj model nešto niži (271,9 CU/g) (**Slika 28** i **Tablica 13**), on je i dalje više nego dovoljan za analizu visoko aktivnih uzoraka dobivenih u ovom radu (do 147,9 CU/g, **Tablica 4**).

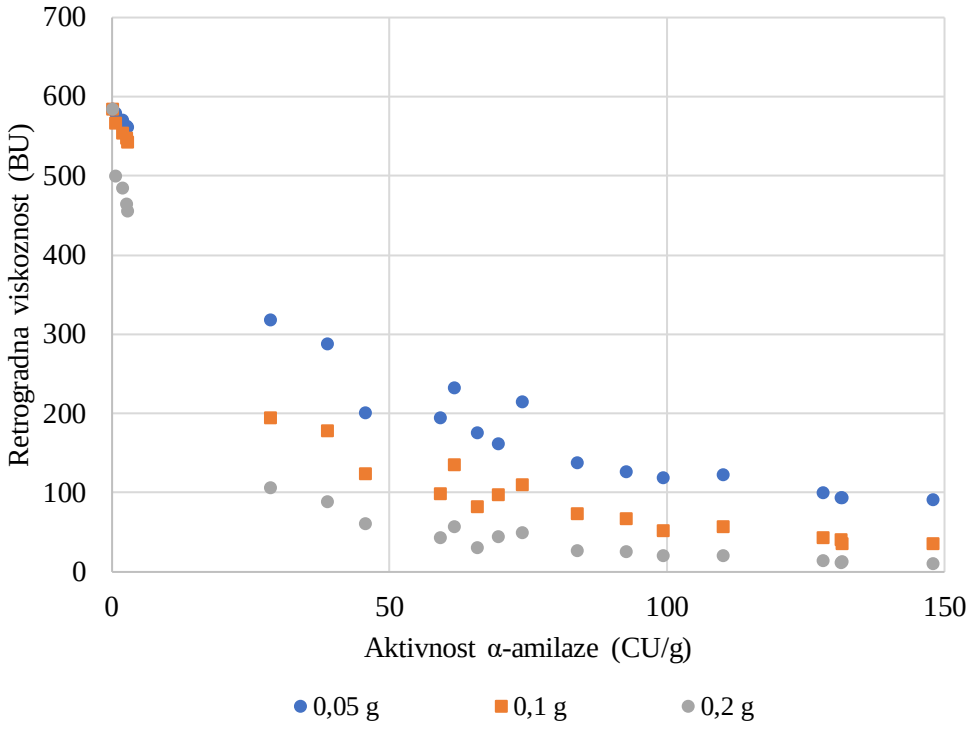
Ovi rezultati se podudaraju s opažanjima Goode i sur. (2005), koji su analizom viskoznosti komine pomoću RVA metode dokazali da prekomjerna koncentracija enzimski aktivnog slada može „preopteretiti“ sustav i dovesti do ekstremno niskih PV vrijednosti, pri čemu se gubi osjetljivost metode što kao posljedicu može imati „maskiranje“ razlike između uzoraka, odnosno otežati njihovo razlikovanje. Stoga je odabir optimalnog volumena ekstrakta (3,0 mL) ili mase sladnog brašna (0,2 g) ključan kompromis između maksimizacije mjernog opsega i postizanja visoke preciznosti i ponovljivosti mjerenja.

4.3.2. Upotreba alikvota sladnog brašna i sladnog ekstrakta u procjeni aktivnosti α-amilaze pomoću amilografskih parametara Konačna (FV) i retrogradna viskoznost (SV)

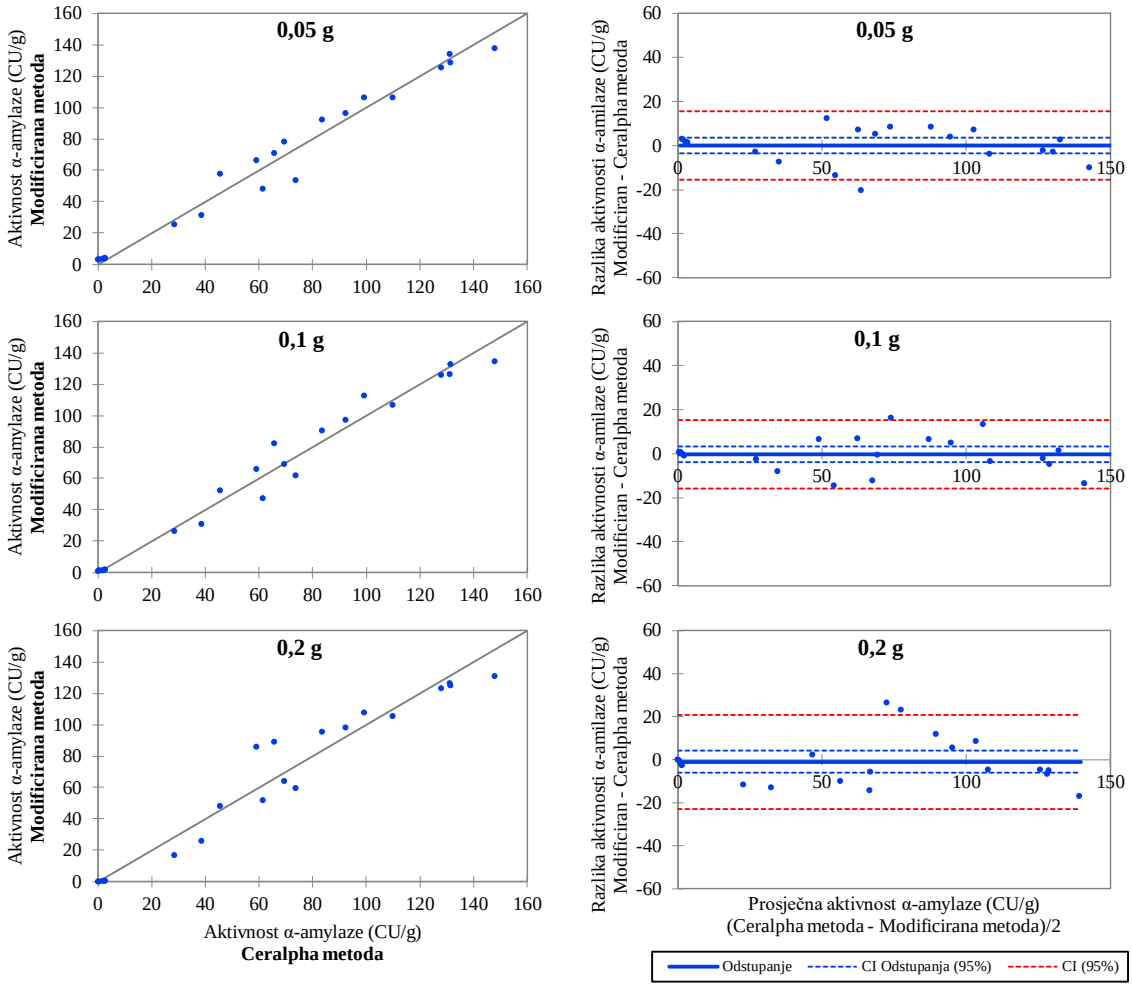
Konačna viskoznost (FV, engl. *Final Viscosity*) mjeri se na samom kraju reološkog ciklusa nakon faze hlađenja škrobne paste, dok se retrogradna viskoznost (SV, engl. *Setback Viscosity*) računa kao razlika između FV i minimalne viskoznosti postignute nakon želatinizacije (Balet i sur., 2019; Mariotti i sur., 2005). Oba parametra izravno odražavaju sposobnost reasocijacije i geliranja škrobne paste, ponajprije kroz retrogradaciju amiloze tijekom hlađenja. Za razliku od standardne FN metode, koja bilježi reološko ponašanje isključivo tijekom kratkog perioda zagrijavanja, MVA omogućuje detaljan uvid u to kako enzimski razgrađeni škrob reagira tijekom procesa hlađenja i geliranja.



Slika 29 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog brašna na parametar Konačna viskoznost (FV)



Slika 30 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog brašna na parametar Retrogradna viskoznost (SV)



Slika 31 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane MVA metode s različitim količinama sladnog brašna (nelinearna estimacija povezanosti Konačne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze)

Tablica 14 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz dodatak različitih količina sladnog brašna (nelinearna regresijska estimacija povezanosti Konačne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladno brašno (g)	**Jednadžba** [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	***s*$_r$ (CU/g)**
0,05*	***AA* = 299,7*exp(-0,0049****FV*****)**	**0,986**	**0,05**	**7,92**	**-3,55 - 3,66**	**299,7**	**3,44**
0,1	*AA* = 192,7*exp(-0,0061**FV*)	0,986	-0,35	7,92	-3,95 - 3,25	192,7	2,68
0,2	*AA* = 166,9*exp(-0,0121**FV*)	0,987	-1,05	11,22	-6,16 - 4,06	166,9	2,05

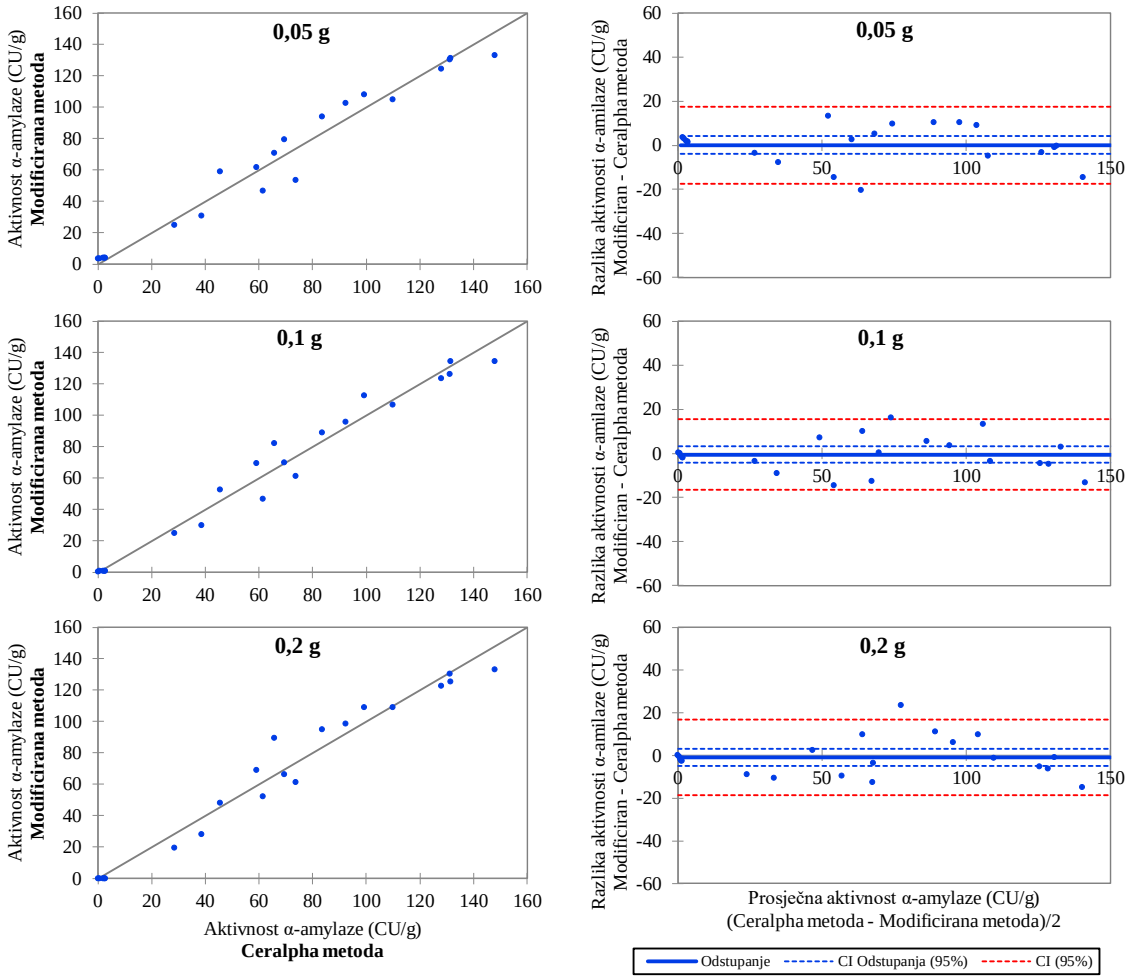
[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *FV* – Konačna viskoznost (BU); *r* – Pearsonov koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; *s*$_r$ – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

Slike 29 i **30** jasno pokazuju da i FV i SV parametri bilježe strmi, eksponencijalni pad s porastom aktivnosti enzima. Kod primjene sladnog brašna, model s 0,05 g brašna pokazao je

visoku točnost i preciznost za parametar FV ($AA = 299,7 \cdot \exp(-0,0049 \cdot FV)$; $r = 0,986$; *Bias* = 0,05 CU/g), ali uz nešto manju ponovljivost (s_r = 3,44 CU/g) i nešto niži *ULOQ*-a od 299,7 CU/g (**Tablica 14**). S povećanjem mase sladnog brašna na 0,2 g, *ULOQ* dodatno opada na 166,9 CU/g. Unatoč tome, Bland-Altmanova analiza (**Slika 31**) potvrdila je stabilnost predviđanja amilolitičke aktivnosti, uz blago podcjenjivanje vrijednosti za aktivnost α-amilaze (*Bias* = -0,35 do -1,05 CU/g) pri većim masama sladnog brašna.

Slično tome, za parametar retrogradne viskoznosti (SV) uočeni su relativno uski intervali pouzdanosti, npr. [-4,29 do 3,18 CU/g] za alikvot od 0,1 g brašna, uz koeficijente korelacije veće od $r = 0,982$ (**Slika 32** i **Tablica 15**).



Slika 32 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane MVA metode s različitim količinama sladnog brašna (nelinearna estimacija povezanosti Retrogradne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze)

Tablica 15 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz dodatak različitih količina sladnog brašna (nelinearna regresijska estimacija povezanosti Retrogradne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladno brašno (g)	**Jednadžba** [1]	***r***	**Odstupanje (CU/g)**	***SE*$_B$ (CU/g)**	***CI*$_B$ (95%) (CU/g)**	***ULOQ* (CU/g)**	**s_r (CU/g)**
0,05*	***AA* =263,4*exp(-0,0074*SV)**	**0,983**	**0,07**	**8,89**	**-3,98 - 4,12**	**263,4**	**4,12**
0,1	*AA* =196,5*exp(-0,0105**SV*)	0,985	-0,56	8,21	-4,29 - 3,18	196,5	3,18
0,2	*AA* = 165,6*exp(-0,0199**SV*)	0,982	-0,87	9,08	-5,00 - 3,27	165,6	3,27

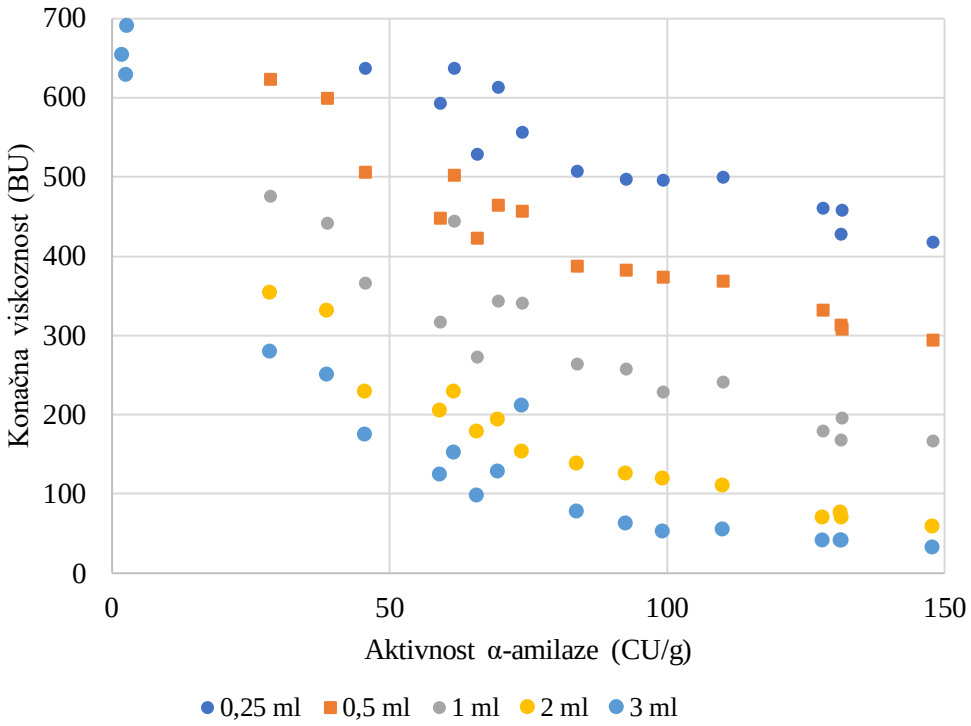
[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *SV* – Retrogradna viskoznost (BU); *r* – Pearsonov koeficijent korelacije; *SE*$_B$ – Standardna pogreška odstupanja; *CI*$_B$ – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

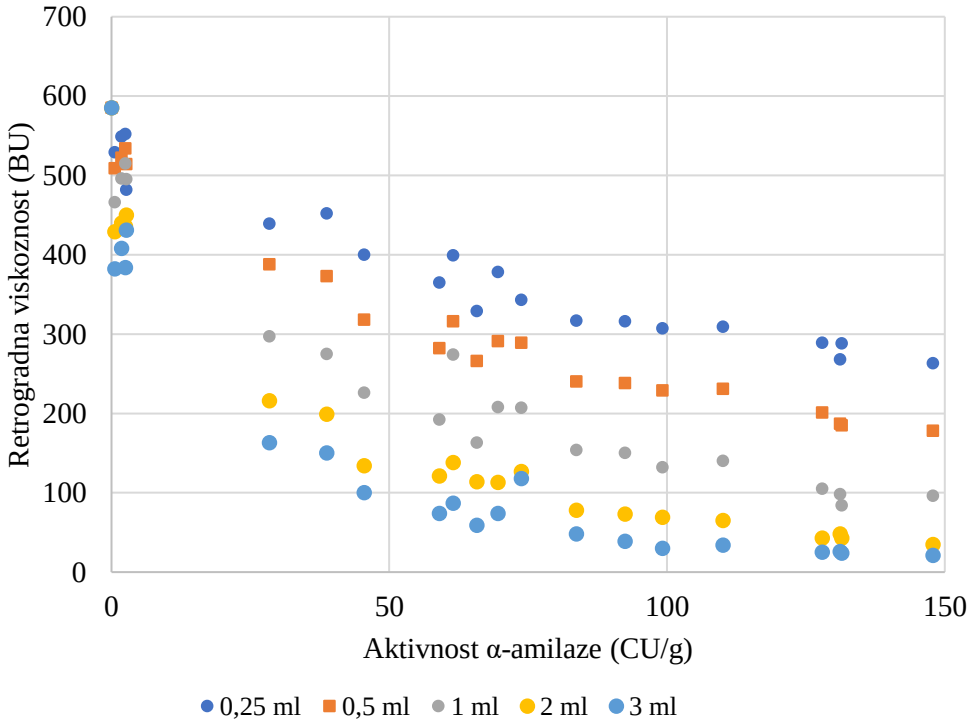
Ipak, *ULOQ* za SV bio je najniži, krećući se od 263,4 CU/g (za 0,05 g) do svega 165,6 CU/g (za 0,2 g). Za oba parametra (FV i SV) optimalna masa uzorka iznosila je 0,05 g. Kod većih masa, sustav je preopterećen enzimskom aktivnošću, pri čemu niske FV i SV vrijednosti onemogućuju preciznu diferencijaciju među uzorcima. Pri optimalnoj količini od 0,05 g, u sustavu ostaje dovoljno očuvanog, nehidroliziranog škroba koji formira mjerljivu strukturu gela tijekom hlađenja, dok je utjecaj α-amilaze i dalje dovoljno izražen da se jasno uoče razlike (Mariotti i sur., 2005).

Kada se u sustav dodaje sladni ekstrakt, reološki odziv u fazi hlađenja pokazuje analogne zakonitosti (**Slike 33** i **34**). Rezultati nelinearne regresijske analize i Bland-Altmanove analize za sladni ekstrakt prikazani su u **Tablicama 16** i **17** i na **Slikama 35** i **36**. Koeficijenti korelacije za sve volumene ekstrakata bili su izuzetno visoki, krećući se od r = 0,950 do 0,992, što potvrđuje visoku povezanost reoloških promjena s enzimskom aktivnosti određenom standardnom Ceralpha metodom.

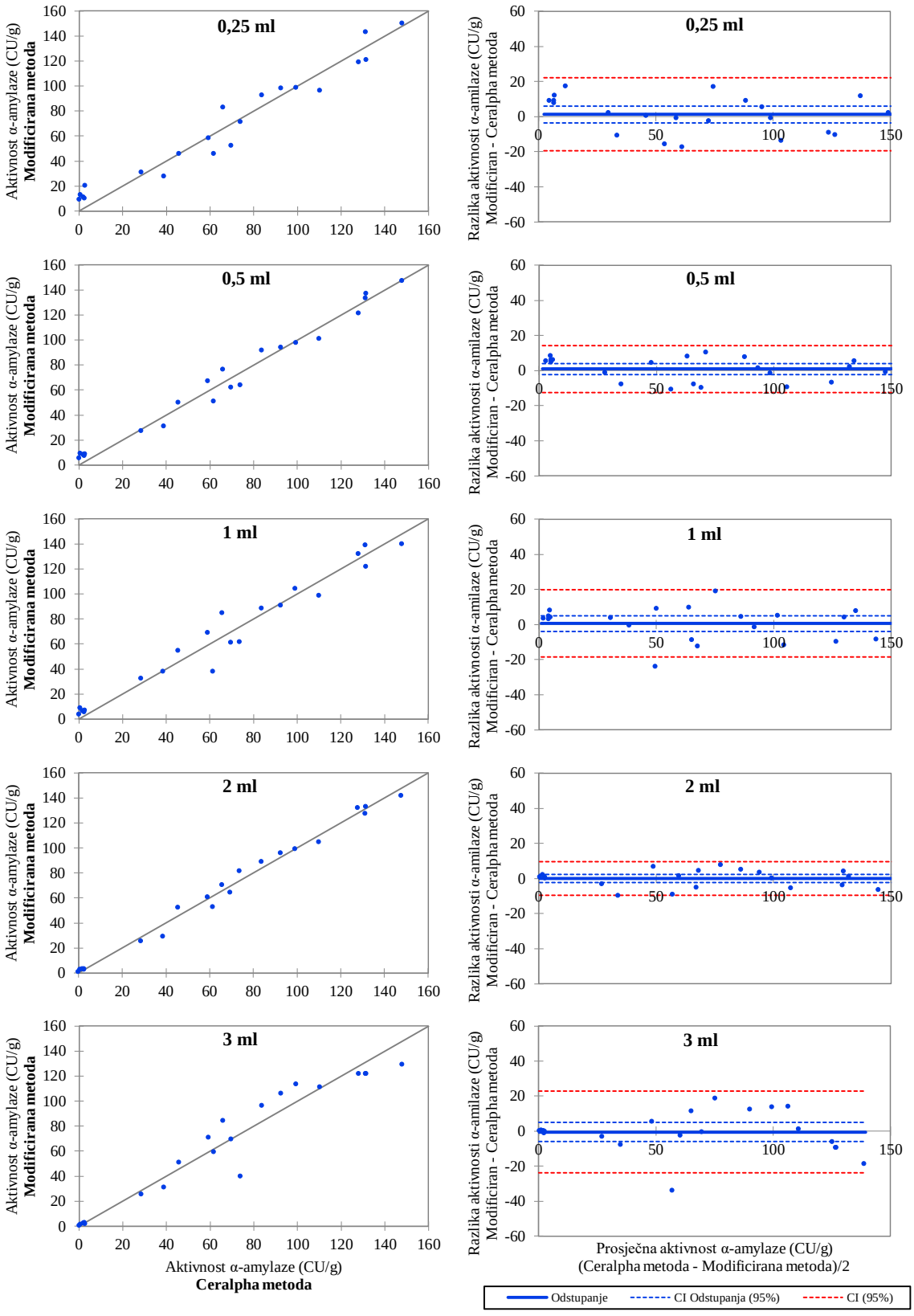
Statistička analiza pokazala je da je volumen od 0,5 mL sladnog ekstrakta bio prosječno najbolji za oba parametra (FV i SV). Za konačnu viskoznost (FV), model s 0,5 mL ekstrakta (AA = 661,7 · exp(-0,0051 · FV)) pokazao je izuzetno visoku korelaciju (r = 0,990), vrlo nisku pogrešku (SE_B = 6,86 CU/g), uzak interval pouzdanosti (CI_B = -2,22 do 4,03 CU/g), dobru ponovljivost (s_r = 2,99 CU/g) i odličan *ULOQ* od 661,7 CU/g (**Tablica 16**). Kod retrogradne viskoznosti (SV), dodatak 0,5 mL ekstrakta (AA = 575,5 · exp(-0,0077 · SV)) također je rezultirao izvrsnim parametrima: r = 0,988, *Bias* = 1,18 CU/g, SE_B = 7,55 CU/g, te uskim 95 %-tnim intervalom pouzdanosti odstupanja (CI_B = -2,26 do 4,61 CU/g), vrlo dobrom ponovljivošću (s_r = 1,59 CU/g), uz *ULOQ* od 575,5 CU/g (**Tablica 17**).



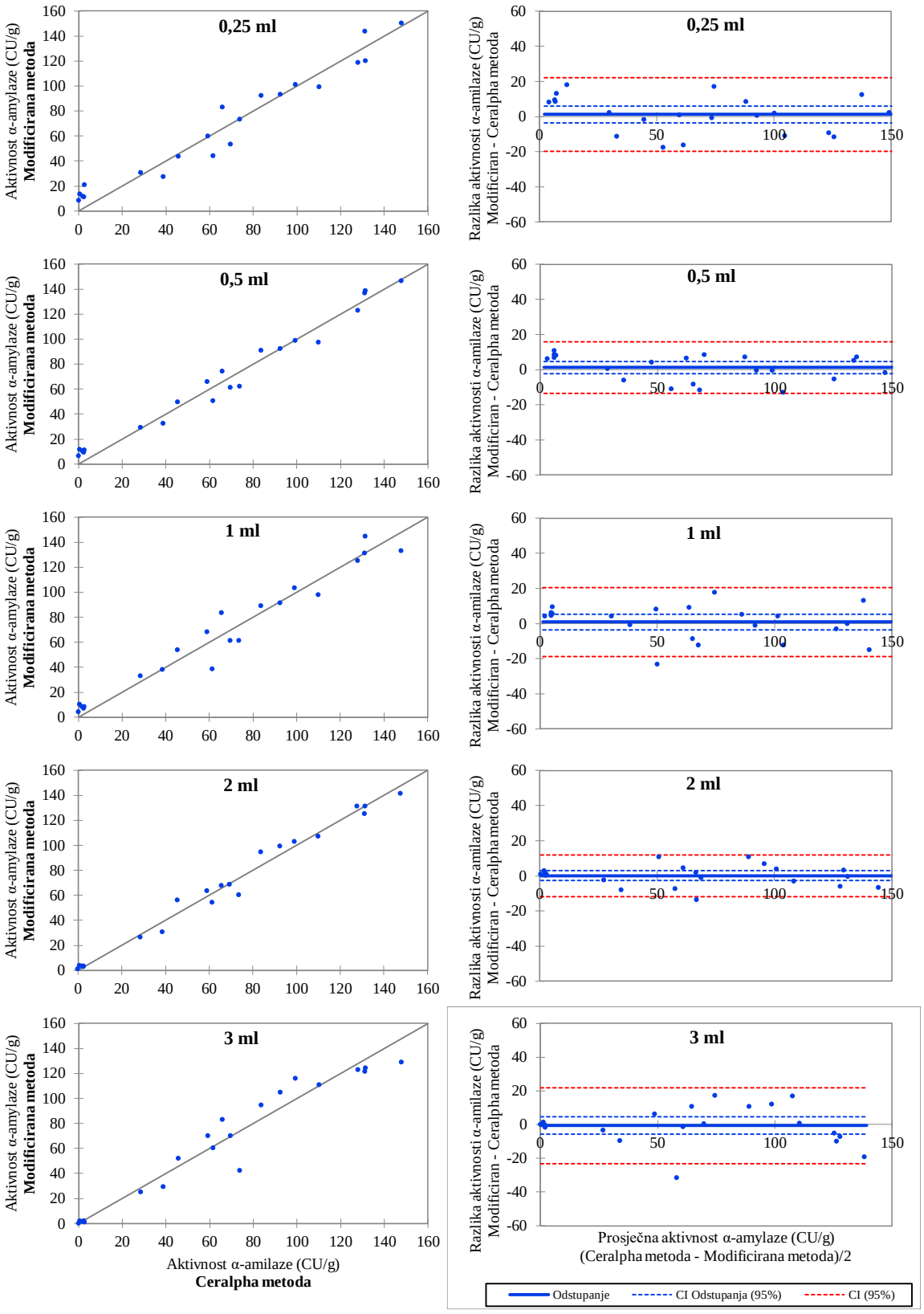
Slika 33 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog ekstrakta na parametar Konačna viskoznost (FV)



Slika 34 Utjecaj dodatka različitih količina sladnog ekstrakta na parametar Retrogradna viskoznost (SV)



Slika 35 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane MVA metode s različitim količinama sladnog ekstrakta (nelinearna estimacija povezanosti Konačne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze)



Slika 36 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane MVA metode s različitim količinama sladnog ekstrakta (nelinearna estimacija povezanosti Retrogradne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze)

Tablica 16 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz dodatak različitih količina sladnog ekstrakta (nelinearna regresijska estimacija povezanosti Konačne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladni ekstrakt (ml)	Jednadžba [1]	*r*	Odstupanje (CU/g)	SE_B (CU/g)	CI_B (95%) (CU/g)	*ULOQ* (CU/g)	s_r (CU/g)
0,25	*AA* = 1440,3*exp(-0,0054**FV*)	0,976	1,25	10,61	-3,58 - 6,08	1440,3	3,53
0,5*	***AA* = 661,7*exp(-0,0051**FV*)**	**0,990**	**0,91**	**6,86**	**-2,22 - 4,03**	**661,7**	**2,99**
1,0	*AA* = 308,5*exp(-0,0047**FV*)	0,980	0,65	9,71	-3,78 - 5,07	308,5	2,91
2,0	*AA* = 199,7*exp(-0,0058**FV*)	0,950	-0,01	4,91	-2,24 - 2,23	199,7	2,34
3,0	*AA* = 160,7*exp(-0,0066**FV*)	0,967	-0,50	11,90	-5,92 - 4,92	160,7	1,93

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *FV* – Konačna viskoznost (BU); *r* – Pearsonov koeficijent korelacije; SE_B – Standardna pogreška odstupanja; CI_B – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

Rezultati su pokazali da je povećanjem volumena ekstrakta (1,0 mL do 3,0 mL) dolazilo do preopterećenja sustava, jer visoka koncentracija aktivne α-amilaze uzrokuje potpunu razgradnju škrobnih lanaca već tijekom zagrijavanja. Zbog toga se tijekom faze hlađenja ne može formirati stabilna trodimenzionalna mreža gela (retrogradacija je minimalna), a vrijednosti FV i SV značajno padaju te postaju prebliske, što onemogućuje razlikovanje uzoraka visoke aktivnosti. S druge strane, manji volumeni (0,5 mL) osiguravaju optimalan omjer između koncentracije enzima i količine sačuvanog škroba, omogućujući jasno reološko razlikovanje uzoraka. Ovi se nalazi u potpunosti slažu s objašnjenjem za sladno brašno te s nalazima Mariotti i sur. (2005), koji ističu da su parametri u fazi hlađenja (FV i SV) izuzetno osjetljivi pokazatelji postotka preživjelog netaknutog škroba nakon enzimskog djelovanja, ali samo ako je koncentracija enzima pažljivo prilagođena reološkom kapacitetu supstrata.

Tablica 17 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz dodatak različitih količina sladnog ekstrakta (nelinearna regresijska estimacija povezanosti Retrogradne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

Sladni ekstrakt (ml)	Jednadžba [1]	*r*	Odstupanje (CU/g)	SE_B (CU/g)	CI_B (95%) (CU/g)	*ULOQ* (CU/g)	s_r (CU/g)
0,25	*AA* = 1606,2*exp(-0,0090**SV*)	0,976	1,22	10,67	-3,63 - 6,08	1606,2	3,02
0,5*	***AA* = 575,5*exp(-0,0077**SV*)**	**0,988**	**1,18**	**7,55**	**-2,26 - 4,61**	**575,5**	**2,12**
1,0	*AA* = 259,9*exp(-0,0070**SV*)	0,978	0,85	10,06	-3,73 - 5,43	259,9	2,08
2,0	*AA* = 195,7*exp(-0,0092**SV*)	0,992	0,06	6,10	-2,72 - 2,83	195,7	1,99
3,0	*AA* = 163,7*exp(-0,0115**SV*)	0,971	-0,54	11,50	-5,77 - 4,69	163,7	1,78

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *SV* – Retrogradna viskoznost (BU); *r* – Pearsonov koeficijent korelacije; SE_B – Standardna pogreška odstupanja; CI_B – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti

* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

Sveukupno gledajući, i modifikacija sa sladnim brašnom i modifikacija sa sladnim ekstraktom pokazale su se izuzetno uspješnima u premošćivanju prirodnog ograničenja MVA uređaja kod analize uzoraka s visokom amilolitičkom aktivnosti. Nelinearni eksponencijalni modeli omogućili su pouzdano i točno prevođenje reoloških parametara (PV, FV i SV) u vrijednosti aktivnosti α-amilaze izražene u klasičnim Ceralpha jedinicama (CU/g).

Za sustav sa sladnim brašnom, optimalni rezultati postignuti su s 0,2 g brašna za parametar PV (r = 0,987; SE_B = 7,75 CU/g) te s 0,05 g brašna za parametre očitane na dijelu krivulje koji se odnosi na hlađenje škrobne paste FV (r = 0,986) i SV (r = 0,983). S druge strane, u sustavima sa sladnim ekstraktom, najbolji pokazatelji podudarnosti postignuti su pri volumenu od 3,0 mL za PV (r = 0,988; SE_B = 7,39 CU/g) te pri 0,5 mL za parametre hlađenja FV (r = 0,990) i SV (r = 0,988). Između rezultata dobivenih s dvije reološke modifikacije (brašno vs. ekstrakt) nije zabilježena statistički značajna razlika u točnosti i preciznosti predviđanja, jer su koeficijenti korelacije i standardne pogreške odstupanja u oba slučaja bili iznimno bliski.

Iz perspektive praktične primjene u industrijskim i znanstveno-istraživačkim laboratorijima, izravna primjena modifikacije sa sladnim brašnom nudi značajne prednosti u odnosu na metodu sa sladnim ekstraktom. Naime, metoda sa sladnim ekstraktom zahtijeva dodatne i dugotrajne korake pripreme koji uključuju precizno vaganje, ekstrakciju enzima u puferu ili vodi, te naknadno centrifugiranje ili filtriranje kako bi se dobio bistri ekstrakt. Ti koraci ne samo da produljuju ukupno vrijeme analize za najmanje 30 do 45 minuta po uzorku, već povećavaju i potrošnju kemikalija te uvode dodatne izvore eksperimentalne pogreške povezane s učinkovitošću ekstrakcije (Jukić i sur., 2023).

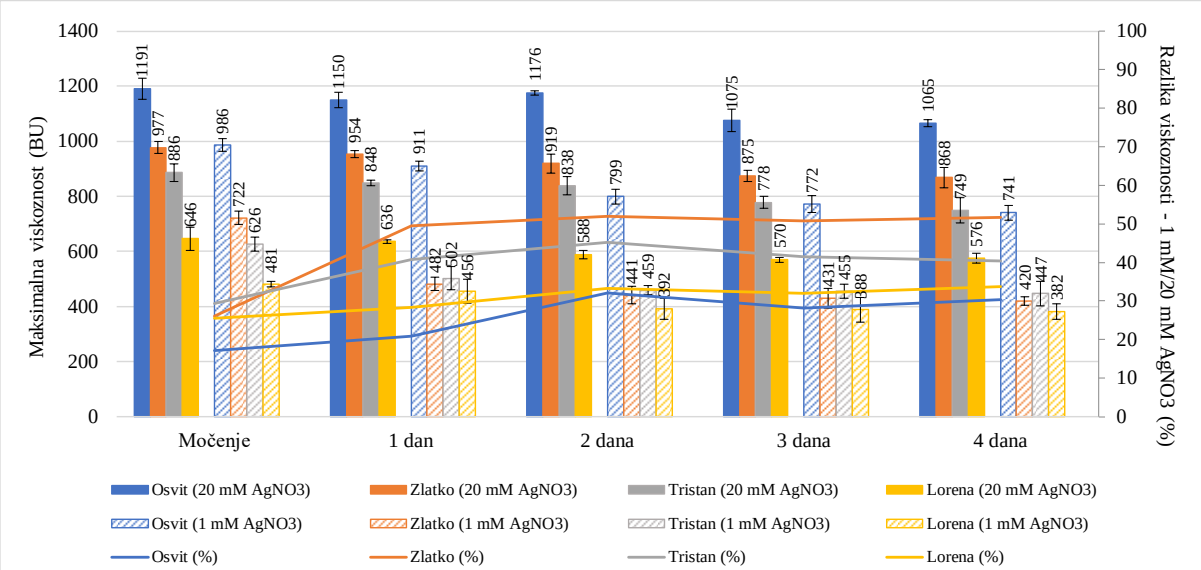
Nasuprot tome, izravno vaganje male količine sladnog brašna (0,1 g ili 0,2 g ovisno o ciljanom parametru) i njegovo miješanje sa standardnim škrobom (6,0 g za FN, odnosno prilagođena količina za MVA) drastično pojednostavljuje i ubrzava analizu, čineći je izuzetno pogodnom za brzu kontrolu kvalitete u mlinarskoj, pekarskoj, pivarskoj i destilerskoj industriji. Stoga se može zaključiti da izbor dodatka alikvota sladnog brašna, a ne sladnog ekstrakta, nudi optimalan omjer između točnosti rezultata i brzine izvođenja analize, uklanjajući potrebu za provođenjem ekstrakcije.

Ipak, za potrebe specifičnih reoloških i biokemijskih studija gdje je poželjno eliminirati utjecaj ostalih komponenti sladnog brašna (poput proteina, neškrobnih polisaharida, lipida i vlakana) na viskoznost škrobne paste, modifikacija s ekstraktom predstavlja izvrsnu opciju. Naime, iako je zbog malih količina dodanih alikvota sladnog brašna vjerojatnost mala, proteini i neškrobni

polisaharidi (npr. arabinoksilani i β-glukani) prisutni u cjelovitom sladnom brašnu mogu utjecati na reološka svojstva škrobne suspenzije kroz natjecanje za vodu i ometanje formiranja trodimenzionalne mreže gela (Balet i sur., 2019). Korištenjem sladnog ekstrakta u sustav se uvodi pretežno topljiva frakcija s enzimima, čime se eliminira fizikalni utjecaj netopljivih vlakana i proteina endosperma, što rezultira „čišćim“ reološkim odgovorom koji ovisi gotovo isključivo o enzimskoj degradaciji škroba.

4.3.3. Inaktivacija amilolitičkog sustava otopinama srebrovog nitrata u amilografskoj analizi

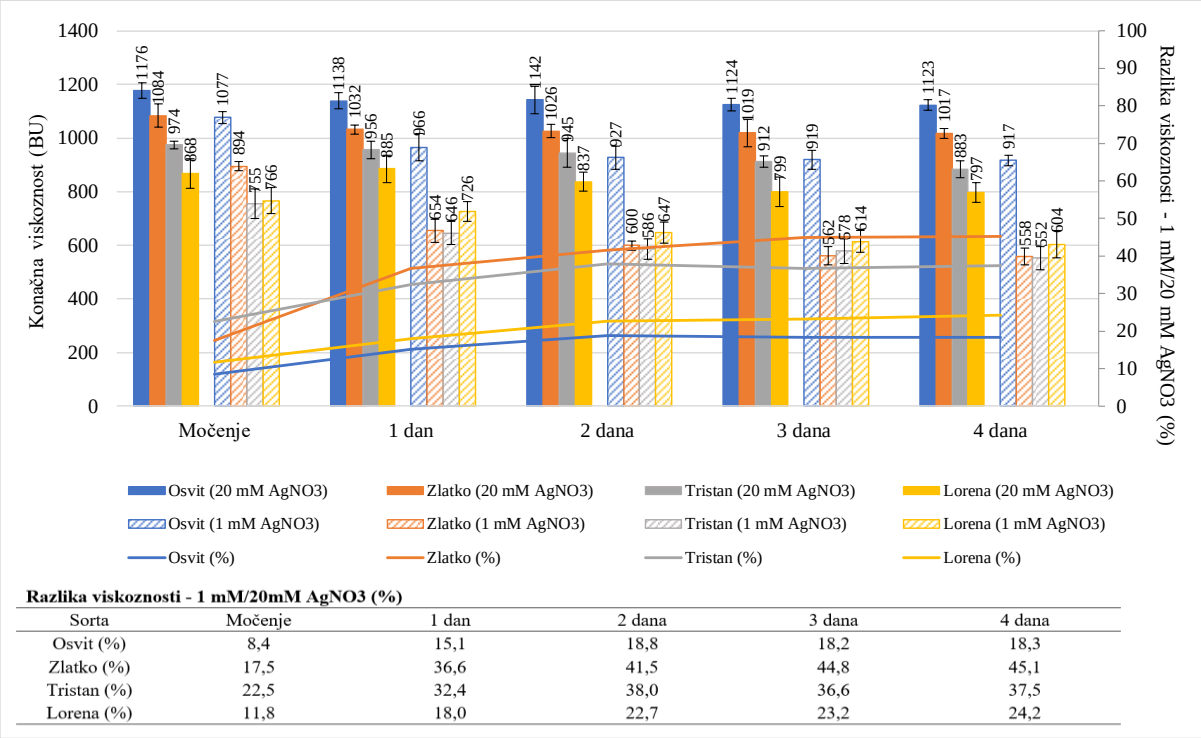
Na sličan način kao i kod FN metode, u okviru modifikacije mikro-viskoamilografske (MVA) metode ispitana je mogućnost parcijalne kemijske inaktivacije α-amilaze u sladnom brašnu pomoću otopina srebrovog nitrata. Preliminarno su umjesto vode za analizu korištene otopine AgNO3 u širokom rasponu koncentracija: 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 i 0,5 mM.



Razlika viskoznosti - 1 mM/20mM AgNO3 (%)

Sorta	Močenje	1 dan	2 dana	3 dana	4 dana
Osvit (%)	17,2	20,8	32,1	28,2	30,4
Zlatko (%)	26,1	49,5	52,0	50,7	51,6
Tristan (%)	29,3	40,8	45,2	41,5	40,3
Lorena (%)	25,5	28,3	33,3	31,9	33,7

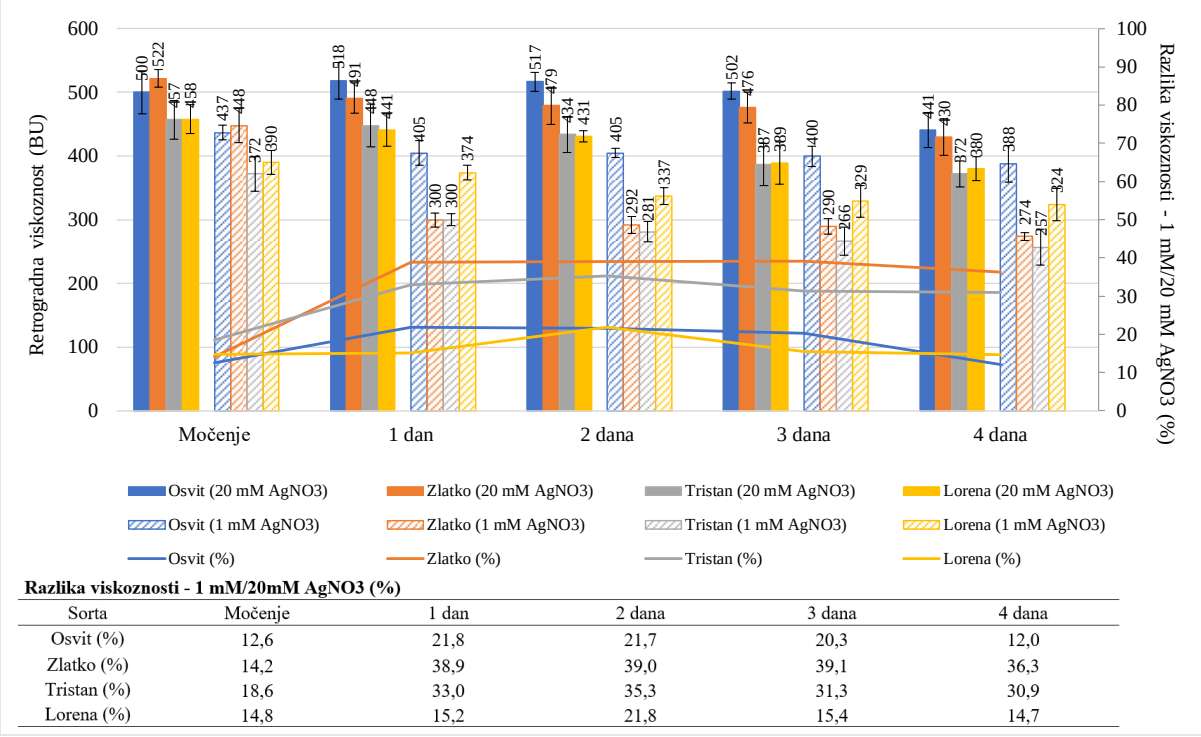
Slika 37 Utjecaj inaktivacije α-amilaze srebrovim nitratom (1 mM i 20 mM) na amilografski parametar Maksimalna viskoznost (PV)



Razlika viskoznosti - 1 mM/20mM AgNO3 (%)

Sorta	Močenje	1 dan	2 dana	3 dana	4 dana
Osvit (%)	8,4	15,1	18,8	18,2	18,3
Zlatko (%)	17,5	36,6	41,5	44,8	45,1
Tristan (%)	22,5	32,4	38,0	36,6	37,5
Lorena (%)	11,8	18,0	22,7	23,2	24,2

Slika 38 Utjecaj inaktivacije α-amilaze srebrovim nitratom (1 mM i 20 mM) na amilografski parametar Konačna viskoznost (FV)

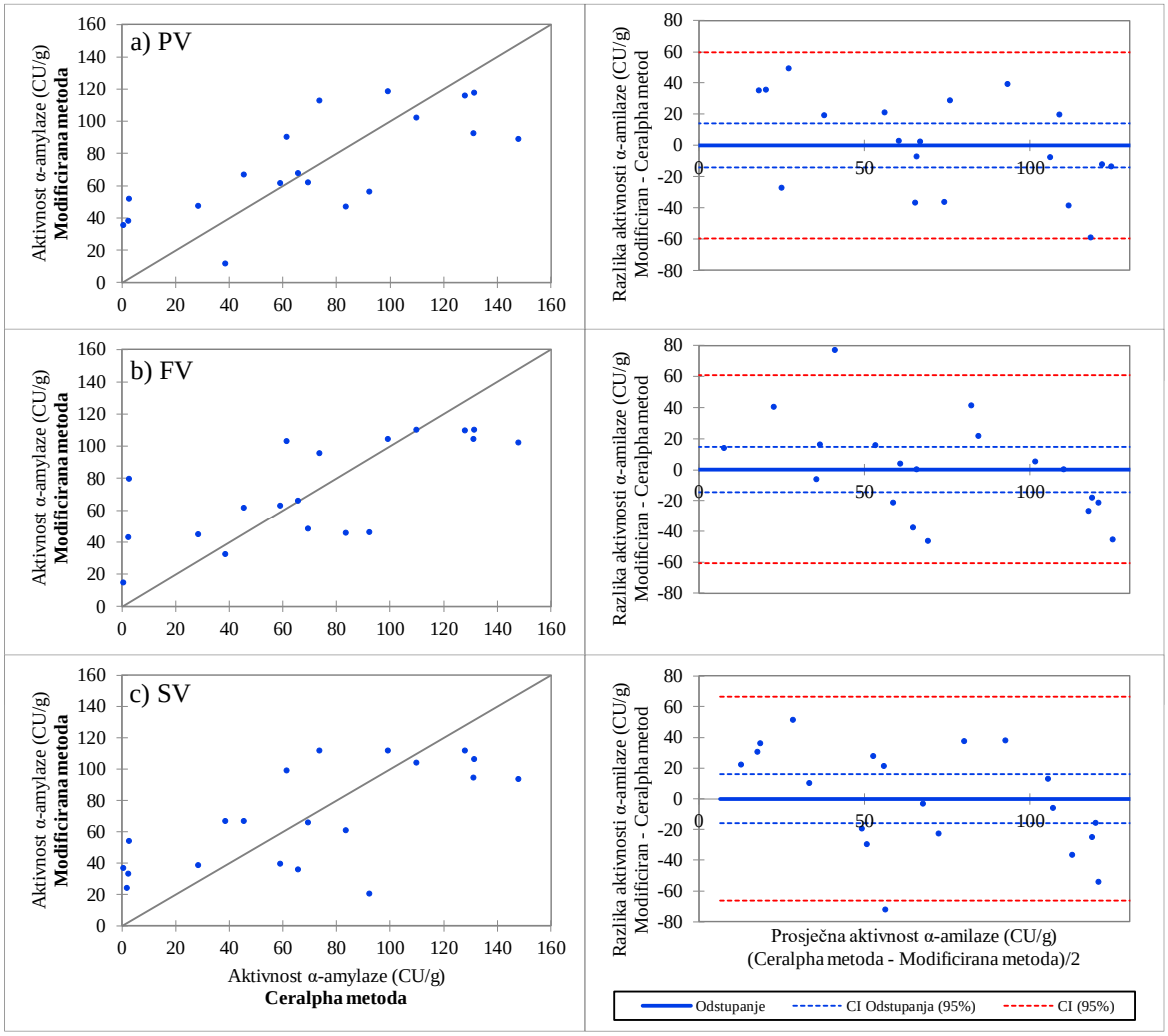


Razlika viskoznosti - 1 mM/20mM AgNO3 (%)

Sorta	Močenje	1 dan	2 dana	3 dana	4 dana
Osvit (%)	12,6	21,8	21,7	20,3	12,0
Zlatko (%)	14,2	38,9	39,0	39,1	36,3
Tristan (%)	18,6	33,0	35,3	31,3	30,9
Lorena (%)	14,8	15,2	21,8	15,4	14,7

Slika 39 Utjecaj inaktivacije α-amilaze srebrovim nitratom (1 mM i 20 mM) na amilografski parametar Retrogradna viskoznost (SV)

Na temelju preliminarnih rezultata za regresijsko modeliranje na temelju postotne razlike u viskoznosti (PV%, FV%, SV%) odabrane su koncentracije od 20 mM (potpuna inaktivacija) i 1 mM (parcijalna inaktivacija). Izmjerene vrijednosti viskoznosti i krivulja ovisnosti postotnog smanjenja viskoznosti prikazani su na **Slikama 37-39**, a nelinearna regresijska analiza (prirodna logaritamska funkcija s vertikalnim pomakom) i Bland-Altmanova analiza podudarnosti na **Slici 40** i u **Tablici 18**.



Slika 40 Bland-Altman analiza podudarnosti Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz inaktivaciju α-amilaze srebrovim nitratom (1 mM i 20 mM) (nelinearna estimacija povezanosti amilografskih parametara viskoznosti i aktivnosti α-amilaze); a) Maksimalna viskoznost (PV), b) Konačna viskoznost (FV), c) Retrogradna viskoznost (SV)

Kao i kod FN metode, dobiveni rezultati modeliranja uz parcijalnu inaktivaciju pokazali su nezadovoljavajuće niske koeficijente korelacije (r = 0,693 do 0,765) i vrlo velike standardne

pogreške odstupanja (SE_B > 30 CU/g), čime je dokazano da se parcijalna inaktivacija s 1 mM $AgNO_3$ ne može koristiti za precizno predviđanje aktivnosti α-amilaze **(Slika 40** i **Tablica 18**).

Tablica 18 Podudarnost između standardne Ceralpha metode i modificirane MVA metode uz inaktivaciju α-amilaze srebrovim nitratom (1 mM i 20 mM) (nelinearna regresijska estimacija povezanosti Retrogradne viskoznosti i aktivnosti α-amilaze i Bland-Altman analiza)

MVA	Jednadžba [1]	*r*	Odstupanje (CU/g)	SE_B (CU/g)	CI_B (95%) (CU/g)	*ULOQ* (CU/g)	s_r (CU/g)
PV	*AA* = 116,8*ln(*PV%*)-343,1	0,765	0,00	30,32	-14,19 – 14,19	195,0	3,44
FV	*AA* = 71,0*ln(F*V%*)-160,4	0,752	0,00	31,03	-14,52 – 14,52	166,6	4,04
SV	*AA* = 77,9*ln(S*V%*)-173,6	0,693	0,00	33,95	-15,89 – 15,89	185,1	4,53

[1] *AA* – Aktivnost α-amilaze (CU/g); *PV* – Maksimalna viskoznost (BU); *FV* – Konačna viskoznost (BU); *SV* – Retrogradna viskoznost (BU); *r* – Pearsonov koeficijent korelacije; SE_B – Standardna pogreška odstupanja; CI_B – 95% Interval pouzdanosti odstupanja; *ULOQ* – Gornja granica kvantifikacije; s_r – Standardna devijacija ponovljivosti
* Količina pri kojoj su prosječno dobiveni najbolji pokazatelji podudarnosti metoda

Glavni razlog neuspjeha modeliranja u MVA sustavu vjerojatno leži u dugotrajnosti samog testa (temperaturni ciklus traje preko 30 minuta). Tijekom sporog zagrijavanja i hlađenja, preostali ne-inaktivirani dio enzima ima predug vremenski prozor za djelovanje na škrob. Kod visokih aktivnosti α-amilaze, čak i minimalna aktivnost uzrokuje potpunu degradaciju škroba, dovodeći do gubitka reološke osjetljivosti (Mariotti i sur., 2005; Fox i sur., 2014). Osim toga, kako je već prethodno objašnjeno, budući da se pojedine vrste i sorte žitarica međusobno razlikuju u udjelu i svojstvima proteina i drugih neškrobnih spojevi poput prehrambenih vlakana, ali i u dinamici njihove razgradnje tijekom sladovanja, kapacitet nespecifičnog vezanja iona srebra u MVA suspenziji se neprekidno mijenja (Zhou i Mendham, 2005). To uzrokuje visoku nestabilnost koncentracije slobodnih iona Ag+ i dovodi do nekonzistentne parcijalne inhibicije, što objašnjava zašto Bland-Altmanovi statistički pokazatelji za parcijalnu inaktivaciju nisu zadovoljili stroge kriterije validacije.

S druge strane, potpuna inaktivacija s 20 mM $AgNO_3$ pružila je izvrstan uvid u nativna svojstva škroba i intenzitet njegove hidrolize tijekom sladovanja (Zhou i Mendham, 2005; Fox i sur., 2014). Kada se svi enzimi blokiraju, MVA viskogrami postaju odraz isključivo fizikalnih svojstava preostalog škroba slada. Primjerice, kod stočnog ječma Zlatko, maksimalna viskoznost (PV) pod potpunom inaktivacijom (20 mM) dramatično i progresivno opada s 977 BU (u fazi namakanja) do 868 BU nakon 4. dana klijanja (**Slika 37**). Podudarno tome, konačna viskoznost (FV) opada s 1084 BU na 1017 BU (**Slika 38**), a retrogradna viskoznost (SV) opada s 522 BU na 430 BU (**Slika 39**). Ovaj značajan pad viskoznosti pod utjecajem 20 mM $AgNO_3$ izravno se podudara s udjelom škroba i dinamikom njegove hidrolize iz **Tablice 3**.

Ovi rezultati reološki dokazuju da preostali škrob u zrnu, zbog enzimske razgradnje pretrpljene tijekom sladovanja, trajno gubi sposobnost bubrenja i retrogradacije (stvaranja trodimenzionalnog gela pri hlađenju), što se slaže s tvrdnjama koje su iznijeli Zhou i Mendham (2005) te Fox i sur. (2014).

4.4. Usporedba FN i MVA metode u svrhu određivanja aktivnosti α-amilaze

Usporedba reoloških metoda, poput metode određivanja broja padanja (FN) i mikro-viskoamilografskog (MVA) ispitivanja, ključna je za definiranje optimalnog analitičkog pristupa u praćenju iznimno visoke aktivnosti α-amilaze u sladnim brašnima. Iako se obje metode temelje na mjerenju promjena viskoznosti (likvefakciju) vruće škrobne paste uslijed amilolitičke razgradnje, one se značajno razlikuju po složenosti, količini informacija koje pružaju te praktičnoj primjenjivosti u industrijskom i laboratorijskom okruženju.

Metoda određivanja broja padanja (FN) tradicionalno je prepoznata diljem svijeta kao standardni, iznimno jednostavan i brz postupak za procjenu amilolitičke aktivnosti, no njezina primjena na čistim sladnim brašnima izravno je ograničena donjom granicom detekcije uređaja od 61 sekunde. Pri toj vrijednosti, miješalica FN uređaja odmah propada kroz potpuno ukapljenu pastu, što onemogućuje razlikovanje uzoraka s aktivnostima većim od približno 5 CU/g. Uspješna prilagodba ove metode uvođenjem standardnog pšeničnog škroba kao supstrata i upotrebom alikvota od svega 0,1 g sladnog brašna omogućila je linearnu (pomoću likvefakcijskog broja, LN) i nelinearnu estimaciju rezultata, proširujući mjerno područje na aktivnosti preko 400 CU/g (Jukić i sur., 2023). Najveća prednost ovako modificirane FN metode očituje se u njezinoj ekonomičnosti, brzini te potpunom izostavljanju dugotrajnog koraka ekstrakcije enzima, čime se omogućuje izravna analiza sladnog brašna u vrlo kratkom vremenu. S druge strane, njezino glavno ograničenje ostaje nemogućnost kontinuiranog praćenja fizikalno-kemijskih promjena tijekom cijelog ciklusa želatinizacije i hlađenja škroba, s obzirom na to da daje isključivo jedan zbirni brojčani podatak.

Nasuprot tome, mikro-viskoamilografska (MVA) metoda predstavlja znatno sofisticiraniji rotacijski viskozimetrijski sustav koji omogućuje kontinuirano snimanje cjelokupne reološke krivulje (viskograma) tijekom definiranog temperaturnog ciklusa zagrijavanja, zadržavanja visoke temperature te hlađenja škrobne paste (Balet i sur., 2019; Mariotti i sur., 2005). Time se dobiva uvid u više ključnih parametara poput maksimalne viskoznosti (PV), konačne

viskoznosti (FV) i retrogradne viskoznosti (SV), koji odražavaju biokemijsku dinamiku enzimske hidrolize, ali i fizikalne aspekte bubrenja granula te retrogradacije škroba (Balet i sur., 2019; Mariotti i sur., 2005). Ipak, slično kao i kod FN-a, visoka aktivnost α-amilaze u sladnim brašnima bez razrjeđenja dovodi do preopterećenja sustava i „ravnih" krivulja viskoznosti uslijed prebrze razgradnje škrobnih granula (Goode i sur., 2005). Modifikacija MVA metode pokazala je da je za optimalnu osjetljivost parametra PV potrebno dodati 0,2 g sladnog brašna (ili 3,0 mL sladnog ekstrakta), dok je za parametre hlađenja (FV i SV) optimalan dodatak od 0,05 g brašna (ili 0,5 mL sladnog ekstrakta) kako bi se sačuvao dovoljan udio škroba za stvaranje stabilnog gela (Mariotti i sur., 2005). Glavni nedostatak MVA sustava u odnosu na FN jesu visoki inicijalni troškovi opreme, složenije rukovanje te značajno duže trajanje pojedinačne analize.

Na temelju provedenih istraživanja i statističkih pokazatelja podudarnosti sa standardnom spektrofotometrijskom Ceralpha metodom, može se preporučiti da za rutinsku kontrolu u industrijama kao što su pivarska, destilerska i mlinsko-pekarska industrija, gdje su brzina, jednostavnost i niska cijena analize ključni za svakodnevno praćenje procesa sladovanja i kontrolu kvalitete, modificirana FN metoda s dodatkom 0,1 g sladnog brašna predstavlja optimalan izbor. Ova metoda pouzdano korelira s Ceralpha metodom, skraćuje vrijeme analize jer eliminira potrebu za ekstrakcijom i nudi izvrsnu ponovljivost. S druge strane, u znanstveno-istraživačkim laboratorijima te u ranim fazama oplemenjivanja žitarica, gdje je nužno detaljno razumijevanje interakcije između različitih genotipova škroba, proteina i dinamike enzimskog napada, modificirana MVA metoda predstavlja kompletnije analitičko rješenje. MVA pruža cjelovit uvid u reološko ponašanje sustava i omogućuje precizno praćenje faza hlađenja i retrogradacije, što je od kritične važnosti za razvoj novih proizvoda i selekciju različitih uzgojnih linija žitarica s poželjnim tehnološkim svojstvima. Za optimalnu točnost, preporučuje se praćenje PV vrijednosti uz dodatak 0,2 g sladnog brašna, dok se za parametre hlađenja (FV i SV) preporučuje dodatak od 0,05 g brašna.

Kao iznimno perspektivan smjer za buduća istraživanja predlaže se i primjena multivarijatne analize podataka (MDA, engl. *Multivariate Data Analysis*) ili kemometrije izravno na cjelokupne MVA viskografske krivulje (Cozzolino i sur., 2012). Umjesto konvencionalnog analiziranja pojedinačnih, izoliranih reoloških točaka (PV, FV, SV), primjena analize glavnih komponenti (PCA) i regresije djelomičnih najmanjih kvadrata (PLS) na cjelokupnom profilu krivulje omogućuje napredno prepoznavanje obrazaca i razvoj visoko preciznih prediktivnih modela. Na taj se način iz matematičkog oblika krivulje može uspješno klasificirati botaničko

podrijetlo i sorte žitarica (Zhu i sur., 2018), predvidjeti udio proteinskog matriksa ili oštećenog škroba (Guelpa i sur., 2015), te izravno procijeniti i predvidjeti fermentacijsku učinkovitost slada u pivarstvu i destilerstvu bez potrebe za provođenjem dugotrajnih i skupih eksperimentalnih testova.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju postavljenih hipoteza i rezultata dobivenih u ovom doktorskom istraživanju, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Sladovanje pšenice i ječma dovodi do progresivne i statistički značajne razgradnje škroba, uzrokovane aktivacijom i *de novo* sintezom amilolitičkih enzima. Udio škroba u nativnom zrnu kretao se od 58,9% kod stočnog ječma Zlatko do 66,6% kod pšenice Lorena, dok nakon četverodnevnog klijanja stupanj hidrolize škroba (HŠ) dostiže svoj maksimum od 60,8% kod stočnog ječma Zlatko, u usporedbi s najnižom razgradnjom od 40,7% kod pšenice Lorena.

- Značajna razgradnja škroba utvrđena je već u fazi namakanja (od 6,5% kod pivarskog ječma Tristan do čak 17,3% kod pšenice Lorena), i to u uvjetima kada je aktivnost *de novo* sintetizirane α-amilaze na samoj granici detekcije (≤0,1 CU/g). To potvrđuje ključnu ulogu prisutne β-amilaze koja se aktivira bez potrebe za novom sintezom.

- Aktivnost α-amilaze prati nelinearnu sigmoidalnu krivulju po danima klijanja. Kinetika promjene opisana modelom logističke regresije pokazala je najbrži porast aktivnosti kod stočnog ječma Zlatko, a najsporiji kod pšenice Lorena, što potvrđuje značajan utjecaj genotipa na brzinu mobilizacije enzimskog aparata.

- Unatoč kontinuiranom porastu aktivnosti α-amilaze između drugog i četvrtog dana klijanja kod svih uzoraka, intenzitet razgradnje škroba se značajno usporava i stabilizira što se može pripisati inhibiciji enzima produktima vlastite katalize (prvenstveno glukozom i maltozom) te lokalnog osmotskog učinka koji smanjuje aktivitet vode u blizini aktivnog mjesta enzima.

- Uvođenjem standardnog pšeničnog škroba visoke viskoznosti kao supstrata i značajnim smanjenjem udjela uzorka sladnog brašna u suspenziji, reološko ograničenje FN uređaja se može uspješno premostiti, čime se omogućuje točna reološka kvantifikacija izrazito visoke aktivnosti α-amilaze u sladu.

- Matematička transformacija FN vrijednosti u likvefakcijski broj (LN) omogućuje uspostavu visoko korelacijskog linearnog odnosa sa standardnom Ceralpha metodom ($r > 0,900$). Najveća linearna podudarnost i najmanja sustavna pogreška (Bias) postignuti su pri upotrebi optimalne mase od 0,1 g sladnog brašna.

- Primjena nelinearne eksponencijalne regresije izravno na FN vrijednosti pruža značajno veću točnost procjene, eliminira sustavno odstupanje i osigurava visoku gornju granicu kvantifikacije.

- Statistički pokazatelji Bland-Altmanove analize podudarnosti pokazali su da nema značajne razlike u točnosti predviđanja između modificirane FN metode s 0,1 g sladnog brašna i one s 2,0 mL ekstrakta. Stoga se modificirana metoda s 0,1 g sladnog brašna preporučuje kao optimalna i brza metoda za rutinsku kontrolu jer u potpunosti eliminira dugotrajan korak ekstrakcije enzima.

- Mikro-viskoamilografska metoda je uspješno prilagođena za analizu visoko aktivnih sladova uvođenjem standardnog pšeničnog škroba kao supstrata. Za parametar maksimalne viskoznosti (PV) kao optimalna pokazala se primjena 0,2 g sladnog brašna ili 3,0 mL sladnog ekstrakta, dok je za parametre konačna viskoznost (FV) i retrogradna viskoznost SV) optimalna količina bila svega 0,05 g brašna ili 0,5 mL ekstrakta.

- Postupci s parcijalnom inaktivacijom amilolitičkog sustava slada u svrhu procjene aktivnosti α-amilaze pokazali su se kao nezadovoljavajući zbog kemijske reaktivnosti iona srebra (Ag^+) koji se nespecifično i izrazito snažno vežu na proteinske sulfhidrilne (-SH) skupine endosperma i neškrobne pentozane slada.

- Upotreba 20 mM otopine srebrovog nitrata u modificiranim FN i MVA metodama osigurala je potpunu inaktivaciju cjelokupnog amilolitičkog sustava slada. Stoga, reološki profili dobiveni u ovim uvjetima predstavljaju izravan odraz isključivo nativnih fizikalno-kemijskih svojstava škroba.

- Modificirana FN metoda s 0,1 g sladnog brašna predstavlja brzu, jednostavnu i ekonomičnu metodu prikladnu za rutinsku kontrolu u mlinarstvu i pivarstvu. Nasuprot tome, modificirana MVA metoda je složenija i dugotrajnija, ali nezamjenjiva u znanstvenim istraživanjima i oplemenjivačkim programima jer pruža cjelovit viskografski otisak i omogućuje praćenje retrogradacije škrobne paste.

6. LITERATURA

AACC International. (2010) 'Method 22-02.01: Measurement of Alpha-Amylase in Plant and Microbial Materials Using the Ceralpha Method', u *AACC Approved Methods of Analysis*, 11. izd. St. Paul, MN, SAD: AACC International, doi:10.1094/aaccintmethod-22-02.01

AACC International. (2010) 'Method 56-81.03: Determination of Falling Number', u *AACC Approved Methods of Analysis*, 11. izd. St. Paul, MN, SAD: AACC International, doi:10.1094/aaccintmethod-56-81.03

AACC International. (2010) 'Method 76-13.01: Total Starch Assay Procedure (Megazyme Amyloglucosidase/alpha-Amylase Method)' u *AACC Approved Methods of Analysis*, 11. izd. St. Paul, MN, SAD: AACC International, doi:10.1094/aaccintmethod-22-02.01

American Society of Brewing Chemists. (2011) 'ASBC Methods of Analysis - Sprout Damage by the Falling Number Method (Barley 12A)', *14. izd. St. Paul, MN: ASBC.* doi: 10.1094/ASBCMOA-Barley-12

Ammar, M.K., Hanafi, S.R., Choucry, A. M. i Handoussa, H. (2023) 'Structural, functional, nutritional composition and analytical profiling of Triticum aestivum L.', *Applied Biological Chemistry*, 66, 48. doi: 10.1186/s13765-023-00804-3

Ao, Z. i Jane, J.-L. (2007) 'Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale, and barley', *Carbohydrate Polymers*, 67(1), str. 46–55. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.04.013

AOAC International (2002) 'AOAC Official Method 2002.01: Measurement of α-Amylase Activity in White Wheat Flour, Milled Malt, and Microbial Enzyme Preparations, Using the Ceralpha Assay'. Gaithersburg: AOAC International

Arends, A.M. Fox, G.P., Henry, R.J., Marschke, R.J. i Symons, M. H. (1995) 'Genetic and Environmental Variation in the Diastatic Power of Australian Barley', *Journal of Cereal Science*, 21(1), str. 63–70. doi: 10.1016/S0733-5210(95)80009-3

Arendt, E.K. i Zannini, E., (2013) *'Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*', Cambridge: Woodhead Publishing, doi: 10.1533/9780857098924

Ariyarathna, P., Mizera, P., Walkowiak, J. i Dziedzic, K. (2025) 'Physicochemical and Functional Properties of Soluble and Insoluble Dietary Fibers in Whole Grains and Their Health Benefits', *Foods*, 14(14), 2447. doi: 10.3390/foods14142447

Arruda, T.R., Machado, G.O., Marques, C.S., Souza, A.L., Pelissari, F.M., Oliveira, T.V. i Silva, R.R.A. (2025) 'An Overview of Starch-Based Materials for Sustainable Food Packaging: Recent Advances, Limitations, and Perspectives', *Macromol*, 5(2), p. 19. doi: 10.3390/macromol5020019

Aslam, M.F., Ellis, P.R., Berry, S. E., Latunde-Dada, G.O. i Sharp, P.A. (2018) 'Enhancing mineral bioavailability from cereals: Current strategies and future perspectives', Nutrition Bulletin, 43(2), str. 184–188. doi: 10.1111/nbu.12324

Atwell, W.A., Hood, L.F., Lineback, D.R., Varriano-Marston, E. i Zobel, H.F. (1988) 'The terminology and methodology associated with basic starch phenomena', *Cereal Foods World*, 33(3), str. 306–311.

Atwell, W.A., 2001. *Wheat Flour*. St. Paul, Minnesota: Eagan Press.

Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W. i Salamini, F. (2000) 'On the origin and domestication history of barley

(*Hordeum vulgare*)', *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), str. 499–510. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026328

Baik, B.-K. i Ullrich, S.E. (2008) 'Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest', *Journal of Cereal Science*, 48(2), str. 233–242. doi: 10.1016/j.jcs.2008.02.002

Bak-Jensen, K.S., Laugesen, S., Ostergaard, O., Finnie, C., Roepstorff, P. i Svensson, B. (2007) 'Spatio-temporal profiling and degradation of alpha-amylase isozymes during barley seed germination. *The FEBS journal*, 274(10), str. 2552–2565. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05790.x

Balet, S., Guelpa, A., Fox, G. i Manley, M. (2019) 'Rapid Visco Analyser (RVA) as a Tool for Measuring Starch-Related Physiochemical Properties in Cereals: a Review', *Food Analytical Methods, 12(10), str. 2344–2360.* doi:10.1007/s12161-019-01581-w

Baranwal, D. (2017) 'Malting: An indigenous technology used for improving the nutritional quality of grains - A review', *Asian Journal of Dairy and Food Research, 36(3), str. 179-183.* doi:10.18805/ajdfr.v36i03.8960

Barnes, W.C. and Blakeney, A.B. (1974) 'Determination of cereal alpha-amylase using a commercially available dye-labelled substrate', *Stärke*, 26(6), str. 193–197. doi: 10.1002/star.19740260605

Batey, I.L. i Curtin, B.M. (2000) 'Effects on pasting viscosity of starch and flour from different operating conditions for the rapid visco analyser', *Cereal Chemistry*, 77(6), str. 754–760. doi:10.1094/CCHEM.2000.77.6.754

Batey, I.L., Curtin, B.M. i Moore, S. A. (1997) 'Optimization of Rapid-Visco Analyser test conditions for predicting Asian noodle quality', *Cereal Chemistry*, 74(4), str. 497–501. doi:10.1094/CCHEM.1997.74.4.497

Bera, S., Sabikhi, L. i Singh, A. K. (2018) 'Assessment of malting characteristics of different Indian barley cultivars', *Journal of Food Science and Technology, 55(2), str. 704–711.* doi:10.1007/s13197-017-2981-1

Bertoft, E. (2017) 'Understanding Starch Structure: Recent Progress', *Agronomy*, 7(3), 56. doi: 10.3390/agronomy7030056

Betts, N.S., Wilkinson, L.G., Khor, S.F., Shirley, N.J., Lok, F., Skadhauge, B., Burton, R.A., Fincher, G.B. i Collins, H.M. (2017). Morphology, carbohydrate distribution, gene expression, and enzymatic activities related to cell wall hydrolysis in four barley varieties during simulated malting. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1872. doi: 10.3389/fpls.2017.01872

Bhatty, R. S. (1996) 'Production of food malt from hull-less barley', *Cereal Chemistry, 73(1), str. 75-80.*

Bland, J.M. i Altman, D.G. (1999) 'Measuring Agreement in Method Comparison Studies', *Statistics in Medicine*, 8(2), str. 135–160. doi: 10.1177/096228029900800204

Brennan, M., Shepherd, T., Mitchell, S., Topp, C.F.E. i Hoad, S.P. (2017) 'Husk to caryopsis adhesion in barley is influenced by pre- and post-anthesis temperatures through changes in a cuticular cementing layer on the caryopsis', *BMC Plant Biology*, 17, 169. doi: 10.1186/s12870-017-1113-4

Brlek, T., Jukić, Ž. i Matković, A. (2018) 'Procesi tijekom nalijevanja zrna i njihov utjecaj na kakvoću zrna pšenice namijenjenog za mlinsko-pekarsku industriju', *Agronomski glasnik*, 80(3), str. 173–186. doi: 10.33128/ag.80.3.3

Bwanganga, J.C., Béra, F. i Philippe, T. (2012) 'Modelling the β-amylase activity during red sorghum malting when Bacillus subtilis is used to control mould growth', *Journal of Cereal Science, 57(1), str. 104-109.* doi:10.1016/j.jcs.2012.10.004

Cannon, A.E., Marston, E.J., Kiszonas, A.M, Hauvermale, A.L. i Deven R. See, D.R. (2022) 'Late-Maturity α-Amylase (LMA): Exploring the Underlying Mechanisms and End-Use Quality Effects in Wheat', *Planta*, 255(1), 2. doi: 10.1007/s00425-021-03749-3

Caspers, M.P., Lok, F., Sinjorgo, K., Van Zeijl, M.J., Nielsen, K.A. i Cameron-Mills, V. (2001) 'Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo-β-1,4-xylanase from barley aleurone during germination', *The Plant Journal*, 26(2), str. 191–204. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01019.x

Chang, S.Y., Delwiche, S.R. i Wang, N.S. (2002) 'Hydrolysis of wheat starch and its effect on the Falling Number procedure: Mathematical model', *Biotechnology and Bioengineering*, 79(7), str. 768–775. doi: 10.1002/bit.10333

Chang, S.Y., Delwiche, S.R. i Wang, N.S. (1999) 'Hydrolysis of Wheat Starch and Its Effect on the Falling Number Procedure: Experimental Observations', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(1), str. 19–24. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199901)79:1<19::AID-JSFA160>3.0.CO;2-O

Chen, W., Xu, W., Junejo, S.A., Feng, Y., Gao, T., Huang, Q., Jiang, Y., Zhang, B., Jia, X. i Huang, Q. (2024) 'Analytical methods for starch retrogradation assessment', *Food Biomacromolecules*, 1(2), str. 107–126. doi: 10.1002/fob2.12016

Chu, S., Hasjim, J., Hickey, L.T., Fox, G. and Gilbert, R.G. (2014), Structural Changes of Starch Molecules in Barley Grains During Germination. *Cereal Chemistry*, 91: 431-437. doi: 10.1094/CCHEM-09-13-0174-R

Compart, J., Singh, A., Fettke, J. i Apriyanto, A. (2023) 'Customizing Starch Properties: A Review of Starch Modifications and Their Applications', *Polymers*, 15(16), 3491. doi: 10.3390/polym15163491

Cooke, D. i Gidley, M.J. (1992) 'Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition', *Carbohydrate Research*, 227, str. 103–112. doi: 10.1016/0008-6215(92)85063-6

Cozzolino, D., Allder, K., Roumeliotis, S. i Eglinton, J. (2012) 'Feasibility study on the use of multivariate data methods and derivatives to enhance information from barley flour and malt samples analyzed using the Rapid Visco Analyzer', *Journal of Cereal Science*, 56(3), str. 610–614. doi: 10.1016/j.jcs.2012.07.004

Daneri-Castro, S.N., Svensson, B. i Roberts, T.H. (2016). Barley germination: Spatio-temporal considerations for designing and interpreting 'omics' experiments. *Journal of Cereal Science*, 70, str. 29–37. doi: 10.1016/j.jcs.2016.05.012

Day, L. (2004) *'Lipid Chemistry'*, U Wrigley, C., Corke, H. i Walker, C. (ur.) Encyclopedia of Grain Science. San Diego: Academic Press, str. 157–165. doi: 10.1016/B0-12-765490-9/00082-3

De Leyn, I. (2014) '*Bakery Products Science and Technology*, 2nd Edition', Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9781118792001

De Schepper, C.F. and Courtin, C.M. (2024) 'Reassessing the importance of barley starch and amylolytic enzyme properties in malting and brewing', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(6), e70069. doi: 10.1111/1541-4337.70069

de Sousa, T., Ribeiro, M., Sabença, C., i Igrejas, G. (2021) 'The 10,000-Year Success Story of Wheat!', *Foods*, 10(9), 2124. doi: 10.3390/foods10092124

Delwiche, S.R., Rausch, S.R. i Vinyard, B.T. (2020) 'Evaluation of a Standard Reference Material for Falling Number Measurement', *Cereal Chemistry*, 97(2), str. 441–448. doi: 10.1002/cche.10259

Diaz-Mendoza, M., Diaz, I., i Martinez, M. (2019) 'Insights on the Proteases Involved in Barley and Wheat Grain Germination', *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2087. doi: 10.3390/ijms20092087

Doğan, N.Ö. (2018) 'Bland-Altman Analysis: A Paradigm to Understand Correlation and Agreement', *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 18(4), str. 139–141. doi: 10.1016/j.tjem.2018.09.001

Donovan, J. W. (1979) 'Phase transitions of the starch-water system', *Biopolymers*, 18(2), str. 263–275. doi: 10.1002/bip.1979.360180204

Douliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K. and Marion, D. (2000) 'Mini Review: Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels', *Journal of Cereal Science*, 32(1), str. 1–20. doi: 10.1006/jcrs.2000.0315

Državni zavod za statistiku (2026a) '*Prva procjena važnijih ranih usjeva u 2026*.', Priopćenje br. 1.1.4. Zagreb: Državni zavod za statistiku. Dostupno na: https://podaci.dzs.hr/2026/hr/121469 (Pristupljeno: 7. listopada 2026.)

Državni zavod za statistiku (2026b) '*Prva procjena važnijih kasnih usjeva u 2026*.', Priopćenje br. 1.1.5. Zagreb: Državni zavod za statistiku. Dostupno na: https://podaci.dzs.hr/2026/hr/120997 (Pristupljeno: 7. listopada 2026.)

Dubreil, L., Compoint, J.P. and Marion, D. (1997) 'The interaction of puroindolines with wheat polar lipids determines their foaming properties', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), str. 108–116. doi: 10.1021/jf960402j

Duke, S.H. i Henson, C.A. (2008) 'A Comparison of Barley Malt Quality Measurements and Malt Sugar Concentrations', *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 66(3), str. 151–161.* doi:10.1094/ASBCJ-2008-0612-01

Duke, S.H. i Henson, C.A. (2009) 'A Comparison of Barley Malt Amylolytic Enzyme Activities as Indicators of Malt Sugar Concentrations', *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 67(2), str. 99–111.* doi:10.1094/ASBCJ-2009-0311-01

Evans, D. E., Li, C., i Eglinton, J. K. (2010) *'The properties and genetics of barley malt starch degrading enzymes*', U Zhang, G. i Li, C. (ur.) Genetics and Improvement of Barley Malt Quality. Springer, Berlin, str. 143-189. doi: 10.1007/978-3-642-01279-2_6

Evers, A.D. i Millar, S. (2002) 'Cereal grain structure and development: Some implications for quality', *Journal of Cereal Science*, 36(3), str. 261–284. doi: 10.1006/jcrs.2002.0435

Evers, A.D., Blakeney, A.B. i O'Brien, L. (1999) 'Cereal structure and composition', *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(5), str. 629–650. doi: 10.1071/AR98158

Faltermaier, A., Waters, D., Becker, T., Arendt, E., i Gastl, M. (2014) 'Common wheat (Triticum aestivum L.) and its use as a brewing cereal - a review', *Journal of the Institute of Brewing*, 120(1), str. 1-15. doi: 10.1002/jib.107

Fardet, A. (2010) 'New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre?', *Nutrition Research Reviews*, 23, str. 65–134. doi: 10.1017/S095442241000004X

Fincher, G.B. i Stone, B.A. (1986) 'Cell walls and their components in cereal grain technology', in Pomeranz, Y. (ed.) *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. 8. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, str. 207–295.

Foligni, R., Glicerina, T.V., Orkusz, A., i Mannozzi, C. (2024) 'Editorial: Cereals and cereal products: nutritional and physicochemical characterization and novel foods', *Frontiers in Nutrition*, 11, 1446657. doi: 10.3389/fnut.2024.1446657

Foo, A.Y., i Rosalki, S. B. (1986) 'Measurement of plasma amylase activity', *Annals of Clinical Biochemistry*, 23 (6), str. 624–637. doi: 10.1177/000456328602300602

Food and Agriculture Organization (FAO) (2026) '*FAO Cereal Supply and Demand Brief*', Rim: FAO. Dostupno na: https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb (Pristupljeno: 7. listopada 2026.)

Fox, G.P. (2010) *'Chemical Composition in Barley Grains and Malt Quality'*, U Zhang, G. i Li, C. (ur.) Genetics and Improvement of Barley Malt Quality. Advanced Topics in Science and Technology in China. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 63–98. doi: 10.1007/978-3-642-01279-2_3

Fox, G., Visser, J., Skov, T., Meijering, I. i Manley, M. (2014) 'Effect of different analysis conditions on Rapid Visco Analyser malt viscograms in relation to malt of varying fermentability', *Journal of the Institute of Brewing, 120(3), str. 183–192.* doi:10.1002/jib.137

Fretzdorff, B. i Weipert, D. (1983) 'Nephelometrische Methode zur Bestimmung derα-Amylase-Aktivität in Getreide'. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 177, str. 167–172. doi: 10.1007/BF01146790

Frølich, W., Åman, P. i Tetens, I. (2013) 'Whole grain foods and health – a Scandinavian perspective', *Food & Nutrition Research*, 57(1), 18503. doi: 10.3402/fnr.v57i0.18503

Gella, F.J., Gubern, G., Vidal, R. i Canalias, F. (1997) 'Determination of total and pancreatic α-amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl-α-D-maltotriosid as substrate', *Clinica Chimica Acta*, 259(1-2). str. 147-60. doi: 10.1016/S0009-8981(96)06481-9

Geng, L., Li, M., Zhang, G., i Ye, L. (2022) 'Barley: a potential cereal for producing healthy and functional foods', *Food Quality and Safety*, 6, str. 1–13. doi: 10.1093/fqsafe/fyac012

Georg-Kraemer, J., Mundstock, E.C. i Cavalli-Molina, S.. (2001). Developmental Expression of Amylases During Barley Malting. *Journal of Cereal Science*. 33. 279-288. doi: 10.1006/jcrs.2001.0367

Glennie Holmes, M.R. (1995) 'Studies of barley and malt with the Rapid Viscoanalyser: (I) The effect of variations in physical and chemical parameters', *Journal of the Institute of Brewing*, 101(1), str. 11–18. doi:10.1002/j.2050-0416.1995.tb00844.x

Gong, Y., Xiao, S., Yao, Z., Deng, H., Chen, X., i Yang, T. (2024) 'Factors and modification techniques enhancing starch gel structure and their applications in foods: A review', *Food Chemistry*: X, 24, 102045. doi: 10.1016/j.fochx.2024.102045

Goode, D.L., Wiltschko, E.A., Ulmer, H.M. i Arendt, E.K. (2005) 'Application of the Rapid Visco Analyser as a rheological tool for the characterisation of mash viscosity as

affected by the level of barley adjunct', *Journal of the Institute of Brewing, 111(2), str. 165–175.* doi:10.1002/j.2050-0416.2005.tb00662.x

Gorzolka, K, Kölling, J., Nattkemper, T.W. i Niehaus, K. (2016) 'Spatio-Temporal Metabolite Profiling of the Barley Germination Process by MALDI MS Imaging', *PLOS ONE* 11(3): e0150208. doi: 10.1371/journal.pone.0150208

Guelpa, A., Bevilacqua, M., Marini, F., O'Kennedy, K., Geladi, P. i Manley, M. (2015) 'Application of Rapid Visco Analyser (RVA) viscograms and chemometrics for maize hardness characterization', *Food Chemistry*, 173, str. 1220–1227. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.149

Guerin, J.R., Lance, R.C.M. i Wallace, W. (1992) 'Release and activation of barley beta-amylase by malt endopeptidases', *Journal of Cereal Science*, 15(1), str. 5–14. doi: 10.1016/S0733-5210(09)80052-0

Gupta, M., Abu-Ghannam, N. i Gallaghar, E. (2010) 'Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), str. 318–328. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x

Guzmán-Ortiz, F. A., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Mora-Escobedo, R., Rojas-León, A., Rodríguez-Marín, M. L., Falfán-Cortés, R. N., i Román-Gutiérrez, A. D. (2019) 'Enzyme activity during germination of different cereals: A review', *Food Reviews International*, 35(3), str. 177-200. doi: 10.1080/87559129.2018.1514623

Hagberg, S. (1960) 'A rapid method for determining alpha-amylase activity', *Cereal Chemistry*, 37, str. 218–222.

He, Y., Lin, Y.L., Chen, C., Tsai, M.H. i Lin, A.H.M. (2019) 'Impacts of Starch and the Interactions Between Starch and Other Macromolecules on Wheat Falling Number', Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(3), str. 641–654. doi:10.1111/1541-4337.12430

Henry, R.J. (1988) 'The carbohydrates of barley grains – A review', *Journal of the Institute of Brewing*, 94, str. 71–78. doi: 10.1002/j.2050-0416.1988.tb04560.x

Hii, S.L., Tan, J.S., Ling, T.C., i Ariff, A.B. (2012) 'Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications', *Enzyme Research*, 2012(1), 921362. doi: 10.1155/2012/921362

Hill, G.A., Macdonald, D.G. i Lang, X. (1997). α-Amylase inhibition by glucose and maltooligosaccharides. *Biotechnology Letters*, 19(11), 1139–1141. doi: 10.1023/a:1018457030575

Hizukuri, S. (1986) 'Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance', *Carbohydrate Research*, 147(2), str. 342–347. doi: 10.1016/S0008-6215(00)90643-8

Hoover, R. (2001) 'Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review', *Carbohydrate Polymers*, 45(3), str. 253–267. doi: 10.1016/S0144-8617(00)00260-5

Horstmann, S.W., Lynch, K.M., i Arendt, E.K. (2017) 'Starch Characteristics Linked to Gluten-Free Products', *Foods*, 6(4), 29. doi: 10.3390/foods6040029

International Association for Cereal Science and Technology (ICC) (1995) *'Determination of the Falling Number According to Hagberg - as a Measure of the Degree of Alpha-Amylase Activity in Grain and Flour (107/1: 1995)*', Vienna: ICC.

International Association for Cereal Science and Technology (ICC) (1998) *Simple and Specific Assay for Alpha-Amylase (Ceralpha-Method) (303: 1998)*', Vienna: ICC.

International Organization for Standardization (ISO) (2015) 'C*ereals and cereal products-Determination of moisture content - Routine Referencemethod (ISO 712:215)'*, Geneva: ISO.

International Organization for Standardization (ISO) (2015) *'Wheat, Rye and Their Flours, Durum Wheat and Durum Wheat Semolina — Determination of the Falling Number According to Hagberg-Perten (ISO 3093:2009)'*, Geneva: ISO.

Jane, J., i Robyt, J. F. (1984) 'Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha-amylases, and a new method for preparing amylodextrins', *Carbohydrate Research*, 132(1), str. 105–118. doi: 10.1016/0008-6215(84)85068-5

Jin, Y.-L, Speers, R., Paulson, A.T. i Stewart, R.J.. (2004) 'Barley β-glucans and their degradation during malting and brewing', *MBAA Technical Quarterly*, 41(3), str. 231-240.

Jones, B.L. (2005) 'Endoproteases of barley and malt', *Journal of Cereal Science*, 42(2), str. 139–156. doi: 10.1016/j.jcs.2005.03.007

Jukić, M., Šumanovac, F., Nakov, G., Šimić, G., Komlenić, D.K., Ivanova, N. i Lukinac, J. (2023) 'Application of the Falling Number Method in the Evaluation of the α-Amylase Activity of Malt Flour', *Applied Sciences, 13(5), 3218.* doi:10.3390/app13053218

Kader, J.C. (1996) 'Lipid transfer proteins in plants', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), str. 627–654. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.627.

Kalb, V., Seewald, T., Hofmann, T., i Granvogl, M. (2020) 'The Role of Endogenous Enzymes during Malting of Barley and Wheat Varieties in the Mitigation of Styrene in Wheat Beer', *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(47), 13888–13896. doi: 10.1021/acs.jafc.0c04837

Karim, A.A., Norziah, M.H. i Seow, C.C. (2000) 'Methods for the study of starch retrogradation', *Food Chemistry*, 71(1), str. 9–36. doi: 10.1016/S0308-8146(00)00130-8

Khalid, A., Hameed, A., i Tahir, M. F. (2023) 'Wheat quality: A review on chemical composition, nutritional attributes, grain anatomy, types, classification, and function of seed storage proteins in bread making quality', *Frontiers in Nutrition*, 10, 1053196. doi: 10.3389/fnut.2023.1053196

Kiszonas A.M., Engle D.A., Pierantoni L.A., Morris C.F. (2018) 'Relationships between Falling Number, α-Amylase Activity, Milling, Cookie, and Sponge Cake Quality of Soft White Wheat', *Cereal Chemistry*, 95(3), str. 373–385. doi: 10.1002/cche.10041

Kumar, R., Mukherjee, S. and Ayele, B.T. (2018) 'Molecular aspects of sucrose transport and its metabolism to starch during seed development in wheat: *A comprehensive review', Biotechnology Advances*, 36(4), str. 954–967. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.02.015

LaBerge, D.E., MacGregor, A.W. and Meredith, W.O.S. (1973) 'Changes in the free sugar content of barley kernels during maturation', *Journal of the Institute of Brewing*, 79(6), str. 471–477. doi: 10.1002/j.2050-0416.1973.tb03568.x

Leloup, V.M., Colonna, P., Ring, S.G., Roberts, K., i Wells, B. (1992) 'Microstructure of amylose gels', *Carbohydrate Polymers*, 18(3), str. 189–197. doi: 10.1016/0144-8617(92)90063-V

Li, W., Corke, H., i Beta, T. (2007). Kinetics of hydrolysis and changes in amylose content during preparation of microcrystalline starch from high-amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers*, 69(2), 398–405. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.022

Li, Y., Zhu, K., Guo, X., Peng, W., i Zhou, H. (2016) 'Interaction of barley beta-D-glucan with wheat starch: Effect on the pasting and rheological properties', *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, str. 70–76. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.085

Lindeboom, N., Chang, P.R., i Tyler, R.T. (2004) 'Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review', *Starch/Stärke*, 56(3-4), str. 89–99. doi: 10.1002/star.200300218

Lukinac, J. i Jukić, M. (2022) 'Barley in the Production of Cereal-Based Products', *Plants*, 11(24), 3519. doi: 10.3390/plants11243519

MacLeod, A.M. and Preece, I.A. (1954) 'Studies on the free sugars of the barley grain. V. Comparison of sugars and fructosans with those of other cereals', *Journal of the Institute of Brewing*, 60(1), str. 46–55. doi: 10.1002/j.2050-0416.1954.tb02747.x

Mäkinen, O.E. i Arendt, E.K. (2015) 'Nonbrewing applications of malted cereals, pseudocereals, and legumes: A review', *Journal of the American Society of Brewing Chemists, 73(3), str. 223–227.* doi:10.1094/ASBCJ-2015-0515-01

Mangan, D., Szafranska, A., McKie, V. i McCleary, B.V. (2016) 'Investigation into the use of the Amylase SD assay of milled wheat extracts as a predictor of baked bread quality', *Journal of Cereal Science*, 70, str. 240–246. doi: 10.1016/j.jcs.2016.06.015

Mares, D.J. i Mrva, K. (2014) 'Wheat Grain Preharvest Sprouting and Late Maturity Alpha-Amylase', *Planta, 240(6), str. 1167–1178.* doi:10.1007/s00425-014-2172-5

Marion, D., Dubreil, L. and Douliez, J.-P. (2003) 'Functionality of lipids and lipid-protein interactions in cereal-derived food products', *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 10(1), str. 47–56. doi: 10.1051/ocl.2003.0047

Mariotti, M., Zardi, M., Lucisano, M. i Pagani, M.A. (2005) 'Influence of the heating rate on the pasting properties of various flours', *Starch-Stärke, 57(11), str. 564–572.* doi:10.1002/star.200500425

Mariscal-Moreno, R.M., Figueroa-Cárdenas, J.d.D., Santiago-Ramos, D. i Rayas-Duarte, P. (2019) 'Amylose lipid complexes formation as an alternative to reduce amylopectin retrogradation and staling of stored tortillas', *International Journal of Food Science & Technology*, 54, str. 1651-1657. doi: 10.1111/ijfs.14040

Martínez, M., Cambra, I., Carrillo, L., Diaz-Mendoza, M. i Diaz, I. (2009) 'Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination', *Plant Physiology*, 151(3), str. 1531–1545. doi: 10.1104/str.109.146019

Matignon, A., i Tecante, A. (2017) 'Starch retrogradation: From starch components to cereal products', *Food Hydrocolloids*, 68, str. 43–52. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.10.032

McCleary, B.V. and Sheehan, H. (1987) 'Measurement of cereal α-amylase: a new assay procedure', *Journal of Cereal Science*, 6(3), str. 237–251. doi: 10.1016/S0733-5210(87)80061-9

McCleary, B.V., McNally, M., Monaghan, D. i Mugford, D.C. (2002) 'Measurement of α-Amylase Activity in White Wheat Flour, Milled Malt, and Microbial Enzyme Preparations, Using the Ceralpha Assay: Collaborative Study', *Journal of AOAC International, 85(5), str. 1096–1102.* doi:10.1093/jaoac/85.5.1096

McKevith, B. (2004) 'Nutritional aspects of cereals', *Nutrition Bulletin*, 29(2), str. 111–142. doi: 10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x

Meredith, P. (1970) '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(4), str. 483-491.*

Miller, G.L. (1959) 'Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar', *Analytical Chemistry,* 31(3), str. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030

Morrison, W.R. (1988) 'Lipids in cereal starches: A review', *Journal of Cereal Science*, 8(1), str. 1–15. doi: 10.1016/S0733-5210(88)80044-4

Muralikrishna, G. i Nirmala, M. (2005) 'Cereal α-amylases—an overview'. Carbohydrate *Polymers*, 60(2), str. 163-173. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.12.002

Nemes, S.A., Călinoiu, L.F., Dulf, F.V., Fărcas, A.C., i Vodnar, D.C. (2022) 'Integrated Technology for Cereal Bran Valorization: Perspectives for a Sustainable Industrial Approach'. *Antioxidants (Basel, Switzerland),* 11(11), 2159. doi: 10.3390/antiox11112159

Newberry, M., Zwart, A.B., Whan, A., Mieog, J.C., Sun, M., Leyne, E., Pritchard, J., Daneri-Castro, S.N., Ibrahim, K., Diepeveen, D., Howitt, C.A., i Ral, J.F. (2018) 'Does Late Maturity Alpha-Amylase Impact Wheat Baking Quality?', *Frontiers in Plant Science*, 9, 1356. doi: 10.3389/fpls.2018.01356

Newman, R.K. and Newman, C.W.. (2008) '*Barley for food and health: Science, technology, and products*. Hoboken', NJ: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9780470369333

Olkku, J., Kotaviita, E., Salmenkallio-Marttila, M., Sweins, H., i Home, S. (2005) 'Connection between Structure and Quality of Barley Husk', *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63(1), 17–22. doi: 10.1094/ASBCJ-63-0017

Panahi, B., Hamid, R., Ghorbanzadeh, Z., Golkari, S., Yildirim, M. i Jacob, F. (2026) 'Transcriptional networks shaping malting quality in barley: From grain development to brewing performance', *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 12, 100348. doi: 10.1016/j.fochms.2025.100348

Perten, H. (1964) 'Application of the Falling Number Method for Evaluating Alpha-Amylase Activity', *Cereal Chemistry, 41(3), str. 127–140.*

Rahman, S., Khoddami, A., Copeland, L., Atwell, B.J. and Roberts, T.H. (2021) 'Optimal silver nitrate concentration to inhibit α-amylase activity during pasting of rice flour', *Starch-Stärke*, 73(1-2), 2000150. doi: 10.1002/star.202000150

Rakha, A., Saulnier, L., Åman, P., i Andersson, R. (2012) 'Enzymatic fingerprinting of arabinoxylan and β-glucan in triticale, barley and tritordeum grains', Carbohydrate Polymers, 90(3), 1226–1234. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.06.054

Ral, J.P., Whan, A., Larroque, O., Leyne, E., Pritchard, J., Dielen, A.S., Howitt, C.A., Morell, M.K. i Newberry, M. (2016) 'Engineering High α-Amylase Levels in Wheat Grain Lowers Falling Number but Improves Baking Properties', *Plant Biotechnology Journal, 14(1), str. 364–376.* doi:10.1111/pbi.12390

Raschke, A.M., Taylor, J. i Taylor, J.R.N. (1995) 'Use of Falling Number and Rapid Visco Analyser Instruments to Estimate Sorghum Malt Diastatic Power', *Journal of Cereal Science, 21(1), str. 97–102.* doi:10.1016/S0733-5210(95)80013-1

Ring, S.G., Colonna, P., I'Anson, K.J., Kalichevsky, M.T., Miles, M.J., Morris, V.J. i Orford, P. D. (1987) 'The gelation and crystallisation of amylopectin', *Carbohydrate Research*, 162(2), str. 277–293. doi: 10.1016/0008-6215(87)80223-9

Rittenauer, M., Gastl, M. i Becker, T. (2017) 'Optimized analytical parameters for the viscometric determination of pasting temperatures of barley malt', *Food Hydrocolloids*, 62, str. 149–157. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.07.033

Saburi, W. i Mori, H. (2024) 'Comparisons of the amylolytic enzymes and malt starch hydrolysates of two barley cultivars, Hokudai 1 (the first cultivar developed in Japan) and Kitanohoshi (currently used cultivar for beer production)', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 88(10), str. 1180-1187. doi: 10.1093/bbb/zbae096

Sahlström, S., Park, W. and Shelton, D.R. (2004) 'Factors influencing yeast fermentation and the effect of LMW sugars and yeast fermentation on hearth bread quality', *Cereal Chemistry*, 81(3), str. 328–335. doi: 10.1094/CCHEM.2004.81.3.328

Satrapai, S., i Suphantharika, M. (2007) 'Influence of spent brewer's yeast beta-glucan on gelatinization and retrogradation of rice starch', *Carbohydrate Polymers*, 67(4), str. 500–510. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.06.028

Saulnier, L., Sado, P.-E., Branlard, G., Charmet, G., i Guillon, F. (2007) 'Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties', *Journal of Cereal Science*, 46(3), str. 261-281. doi: 10.1016/j.jcs.2007.06.014

Shao, Y., Tsai, M.-H., He, Y., Chen, J., Wilson, C. i Lin, A.H.-M. (2019) 'Reduction of Falling Number in Soft White Spring Wheat Caused by an Increased Proportion of Spherical B-Type Starch Granules', *Food Chemistry, 284, str. 140–148.* doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.006

Shewry, P.R. i Hey, S.J. (2015) 'The contribution of wheat to human diet and health', *Food and Energy Security*, 4(3), str. 178–202. doi: 10.1002/fes3.64

Shewry, P.R. i Tatham, A.S. (1990) 'The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution', *Biochemical Journal*, 267(1), str. 1–12. doi: 10.1042/bj2670001

Shewry, P.R., Tatham, A.S. i Halford, N.G. (2002) 'Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization', *Journal of Experimental Botany*, 53(370), str. 947–958. doi: 10.1093/jxb/53.370.947

Somogyi, M.J. (1952) 'Notes on sugar determination', *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), str. 19–23.

Stanley, D., Rejzek, M., Naested, H., Smedley, M., Otero, S., Fahy, B., Thorpe, F., Nash, R. J., Harwood, W., Svensson, B., Denyer, K., Field, R. A., i Smith, A. M. (2011). The role of alpha-glucosidase in germinating barley grains. *Plant physiology*, 155(2), 932–943. doi: 10.1104/str.110.168328

Stone, B.A. (2006) 'Cell Walls of Cereal Grains', *Cereal Foods World*, 51(2), str. 62-65. doi: 10.1094/CFW-51-0062

Sung, H. G., Shin, H. T., Ha, J. K., Lai, H. L., Cheng, K. J. i Lee, J. H. (2005) 'Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley', *Bioresource Technology*, 96(11), str. 1297–1303. doi: 10.1016/j.biortech.2004.10.010

Szewińska, J., Simińska, J. i Bielawski, W. (2016) 'The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds', *Journal of Plant Physiology*, 207, str. 10–21. doi: 10.1016/j.jplph.2016.09.008

Taketa, S., Amano, S., Tsujino, Y., Sato, T., Saisho, D., Kakeda, K., Nomura, M., Suzuki, T., Matsumoto, T., Sato, K., Kanamori, H., Kawasaki, S. i Takeda, K. (2008) 'Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), str. 4062–4067. doi: 10.1073/pnas.0711034105

Taketa, S., Yuo, T., Tonooka, T., Tanno, K.N., Ichii, M. i Sato, K. (2009) 'Fine Mapping of Short Rachilla Hair Gene (srh) in Barley and an Association Study using Flanking Molecular Markers and World Germplasms', *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(6), str. 400-408. doi: 10.3923/ajps.2009.400.408

Tanner, J.G., Colgrave, L.M., Blundell, J.M., Howitt, A.C. i Bacic, A. (2019) 'Hordein Accumulation in Developing Barley Grains', *Frontiers in Plant Science*, 10, 649. doi: 10.3389/fpls.2019.00649

Tester, R.F., Karkalas, J. i Qi, X. (2004a) 'Starch - composition, fine structure and architecture', *Journal of Cereal Science*, 39(2), str. 151–165. doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001

Tester, R.F., Karkalas, J. i Qi, X. (2004b) 'Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship', *World's Poultry Science Journal*, 60(2), str. 186–195. doi: 10.1079/WPS200312

Thomas, D. i Atwell, W. (1999) *'Starches'*, Eagan Press Handbook Series. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.

Tosi, P., He, J., Lovegrove, A., Gonzáles-Thuillier, I., Penson, S. i Shewry, P.R. (2018) 'Gradients in compositions in the starchy endosperm of wheat have implications for milling and processing', *Trends in Food Science & Technology*. 82. str. 1–7. doi: 10.1016/j.tifs.2018.09.027

Ulbrich, M., Scholz, F., Braun, B., Bussert, R. i Flöter, E. (2023) 'High amylose corn starch gels - Investigation of the supermolecular structure', *Starch/Stärke*, 75(1–2), 2200138. doi: 10.1002/star.202200138

Ullrich, S.E. (2011) 'Significance, adaptation, production, and trade of barley', u Ullrich, S.E. (ur.) *Barley: Production, Improvement, and Uses*. West Sussex: Blackwell Publishing Ltd., str. 3–13. doi: 10.1002/9780470958636.ch1

van Stralen, K.J., Jager, K.J., Zoccali, C., i Dekker, F.W. (2008) 'Agreement between methods', *Kidney international*, 74(9), 1116–1120. doi: 10.1038/ki.2008.306

Verity, J.C.K., Hac, L., i Skerritt, J. H. (1999) 'Development of a Field Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of α-Amylase in Preharvest-Sprouted Wheat', *Cereal Chemistry*, 76(5), 673–681. doi: 10.1094/CCHEM.1999.76.5.673

Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., Meraz, M. i Garcia-Diaz, S. (2019) 'Gaining insights into α-amylase inhibition by glucose through mathematical modeling and analysis of the hydrolysis kinetics of gelatinized corn starch dispersions', *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 766–771. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.226

Verspreet, J., Dornez, E., Van den Ende, W., Delcour, J.A. and Courtin, C.M. (2015) 'Cereal grain fructans: Structure, variability and potential health effects', *Trends in Food Science & Technology*, 43(1), str. 32–42. doi: 10.1016/j.tifs.2015.01.006

Vinje, M.A., Duke, S.H. i Henson, C.A. (2015) ‘Comparison of Factors Involved in Starch Degradation in Barley Germination under Laboratory and Malting Conditions1,2’, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(2), str. 195–205. doi: 10.1094/ASBCJ-2015-0318-01

Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B.C., Liyanage, R. i Sivakanesan, R. (2020) 'Critical review on conventional spectroscopic α-amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects', *Journal of the science of food and agriculture*, 100(7), str. 2836–2847. doi: 10.1002/jsfa.10315

Vriesekoop, F., Rathband, A., MacKinlay, J. i Bryce, J. (2012) 'The Evolution of Dextrins During the Mashing and Fermentation of All-malt Whisky Production', *Journal of the Institute of Brewing*, 116, str. 230-238. doi: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00425.x

Waigh, T.A., Gidley, M.J., Komanshek, B.U. i Donald, A.M. (2000) ‘The phase transformations in starch during gelatinisation: a liquid crystalline approach’, *Carbohydrate research*, 328(2), str. 165–176. doi: 10.1016/S0008-6215(00)00098-7

Wainwright, T. and Buckee, G.K. (1977) 'Barley and malt analysis — a review', *Journal of the Institute of Brewing*, 83(6), str. 325–347. doi: 10.1002/j.2050-0416.1977.tb03822.x

Walsh, S.K., Lucey, A., Walter, J., Zannini, E. i Arendt, E.K. (2022) 'Resistant starch—An accessible fiber ingredient acceptable to the Western palate', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21, 2930–2955. doi: 10.1111/1541-4337.12955

Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q. i Wang, S. (2015) 'Starch retrogradation: A comprehensive review', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), str. 568–585. doi: 10.1111/1541-4337.12143

Whitlow, K.J., Gochman, N., Forrester, R.L. i Wataji, L.J. (1979), 'Maltotetraose as a substrate for enzyme-coupled assay of amylase activity in serum and urine', *Clinical Chemistry*, 25(3), str. 481–483. doi: 10.1093/clinchem/25.3.481

Wieser, H., Koehler, P. i Scherf, K.A. (2023) 'Chemistry of wheat gluten proteins: Qualitative composition', *Cereal Chemistry*, 100(1), str. 23–35. doi: 10.1002/cche.10572

Wieser, H., Koehler, P. and Scherf, K.A. (2020) ‘The Two Faces of Wheat’, *Frontiers in Nutrition*, 7, 517313. doi: 10.3389/fnut.2020.517313

Yoshida, T. i Yamada, K. (1970) 'Assessment of malt quality with a Brabender-viscograph', *Journal of the Institute of Brewing*, 76(5), str. 455–464. doi: 10.1002/j.2050-0416.1970.tb03328.x

You, S. and Izydorczyk, M.S. (2007) 'Comparison of the physicochemical properties of barley starches after partial α-amylolysis and acid/alcohol hydrolysis', *Carbohydrate Polymers*, 69(3), str.489-502. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.01.002

Yu, N., Laurenz, R., Siler, L., Ng, P. K. W., Souza, E. i Lewis, J. M. (2015) 'Evaluation of α-Amylase Activity and Falling Number around Maturity for Soft White and Soft Red Wheat Varieties in Michigan', *Cereal Research Communications, 43(4), str. 672–681.* doi:10.1556/0806.43.2015.026

Zhang, N. i Jones, B.L. (1995) 'Development of proteolytic activities during barley malting and their localization in the green malt kernel', *Journal of Cereal Science*, 22(2), str. 147–155. doi: 10.1016/0733-5210(95)90044-6

Zhou, M.X. i Mendham, N.J. (2005) 'Predicting barley malt extract with a Rapid Viscoanalyser', *Journal of Cereal Science, 41(1), str. 31–36.* doi:10.1016/j.jcs.2004.04.003

Zhu, F. (2017) 'Barley starch: Composition, structure, properties, and modifications', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), str. 558–579. doi: 10.1111/1541-4337.12265

Zohary, D. i Hopf, M. (1988) *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*. Oxford: Clarendon Press.