

GIMNAZIJA PTUJ

Uravnavanje aktivnosti encimov v moki

Kemija

Raziskovalna naloga

Avtorici: Alja Rozman in Mateja Golc

Mentor na šoli: doc. dr. Boris Zmazek

Mentorici na FKKT UM: prof. dr. Maja Leitgeb in dr. Gordana Hojnik Podrepšek

Ptuj, 2020

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujema mentorju na gimnaziji, doc. dr. Borisu Zmazku, za vso pomoč pri vodenju dela, pregledu literature, razlagi snovi, izvajanju eksperimentov v laboratoriju Gimnazije Ptuj ter pisanju naloge.

Zahvala gre tudi mentoricama na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru prof. dr. Maji Leitgeb in dr. Gordani Hojnik Podrepšek za pomoč pri izbiri metod dela, laboratorijske opreme in kemikalij ter za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela v laboratorijih Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo v Mariboru, razlagi dobljenih rezultatov in pisanju naloge.

Za pomoč in nasvete pri izvajanju eksperimentov ter pripravi raztopin v laboratoriju Gimnazije Ptuj se zahvaljujema laborantki Mojci Čeh.

Kazalo vsebine

POVZETEK	7
1 UVOD	8
1.1 Namen naloge	8
1.2 Raziskovalno vprašanje	8
1.3 Hipoteza in razlaga hipoteze	9
1.4 Metode dela	9
2 TEORETIČNE OSNOVE	10
2.1 Moka.....	10
2.2 Encimi	12
2.3 Superkritični fluidi	15
2.4 Vitamin C	17
3 EKSPERIMENTALNO DELO	18
3.1 Kemikalije	18
3.2 Laboratorijska oprema in aparature	19
3.3 Ekstrakcija proteinov iz moke	20
3.4 Določevanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi	21
3.5 Določevanje vpliva SC CO ₂ na aktivnost encimov	22
3.6 Določevanje deleža vitamina C	23
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	25
4.1 Določevanje koncentracije proteinov v moki.....	25
4.2 Določevanje vpliva SC CO ₂ na aktivnost encimov	26
4.3 Določevanje deleža vitamina C	29
5 ZAKLJUČEK	33
6 LITERATURA	34
6.1 Monografije.....	34
6.2 Članki	34
6.3 Internetni viri.....	35

Kazalo slik

Slika 1: Povezovanje D-glukopiranoznih enot v strukturi amilopektina.	11
Slika 2: Povezovanje D-glukopiranoznih enot v strukturi amiloze.	11
Slika 3: Encimska reakcija rjavenja. Polifenol oksidaze (PPO) katalizirajo hidroksilacijo fenolnih spojin (A) v benzendiolne spojine (B) in te naprej v kinone (C). Kinoni lahko reagirajo med seboj ali z aminokislinami v kompleksne spojine, ki so rjave barve.	14
Slika 4: Fazni diagram za ogljikov dioksid.	16
Slika 5: Visokotlačni šaržni reaktor.	20
Slika 6: Centrifuga.	21
Slika 7: UV-VIS spektrofotometer.	22
Slika 8: Reakcijska shema, ki prikazuje oksidacijo L-askorbinske kisline z jodom.	24
Slika 9: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracij proteinov po Bradfordu.	25
Slika 10: Masne koncentracije proteinov v mg mL ⁻¹ , ekstrahiranih iz različnih vrst moke, ki so bile izpostavljene različnim pogojem.	26
Slika 11: Masne koncentracije encimov v PBM izpostavljeni različnim pogojem.	27
Slika 12: Specifična aktivnost encima v moki po izpostavitvi v SC CO ₂ U mg ⁻¹	28
Slika 13: Preostala aktivnost encima v moki po izpostavitvi SC CO ₂ v %.	29
Slika 14: Masni delež vitamina C v odstotkih za različne vrste moke.	30
Slika 15: Delež vitamina C v moki po izpostavitvi SC CO ₂ v %.	31
Slika 16: Masni delež vitamina C v vzorcu PBM glede na čas pred titracijo. S črtkano črto je prikazan trend zniževanja deleža vitamina C v odvisnosti od časa.	32

Kazalo preglednic

Preglednica 1. Pregled nad vrstami moke in pogoji 1, 2 in 3, ki sva jih uporabili pri ekstrakciji proteinov.	20
Preglednica 2. Absorbance in masne koncentracije proteinov v mg mL ⁻¹ , ki sva jih ekstrahirali iz različnih vrst moke in po različnih metodah.	25
Preglednica 3. Absorbance (A) in masne koncentracije proteinov γ v mg mL ⁻¹ , ki sva jih ekstrahirali iz PBM z uporabo kroglic, potem ko sva belo moko izpostavili SC CO ₂ pri različnih pogojih.	26
Preglednica 4: Izmerjene absorbance pri aktivnostnem testu pri 0 in 5 minutah ter razlika absorbanc med 5 in 0 minutami za vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (časa in tlaka) v primerjavi z vzorcem, ki ni bil izpostavljen.	27
Preglednica 5: Specifična aktivnost encima (A) v U mg ⁻¹ in preostala aktivnost encima v moki po izpostavitvi SC CO ₂ (A _p) v odstotkih.	28

Preglednica 6: Masa moke v g, poraba jodovice pri titraciji v mL in izračunan masni delež vitamina C v različnih vrstah moke pred izpostavitvijo SC CO ₂	29
Preglednica 7: Masa moke v g, poraba jodovice pri titraciji v mL in izračunan masni delež vitamina C v PBM po izpostavitvi SC CO ₂	30
Preglednica 8: Masa moke v g, poraba jodovice pri titraciji v mL in izračunan masni delež vitamina C v PBM glede na čas pred titracijo v %.	31

Kazalo enačb

Enačba 1	22
Enačba 2	23
Enačba 3	23
Enačba 4	24

Pregled okrajšav in simbolov

A - specifična aktivnost encima

*A*_{265 nm} - absorbanca vzorca izmerjena pri 265 nm

*A*_{595 nm} - absorbanca vzorca izmerjena pri 595 nm

A_P - preostala aktivnost

c - množinska koncentracija

γ - masna koncentracija

k - naklon umeritvene krivulje (v našem primeru 0,5655)

*M*_{AK} - molska masa askorbinske kisline

m - masa

P - tlak

PPO - polifenol oksidaza

SC CO₂ - superkritični ogljikov dioksid

SCF - superkritični fluidi

t - čas

V - prostornina

*w*_{AK} - masni delež askorbinske kisline

POVZETEK

Pšenična moka je zelo priljubljeno živilo po vsem svetu. Cilj te raziskave je bil raziskati učinek superkritičnega ogljikovega dioksida (SC CO₂) na specifično aktivnost encima polifenol oksidaze. Polifenol oksidaza je vpletena v pojav rjavenja moke, ki se pojavi po daljšem času skladiščenja. Odločili sva se, da s posebnim postopkom inaktivirava encim polifenol oksidazo in tako preprečiva neželjeno reakcijo rjavenja. Bela pšenična moka je bila obdelana z uporabo SC CO₂ pri različnih pogojih izpostavitve v visokotlačnem reaktorju. Za obdelavo je bil uporabljen SC CO₂ pri različnih tlakih (200 in 300 bar), pri konstantni temperaturi 35 °C in različnih časih izpostavitve (3 ure in 24 ur). Iz rezultatov je razvidno, da ima SC CO₂ vpliv na aktivnost encima polifenol oksidaze, saj pri določenih pogojih dosežemo njegovo inaktivacijo.

Prav tako sva tekom eksperimentalnega dela določili delež vitamina C v različnih vrstah moke in ugotovili, da je delež vitamina C odvisen od vrste moke. Delež vitamina C sva določili tudi v moki, obdelani s SC CO₂, in ugotovili, da vsebnost vitamina C upada s podaljševanjem časa izpostavitve in višjem tlaku.

Ključne besede: Moka, encimi, polifenol oksidaza, superkritični ogljikov dioksid, vitamin C.

ABSTRACT

Wheat flour is a very popular food worldwide. The aim of this study was to investigate the effect of supercritical carbon dioxide (SC CO₂) on the specific activity of the enzyme polyphenol oxidase. Polyphenol oxidase is involved in the process of browning that causes reactions at the storage time of flour. We decided to inactivate the enzyme polyphenol oxidase by a special procedure to prevent the unwanted browning reaction. White wheat flour was treated by using SC CO₂ under various exposure conditions in a high-pressure reactor. The treatment of white wheat flour was performed by SC CO₂ under different pressures (200 and 300 bar), at a constant temperature of 35°C and with different exposure times (3 hours and 24 hours). The results show that SC CO₂ influences on the activity of the enzyme polyphenol oxidase, since under certain conditions the enzyme inactivation is achieved.

During the experimental work the proportions of vitamin C in different types of flour were determined and it was found out that the proportion of vitamin C depends on the type of flour. The Vitamin C content was also determined in SC CO₂-treated flour and it was discovered that the vitamin C content decreases as exposure time and pressure increase.

Key words: Flour, enzymes, polyphenol oxidase, supercritical carbon dioxide, vitamin C.

1 UVOD

Žito in kruh sta imela v človekovi prehrani že od nekdaj pomembno vlogo. Pšenična moka, kot glavna sestavina kruha, je ena od najpomembnejših živil v zahodni kulturi. Moko dandanes vsebuje skoraj vsak obrok, ki ga zaužijemo. V svetu vsako leto pridelamo nad 0,6 milijarde ton pšenice. Ocenjeno je, da evropski prebivalci dobimo približno polovico ogljikovih hidratov in približno tretjino beljakovin iz kruha (Prša, 2019).

Že 4000 let pred našim štetjem so v dolini Nila sejali ječmen in pšenico, daljna predhodnika današnjega žita. Egipčani so približno 2600 let pred našim štetjem prvi spekli kruh, ki je takrat pomenil bogastvo družine in dežele. Rimljani so že poznali pekarsko obrt ter pomen kruha za prehrano in zdravje. V izkopaninah Pompejev so našli javne pekarnice, kjer so kruh pekli s pomočjo toplega zraka. Za mletje žita so uporabljali mlinske kamne. Kruh so razvrščali po vrstah, oblikah in dodatkih. Posipali so ga s semeni maka, mandlji, poprom, lovorjem, kumino in nekaterimi drugimi zelišči. V kruh so dodajali rozine, peteršilj in koper ter ga oblikovali v značilne hlebce, zavite prstane ali kite. Vedeli so, da polnovredna moka ni obstojna, zato so Rimljani svojim vojščakom odmerjali žito, ne pa moke. Moko so mleli sproti in kruh pekli na vročih kamnih (Tašner in Komerički, 2007; Flour, 2020).

Ob primerni vlažnosti žita (pod 12 %) je ob pravilnem skladiščenju mogoče žito ohraniti dlje časa. Poleg vlage so pomembni tudi temperatura prostora, prisotnost kisika in mikroorganizmi v žitu. Ti v zrnju povzročijo odvijanje biokemijskih procesov, katerih posledice so spremembe na beljakovinskem, ogljikohidratnem in lipidnem kompleksu. Povzročajo padec kakovosti zrnja, ki pa lahko privede do nadaljnje neuporabnosti (Tašner in Komerički, 2007).

Moka, ki jo pridobivamo z mletjem žita, pa ima kljub optimalnim pogojem skladiščenja krajši rok uporabnosti. Razlog so maščobne kisline kalčka, ki reagirajo od trenutka, ko so izpostavljene kisiku. Do tega pride pri mletju zrnja. Maščobne kisline se tako oksidirajo in moka se začne spreminjati. Ta postopek traja od šest do devet mesecev, odvisno od podnebja in kakovosti zrn. Danes vemo, da je aktivnost nekaterih encimov eden glavnih problemov pri skladiščenju moke. Encima, ki najbolj vplivata na kvaliteto moke sta lipaza in peroksidaza (Prša, 2019).

1.1 Namen naloge

Namen najine naloge je bil s čim manjšim poseganjem v sestavo moke zmanjšati aktivnost encimov. Preučili sva učinek izpostavljanja moke superkritičnemu ogljikovemu dioksidu ($SC\ CO_2$) na aktivnost encimov v moki. Pri svojem delu sva se osredotočili na encim polifenol oksidazo. Primerjali sva aktivnost encimov v neobdelani moki s tisto, ki sva jo izpostavili $SC\ CO_2$. Rezultate sva primerjali z dosedanjimi raziskavami inaktivacije encima α -amilaze v moki, obdelani s $SC\ CO_2$. Tekom eksperimentalnega dela sva določili tudi delež vitamina C v različnih vrstah moke, ter preučili ali $SC\ CO_2$ vpliva tudi na vsebnost vitamina C v vzorcu moke.

1.2 Raziskovalno vprašanje

Vprašanje, ki sva si ga zastavili na začetku naloge je, kako oz. na kakšen način bi lahko s čim manjšim poseganjem v sestavo moke inaktivirali encim in s tem moki podaljšali rok uporabnosti. Zanimalo naju je tudi, kakšna je vsebnost vitamina C v mokah pred in po izpostavitvi $SC\ CO_2$.

1.3 Hipoteza in razlaga hipoteze

Superkritični CO₂ vpliva na aktivnost encima polifenol oksidaze v moki.

Superkritični CO₂ vpliva na delež vitamina C v moki.

Po pregledu literature in dosedanjih raziskav na tem področju sva se odločili, da bova skušali inaktivirati encim polifenol oksidazo. Polifenol oksidaza je glavni vzrok za zmanjšanje kakovosti živil (Iqbal idr., 2019; Kahn, 1975). Da bi dosegli inaktivacijo encima polifenol oksidaze, bova moko izpostavili SC CO₂, saj se ob prisotnosti vode ali vodnega pufra v SC CO₂ aktivnost nekaterih encimov zmanjša (Gselman, 2012).

Meniva, da SC CO₂ vpliva tudi na delež vitamina C v moki, saj sva v literaturi (Agar, Streif in Banger, 1997) zasledili, da zvišanje koncentracije CO₂ lahko pri nekaterih primerih vodi do znižanja deleža vitamina C.

1.4 Metode dela

- Ekstrakcija encimov iz moke.
- Določevanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi.
- Izpostavitve moke superkritičnemu CO₂.
- Določevanje aktivnosti encima.
- Jodometrično določevanje vitamina C.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Moka

Moka je izdelek, ki ga pridobivamo z mletjem očiščenih zrn žita. Zrno žita je sestavljeno iz semenske lupine, ki je iz vlaknin. Pod lupino je alevronska plast, v njej pa so vodotopne beljakovine, rudnine in vlaknine. V jedru zrna so škrob, netopne beljakovine in kalček, ki vsebuje nenasičene maščobne kisline, vodotopne beljakovine, vitamine in rudnine. Moko uporabljamo pri peki in kuhanju. Ključnega pomena je njena kakovost, ki je odvisna od organoleptičnih, kemijskih in fizikalnih lastnosti (Šešek, 1975).

Organoleptične lastnosti so barva, vonj in okus, ki so pogojeni s tipom moke. Poznamo več tipov moke. Številka tipa določa vsebnost mineralov v mg na 100 g moke. Polnozrnata moka ima največ vlaknin in mineralov. Tip določamo pri pšeničnih in rženih mokah. Tipi pšenične moke so: bela (tip 400 in 500), polbela (tip 700 in 850) in črna moka (tip 1100 in 1600). Tipi ržene moke so: ržena bela (tip 750), ržena polbela (tip 950) in ržena črna moka (tip 1250) (Šešek, 1975).

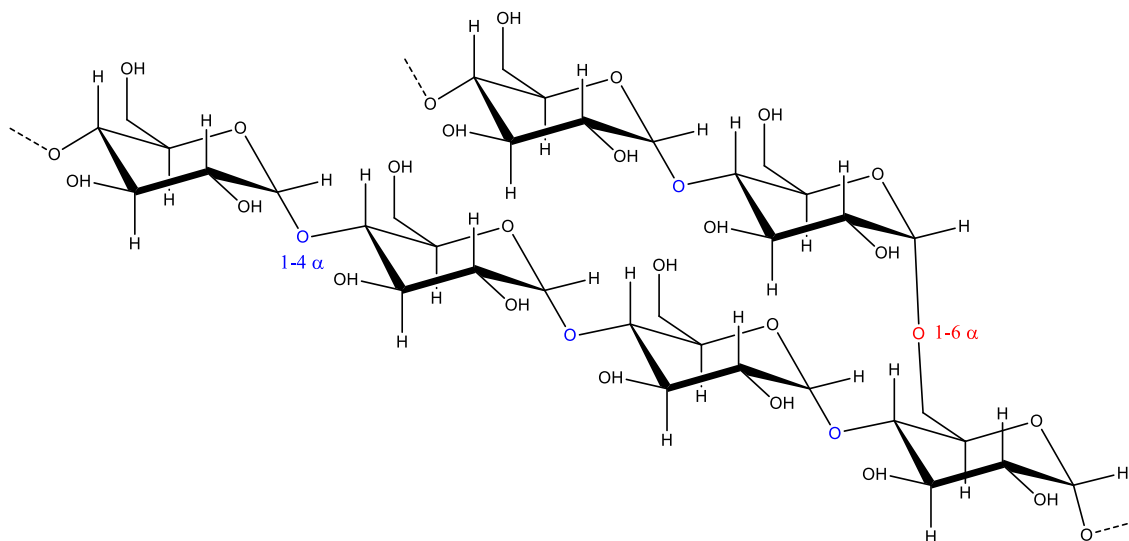
Mineralne snovi v zrnu niso enakomerno razporejene. V zunanjih plasteh zrna in v kalčku se nahaja največji del pepela. Količina pepela narašča iz notranjosti proti zunanosti. Pepel predstavljajo oksidi mineralov kalija, natrija, kalcija, magnezija in fosforja. V pepelu najdemo tudi mikroelemente mangan, cink, baker, železo, kobalt, jod in selen. Temnejši tipi mok, ki vsebujejo večji delež zunanjšega sloja zrna, imajo zato večji del pepela (Tašner in Komerički, 2007).

Moki lahko določimo tudi kislinsko stopnjo, ki je odvisna od količine prisotnih maščobnih kislin, kisljih fosfatov – soli fosforne kisline, aminokislin in organskih kislin (Tašner in Komerički, 2007).

2.1.1 Sestava moke

Moka mora imeti dobro sposobnost vezanja vode ter nastajanja in zadrževanja plinov. Sposobnost vezanja vode je odvisna od lepka in granulacije (velikosti delcev). Lepek je lepljiva beljakovina, ki nastane ob prepletanju v vodi netopnih beljakovin – gliadina in glutenina. Večja kot je vsebnost lepka v moki, večje je vpijanje vode. Lepek vpliva tudi na sposobnost zadrževanja plinov. Velikost delcev (granulacija) je odvisna od načina mletja moke. Bolj fino je mleta, večje je vpijanje vode, vendar preveč drobni delci niso primerni za nadaljnjo uporabo in imajo slabšo sposobnost zadrževanja plinov. Sposobnost nastajanja plinov je odvisna od prisotnosti sladkorja v moki, poškodovanosti škrobnih zrn in količine encimov (Tašner in Komerički, 2007).

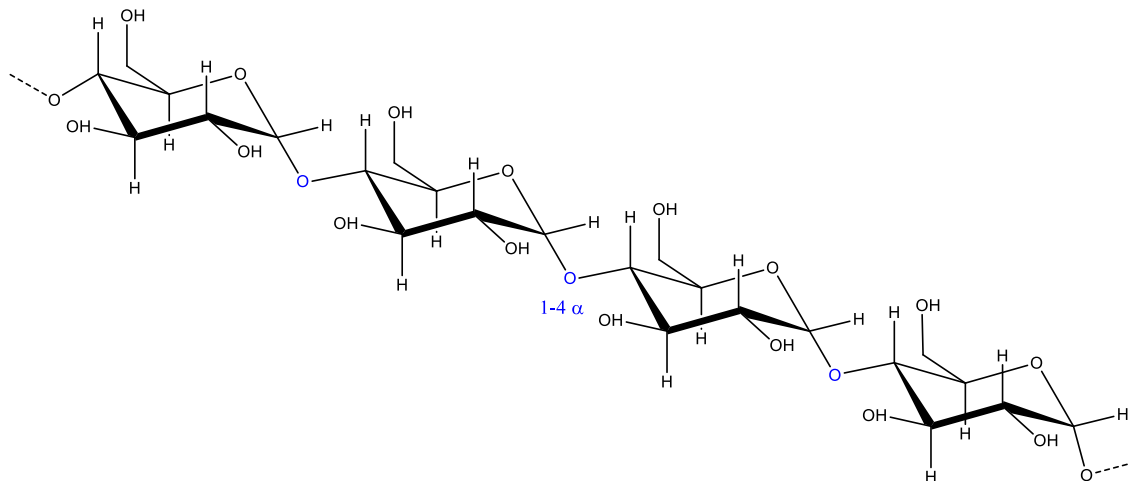
Največji delež moke predstavlja škrob. Ta delež je odvisen od vrste moke, v pšenični moki ga je v povprečju 87 %. Škrob predstavlja tudi največjo energetska vrednost moke. Škrob je polisaharid, ki predstavlja rastlinam hranilno snov. Je homopolimer, ki nastane iz molekul D--glukopiranoze, te pa gradijo dve vrsti polimerov: amilopektin in amilozo. Amilopektin je sestavljen iz D-glukopiranoz, ki se povezujejo z 1-4 α vezjo, zraven tega pa se na vsakih 25-30 monomernih enot pojavi še 1-6 α vez. Na ta način nastaja razvejana α vijačnica, kot prikazuje slika 1. Ta razvejanost poveča število aktivnih mest za ustrezne encime in omogoča hitrejšo razgradnjo škroba.



Slika 1: Povezovanje D-glukopiranoznih enot v strukturi amilopektina.

Amilopektin je glavna sestavina škroba in predstavlja približno 80 % njegove mase. V škrobu se nalaga v koncentrične plasti in daje škrobu sferično obliko. V vodi je amilopektin netopen. Tako kot pri amilozi se lahko v vijačnico vključijo majhne molekule. Jod povzroči rdeče-vijolično obarvanje amilopektina.

Amiloza je homopolimer glukoze, v katerem se posamezne glukoze povezujejo z 1-4 α vezjo, kot je prikazano na sliki 2. Nastane nerazvejena veriga, ki vsebuje 250-1000 glukoznih podenot. Zaradi kota v 1-4 α vezi se molekula zvije v desnosučno vijačnico, v kateri enemu obratu ustreza 7 molekul glukoze. V spiralo se lahko vključijo majhne molekule, ki povzročijo obarvanje. Jod obarva amilozo modro. Pri razgradnji amiloze so ključnega pomena encimi α -amilaze. Ti amilozo najprej razgradijo v maltozo, nato pa v D-glukozo.



Slika 2: Povezovanje D-glukopiranoznih enot v strukturi amiloze.

V moki je 8,6 % beljakovin ter 1,3 % maščob. Vsebnost vlaknin v moki je v povprečju 2,4 %, vsebnost mineralov pa 0,75 % (Lastnosti moke, b. d.).

V nalogi sva uporabljali naslednje vrste moke: pšenično belo, pšenično polbelo, polnozrnato rženo, rženo, pirino polnozrnato ter graham moko. V nadaljevanju bova te vrste mok tudi opisali.

2.1.2 Pšenična bela moka T500

Pšenična bela moka je najpogosteje uporabljena moka v gospodinjstvu. Pridobivamo jo iz očiščene pšenice, uporabimo pa le osrednji del zrna, ki ga sestavljajo predvsem škrob in beljakovine. Ljudje v začetku še niso poznali postopkov za ločitev lupine od ostalega dela žitnega zrna. Šele pred 300 leti se je pojavila bela moka, iz katere so vsaj delno odstranili otrobe. Vsebuje relativno majhno količino vitaminov in mineralov, saj se večina teh nahaja v zunanjem delu zrna. Bela moka je tako samo še škrob, ki so mu odstranili beljakovine, maščobne kisline, vitamine in minerale. Zato se taka moka ohrani leto dni. Ima rahlo sladkast okus (Lifestyle, 2010; Shibuya in Iwasaki, 1982).

2.1.3 Pšenična polbela moka T850

Pšenično polbela moko lahko imenujemo tudi krušna moka, saj se v glavnem uporablja za pripravo kruha in peciva. Ima več mineralov, vitaminov in vlaknin kot bela pšenična moka, zato je tudi bolj zdrava (Lifestyle, 2010).

2.1.4 Polnozrnata ržena moka

Beljakovine, ki tvorijo gluten, se pri rži razlikujejo od pšeničnih, saj rž vsebuje sluzne snovi, ki jih imenujemo pentozani. Ti vežejo vodo ter tvorijo strukturo testa namesto glutenske mreže. Zaradi njih je mogoče speči kruh tudi samo iz ržene moke (Šumer, b.d.).

2.1.5 Ržena moka T1250

Ržena moka ima modrikast ali sivkasto-zelenkast odtenek. T1250 je najbolj temna od vseh rženih mok. Ima do 15% vlage, vsebnost pepela je od 1,20 do 1,30 %. Je visoko hranilen proizvod, saj vsebuje velik delež kalcija in železa. Ker ne vsebuje dovolj glutena jo je priporočljivo mešati s pšenično moko (Lifestyle, 2010; Šešek, 1975).

2.1.6 Pirina polnozrnata moka

Pirina moka se pridobiva z mletjem prapšenice *Triticum spelta*. Je iz podobnih sestavin kot navadna bela pšenična moka. Vsebuje pa več dietnih vlaken in beljakovin. Potrebno jo je mešati s standardnimi mokami, saj je gluten slabše kvalitete (Prša, 2019).

2.1.7 Graham moka

Pšenično polnozrnato moko dobimo z mletjem celega pšeničnega zrna. Vsebuje tudi zunanji sloj žitnega zrna skupaj s kalčkom. Ima nižjo kalorično vrednost, manj glutena, več vitaminov, encimov ter balastnih snovi kot bela moka. Vsebuje vitamina B in E ter minerale natrija, kalija, kalcija in železa. Imenuje se tudi integralna moka ali »graham« moka. Ime je dobila po zdravniku dr. Sylvestru Grahamu, ki je že pred več kot sto leti polnovredno prehrano priporočal svojim pacientom (Lifestyle, 2010).

2.2 Encimi

Večino celičnih procesov in biokemijskih reakcij katalizirajo ter uravnavajo posebne beljakovine, ki jih imenujemo biološki katalizatorji ali encimi. Na smer reakcije ne vplivajo. V organizmih so bistvenega pomena pri razgradnji velikih molekul v prebavnem traktu, celičnem dihanju, delovanju mišic in živcev, procesu celične delitve ter izgradnji makromolekul (Krečič, 2008).

Encimi so zgrajeni iz ene ali več aminokislinskih verig, ki jih zaradi peptidnih vezi, s katerimi so aminokisliline med seboj povezane lahko imenujemo tudi polipeptidi. Peptidna vez ($-CO-NH-$) nastane, ko se povežeta karboksilna skupina ($-COOH$) ene ter amino skupina ($-NH_2$) druge aminokisliline. Nekateri encimi pa lahko delujejo le, če je nanje vezan še nebeljakovinski del, ki je del aktivnega mesta. Nebeljakovinski del lahko predstavlja organska molekula, imenovana koencim (npr. vitamin) ali pa anorganski ion. Poznamo tudi encime, ki vsebujejo oboje. Encimi, ki vsebujejo kovinski ion se imenujejo metaloencimi. Približno ena tretjina vseh znanih encimov je metaloencimov (Enzyme, 2019; Voet idr., 2008).

Na aktivno mesto encima se veže substrat, ki se pretvori v produkte. Med vezavo substrata aktivno mesto nekoliko spremeni obliko. Ko se obliki popolnoma prilagata, se lahko prične kataliza. Produkti nato encim zapustijo, in ta je pripravljen na vezavo novega substrata (Newman, 2017; Prša, 2019). Na aktivnem mestu enega encima se lahko v sekundi zamenja tudi do 1000 substratov (Enzyme, 2019). Encimi delujejo po modelu »ključa in ključavnice«, kar pomeni, da ima aktivno mesto encima specifično obliko, ki se popolnoma prilaga obliki določenega substrata.

Encimi lahko normalno delujejo le v točno določenih pogojih. Večina bioloških katalizatorjev v človeškem telesu najbolje deluje pri 37 °C. Sicer lahko delujejo tudi pri nižjih temperaturah, vendar veliko počasneje. Poleg temperature je pomembna tudi pH vrednost okolja. V primeru, da je temperatura previsoka ali okolje preveč kislo ali alkalno, pride do spremembe oblike encima na aktivnem mestu – encim denaturira in substrat se nanj več ne more vezati (Newman, 2017; Prša, 2019).

Encimi se po IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) delijo na šest osnovnih kategorij glede na vrsto reakcije, ki jo katalizirajo.

- Oksidoreduktaze sodelujejo pri prenosu elektronov.
- Transferaze prenašajo kemijsko skupino iz ene snovi na drugo.
- Hidrolaze razcepijo vezi C–C, C–N in C–O s hidrolizo oziroma z vnosom molekule vode.
- Liaze tvorijo dvojne vezi z odstranjevanjem skupin ali pa katalizirajo adicijo kemijskih skupin na dvojno vez.
- Izomeraze prenašajo skupine znotraj molekul in omogočajo nastajanje izomerov.
- Ligaze katalizirajo spajanje molekul ob uporabi energije iz molekul ATP.¹

Encimi se danes uporabljajo na številnih področjih, na primer v tekstilni, farmacevtski in kozmetični industriji za pretvorbo surovine v končni izdelek ali kot aditivi za spremembo značilnosti izdelka ter pri proizvodnji hrane. Pri pekarskih izdelkih lahko nekateri encimi izboljšajo teksturo in okus ter skrajšajo čas proizvodnje (Prša, 2019; Šimunid, 2010; Miguel idr., 2013).

2.2.1 Polifenol oksidaza

Oksidaze, ki katalizirajo oksiredukcijske reakcije, že več kot 50 let zanimajo znanstvenike, ki se ukvarjajo s preučevanjem žit. Eden prvih člankov o oksidazah v pšenični moki je bil objavljen že v prvi monografiji, ki jo je izdalo AACCC - American Association of Cereal Chemistry (Šimunid, 2010).

Vsi oksidacijski encimi vsebujejo poleg beljakovinskih še nebeljakovinske dele, na podlagi katerih jih lahko razdelimo na več skupin. Encim polifenol oksidaza spada v skupino metaloencimov, kar pomeni, da zraven beljakovinskega dela vsebuje tudi anorganski ion. Osrednji del vsake polifenol

¹ Adenozin trifosfat je molekula, ki služi kot vir energije pri različnih procesih.

oksidaze vsebuje dve mesti, na kateri sta vezana dva bakrova iona. Na teh mestih pride do interakcije encima z molekulami kisika iz zraka ali fenolnim substratom (Šimunid, 2010).

Polifenol oksidaze se nahajajo v kloroplastih večine kritosemenk. Njihovo prisotnost v rastlinah so odkrili leta 1895. V zdravih rastlinskih celicah je encim fizično ločen od substrata, ki je v vakuoli. V nepoškodovanih tkivih je encim neaktiven. Ko pride do poškodbe celice, se vsebina kloroplastov pomeša z citoplazmo ter vsebino vakuole. Substrat se veže na aktivno mesto encima in pride do reakcije (Hind, Marshak in Coughlan, 1995; Erjavec, 2007).

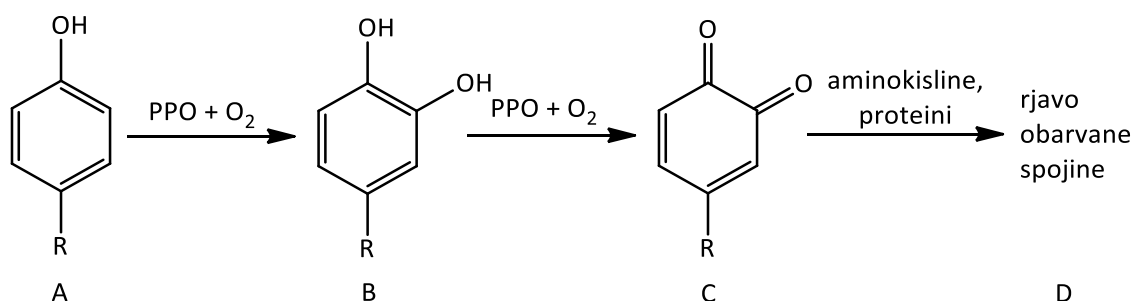
Polifenol oksidaza katalizira hidroksilacijo monofenola v o-difenol ter oksidacijo o-difenola v o-kinon, kot je prikazano na reakcijski shemi na sliki 3. Nastali kinoni so zelo reaktivni in lahko reagirajo med seboj ali pa z amini ali fenoli ter s tem tvorijo kompleksne polimere melanina, ki so rjave barve. Ta reakcija se imenuje reakcija encimskega rjavenja ali melanogeneza (Šimunid, 2010). Nastali rjavi polimeri ščitijo poškodovano tkivo živih organizmov pred nadaljnjimi poškodbami. (Hind, Marshak in Coughlan, 1995). Poleg zaščite pred mehanskimi poškodbami, igra polifenol oksidaza pomembno vlogo tudi pri obrambnem mehanizmu rastlin pred okužbami (Šimunid, 2010).

Najprimernejši pH za delovanje tega encima je med 5 in 7. Če vrednost pH v okolju pade pod 4, vez beljakovinskega dela encima z bakrom na aktivnem mestu postane šibkejša, kar onemogoči pravilno delovanje encima (Martinez in Whittaker, 1995).

Najbolj znan primer polifenol oksidaze je tirozinaza v glivah. Polifenol oksidaze najdemo tudi v živalskih tkivih ter nekaterih mikroorganizmih (Šimunid, 2010).

V pšeničnem zrnju je polifenol oksidaza koncentrirana tik pod lupino, v aleveronski plasti zrna. V manjših koncentracijah se pojavlja tudi v endospermu, v zarodnih frakcijah pa ni prisotna. Pšenica vsebuje dve vrsti polifenol oksidaz, monofenol monoooksigenaze ter difenoloksidaze. Encimi so lahko neaktivni, aktiviramo jih lahko z določenimi reagenti (Šimunid, 2010).

Strokovnjaki menijo, da je prav polifenol oksidaza glavni vzrok za padec kakovosti živil (tudi moke) pri skladiščenju zaradi procesa rjavenja ob mehanskih poškodbah tkiv. Zaradi rjavenja pri skladiščenju lahko pride do spremembe izgleda ter predvsem okusa moke, torej padca kakovosti ter skrajšanja roka uporabnosti. Encimsko rjavenje tako dandanes predstavlja velik problem v živilski industriji. Dolgo časa so na proces rjavenja poskušali vplivati s termično obdelavo, vendar so imele tovrstne metode številne pomanjkljivosti. Zaradi previsoke temperature je namreč pogosto prihajalo do trajnih sprememb barve, teksture ter okusa živil, uničena pa so bila tudi hranila, občutljiva na vročino. Dandanes so v ospredje postavljene nove metode, s katerimi poskušajo na aktivnost encima vplivati s čim manjšim poseganjem v sestavo moke in ne vključujejo termične obdelave (Iqbal idr., 2019; Kahn, 1975).



Slika 3: Encimska reakcija rjavenja. Polifenol oksidaze (PPO) katalizirajo hidroksilacijo fenolnih spojin (A) v benzendiolne spojine (B) in te naprej v kinone (C). Kinoni lahko reagirajo med seboj ali z aminokisljinami v kompleksne spojine, ki so rjave barve.

V raziskovalni nalogi sva poskušali pri temperaturi delovanja encimov, na aktivnost encima polifenol oksidaze ter posledično na proces rjavenja vplivati s SC CO₂.

2.2.2 Albumin

Albumin je eden izmed plazemskih beljakovin. Najdemo ga v krvni plazmi, ki predstavlja kar 56 % celotne prostornine krvi v človeškem telesu. Je glavna komponenta krvne plazme, saj predstavlja kar 40 - 60 % vseh plazemskih beljakovin. Ena molekula lahko deluje tudi 15 - 19 dni (Kumar in Gill, 2018).

Albumin je pomemben predvsem pri uravnavanju količine krvi v krvnem obtoku, saj s tem ko veže nase veliko vode, pripomore k višanju ozmotskega tlaka krvi. Krvna plazma se namreč neprestano preceja v medcelične prostore ter zapušča kapilare, plazemske beljakovine pa so prevelike, da bi lahko prehajale skozi kapilarne stene. Tako se med pronicanjem krvi skozi kapilare in ozmotskim tlakom vzpostavi ravnotežje (Stušek, 2006). Pomemben je tudi pri prenosu ter shranjevanju različnih ligandov² ter predstavlja vir aminokislin (Kumar in Gill, 2018).

2.3 Superkritični fluidi

Pline ali tekočine, ki so nad kritično točko imenujemo superkritični fluidi (SCF). To so pogoji, ko sta tlak in temperatura nad kritično vrednostjo. Kritične vrednosti pa so vrednosti, pri katerih ne moremo ločiti med plinasto in kapljevinasto fazo snovi (Knez in Škerget, 2009).

Ekstrakcija s SCF je hitro rastoča alternativa za nekatere konvencionalne metode ekstrakcije, frakcionacije in analize, saj zaradi različnih dejavnikov dovoljuje visoko stopnjo prenosa mase zaradi visoke difuzivnosti in nizke viskoznosti. Temperatura in tlak vplivata na hidratacijsko moč SCF in druge dejavnike, ki vplivajo na reakcijo. SCF se po ekstrakciji ali reakciji avtomatsko odstrani (Gselman, 2012).

SCF se uporabljajo kot topila za različne ekstrakcijske procese. Uporabljajo pa se tudi v neekstrakcijskih procesih kot topila za kemijske in biokemijske reakcije, topila za kromatografske postopke, mediji za pridobivanje majhnih delcev (Knez in Škerget, 2009). Zaradi nestrupenosti jih uporabljajo v živilski in kozmetični industriji, industriji pijač, farmacevtski in kemijski industriji (Gselman, 2012).

2.3.1 Superkritični ogljikov dioksid

Najpogosteje uporabljen SCF je superkritični ogljikov dioksid (SC CO₂). Je okolju prijazen reakcijski medij za kemijsko sintezo. SC CO₂ je nereaktiven, ni strupen in ni vnetljiv. Je lahko dobavljiv in zaradi tega tudi relativno poceni. Ima pretežno nizek kritični tlak in temperaturo (73,8 bar; 31,1 °C). To omogoča ohranitev toplotno nestabilnih spojin. Blizu kritične točke majhne spremembe tlaka in temperature vodijo do velikih sprememb v gostoti, topnosti, razdelitvenem koeficientu in dielektrični konstanti³ (Gselman, 2012). Fazni diagram za ogljikov dioksid je prikazan na sliki 4. Prikazuje območje SC CO₂ nad kritično točko.

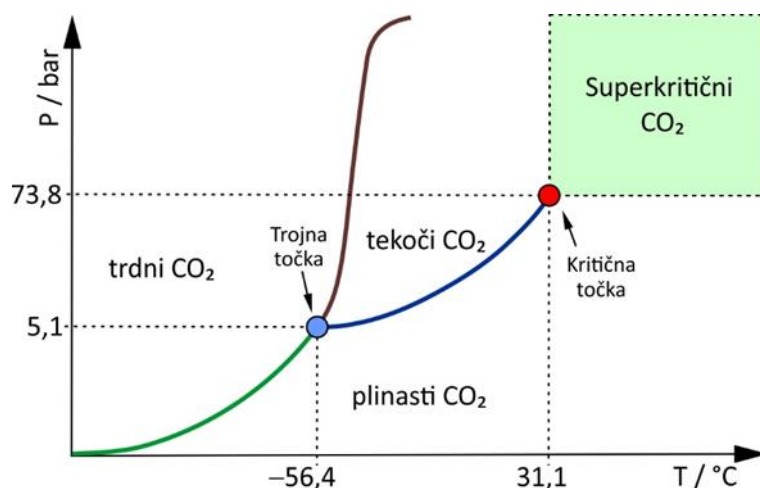
SC CO₂ omogoča brez oksidacijsko okolje, ki zavira nastajanje nezaželenih oksidacijskih produktov med reakcijo. Nizka viskoznost in visoka difuzivnost SC CO₂ olajšata transport

² Ligand je molekula ali ion z neveznimi elektronskimi pari.

³ Dielektrična ali influenčna konstanta je razmerje med gostoto in jakostjo električnega polja v praznem prostoru.

raztopljenega substrata v pore imobiliziranega biokatalitičnega prenosnika. Tako se omogoči hitrejši odziv, kot bi bil v organskih topilih (Gselman, 2012).

Veliko encimov, še posebno tisti, ki so v suho-zamrznjeni obliki, imajo visoko stabilnost v SC CO₂. S prisotnostjo vode ali vodnega pufra pa se jim stabilnost zmanjša. Izguba aktivnosti encimov v SC CO₂ je odvisna tudi od časa depresuracije⁴ in vsebnosti vode v sistemu. Nekateri encimi ohranjajo svojo aktivnost v SC CO₂.



Slika 4: Fazni diagram za ogljikov dioksid.

Nekatere prednosti SC CO₂ kot medija za biokemijske reakcije:

1. V primerjavi z vodnimi reakcijskimi mediji:
 - Enofazni sistemi v primeru v vodi netopnih komponent.
 - Netopnost encima v CO₂.
2. V primerjavi z organskim tekočim medijem:
 - Netoksičnost, nevnetljivost in nizka cena, kar je zelo atraktivno za živilsko in farmacevtsko industrijo.
 - V produktu ni ostanka topila, saj je pri atmosferskih pogojih CO₂ plin.
3. V primerjavi z vsemi tekočimi mediji:
 - Zaradi visoke difuzivnosti, nizke viskoznosti ter nizke površinske napetosti nastopijo nižje notranje omejitve prenosa snovi za heterogene kemijske in biokemijske katalizatorje. Zato so reakcijske hitrosti višje.
 - Dobra mešljivost plinov.
 - Enostavna in energetsko ugodna separacija CO₂ od reakcijske zmesi.
 - Občutljivost topnosti na spremembe v temperaturi in tlaku lahko uporabimo za selektivnost reakcije in ločitev produktov od reaktantov. Topnost molekul topljenca lahko spremenimo z dodatkom majhnih količin praviloma izbranega ko-topila in zato kontroliramo hitrost reakcije.
 - Možnost kristalizacije produkta direktno iz raztopine s SC CO₂, ki jo dosežemo z znižanjem tlaka. Tlak SC CO₂ ni tako visok, da bi poškodoval biopolimere, medtem ko je zahtevana temperatura relativno nizka, kar ustreza na visoke temperature občutljivim encimom (Gselman, 2012).

⁴ Znižanje tlaka.

2.4 Vitamin C

Askorbinsko kislino ali vitamin C so odkrili leta 1912, leta 1928 so jo izolirali, leta 1933 pa že tudi proizvajali. Odkritelj Albert Von Szent Györgyi je leta 1937 za odkritje askorbinske kisline prejel Nobelovo nagrado. Takrat so vitamin C uporabljali za zdravljenje skorbuta, bolezen, ki jo je povzročalo pomanjkanje svežega sadja in zelenjave. Ta bolezen je bila pogosta pri mornarjih (Arrigoni in De Tullio, 2002).

Vitamin C poznamo kot L-askorbinsko kislino ali askorbat. Vitamina C naše telo ni sposobno izdelovati samo, zato mu ga moramo stalno zagotavljati s primerno izbiro hrane. Pomemben je za izgradnjo kolagena, vezivnega tkiva in beljakovinskih vlaken, ki dajejo moč našim zobem, dlesnim, mišicam, ožilju ter koži. V imunskem sistemu vitamin C pomaga belim krvnim celicam v boju proti okužbam. Prav tako pomaga telesu absorbirati železo, ki je potrebno za izgradnjo hemoglobina. Ena najpomembnejših nalog vitamina C je zaščita telesa pred škodljivimi učinki prostih radikalov. To so v telesu potencialno škodljive molekule, ki lahko škodujejo zdravim celicam. Vitamin C se pogosto uporablja tudi kot naravni antioksidant, torej preprečuje kvarjenje hrane in pijače, ki ga povzroča kisik v zraku (Salvador in Chisvert, 2017).

Leta 1935 je Jorgensen opazil, da askorbinska kislina ugodno vpliva na kvaliteto testa. Uporaba askorbinske kisline v krušnem testu med 20 in 30 mg kg⁻¹ moke je povečala količino kruha za 20 % (Grosch in Wieser, 1999). Ravno iz tega razloga še danes moki namensko dodajajo askorbinsko kislino.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

Večino eksperimentalnega dela sva izvajali v laboratorijih Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru: ekstrakcijo encimov iz moke, izpostavitve moke SC CO₂, določevanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi in določevanje aktivnosti encima polifenol oksidaze.

Jodometrično titracijo, s katero sva določali delež askorbinske kisline v moki, pa sva opravili v laboratoriju Gimnazije Ptuj.

Pri eksperimentalnem delu sva uporabljali v nadaljevanju navedene kemikalije in laboratorijsko opremo.

3.1 Kemikalije

- Albumin iz govejega seruma, Grade II, Sigma
- Coomassie-Brilliant Blue G250, Merck
- Destilirana voda, Milli-Q
- EDTA (etilendiamintetraocetna kislina)
- Fosforjeva kislina (H₃PO₄), Merck
- Graham moka (GM)
- Jod (I₂), Merck
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), Merck
- Kalijev-fosfatni pufer
- Kalijev jodid (KI)
- L-askorbinska kislina
- L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA)
- Natrijev acetat (CH₃COONa), Sigma
- Natrijev hidroksid (NaOH), Kefo
- Ocetna kislina (CH₃COOH), Sigma
- Ogljikov dioksid (CO₂), 2,5, 99,5 % čistost, Messer
- Pirina polnozrnata moka (PPZM)
- Polnozrnata ržena moka (PZRM)
- Pšenična bela moka T500 (PBM)
- Pšenična polbela moka T850 (PPBM)
- Ržena moka T1250 (RM)
- Škrob, Merck

3.2 Laboratorijska oprema in aparature

- Avtomatska pipeta Transferpette
- Bireta
- Centrifuga, Eppendorf
- Centrifugirke
- Erlenmajerice
- Filter papir
- Hladilnik
- Magnetno mešalo
- Merilna bučka
- Mikrocentrifugirke
- Parafilm
- Steklene čaše
- Steklene kroglice
- Stojalo za centrifugirke
- Spatula
- Stresalnik, Heidolph Unimax 1010
- Tehnica
- Termometer
- UV-VIS spektrofotometer, Varian, Cary 50 Probe
- Visokotlačni šaržni reaktor
- Vortex, Assistent

Najpomembnejši del laboratorijske opreme je bil zagotovo visokotlačni šaržni reaktor za doseganje superkritičnih pogojev za ogljikov dioksid, kateremu sva izpostavljali moko. Reaktor, ki sva ga uporabili pri izvajanju eksperimentov vidimo na sliki 5.



Slika 5: Visokotlačni šaržni reaktor.

3.3 Ekstrakcija proteinov iz moke

Ekstrakcija proteinov iz moke je postopek, pri katerem pridobimo vodotopne proteine iz zmesi s topilom tako, da se pri tem snov kemično ne spremeni.

Proteine sva ekstrahirali iz kisle raztopine. Za to sva uporabili acetatni pufer (pH = 4,8). Najprej sva pripravili 1,0 L acetatnega pufera s koncentracijo 0,10 mol L⁻¹. V ta namen sva v merilno bučko zatehtali 6,62 g natrijevega acetata CH₃COONa in 1,16 g očetne kisline CH₃COOH. Dodali sva Milli-Q vodo in nato še toliko 1,0 M NaOH, da sva pH dobljene raztopine zvišali na 5,3. Bučko sva nato dopolnili do oznake 1000 mL.

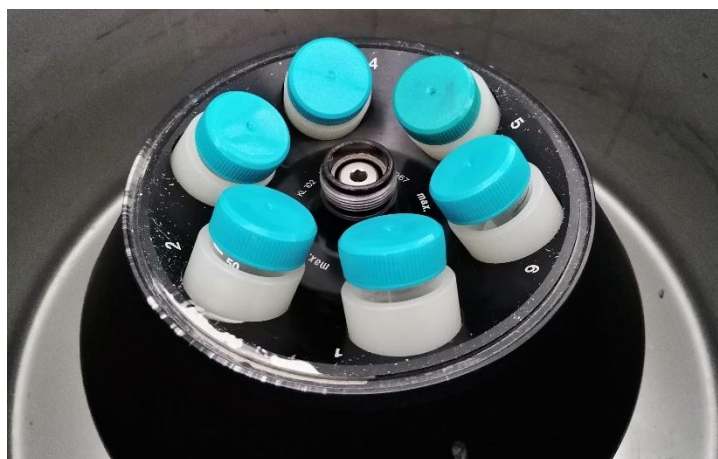
Preglednica 1. Pregled nad vrstami moke in pogoji 1, 2 in 3, ki sva jih uporabili pri ekstrakciji proteinov.

Vrsta moke	Pogoji		
	24 ur v hladilniku (1)	Sobna temp. (2)	Sobna temp. z dodanimi kroglicami (3)
Pšenična bela moka (PBM)	PBM1	PBM2	PBM3
Pšenična polbela moka (PPBM)	PPBM1	PPBM2	PPBM3
Polnozrnata ržena moka (PZRM)	PZRM1	PZRM2	PZRM3
Ržena moka (RM)	RM1	RM2	RM3
Pirina polnozrnata moka (PPZM)	PPZM1	PPZM2	PPZM3
Graham moka (GM)	GM1	GM2	GM3

Proteine sva ekstrahirali iz šestih različnih mok (PBM, PPBM, PZRM, RM PPZM in GM), pri tem pa sva uporabili moko izpostavljeno trem različnim pogojem: moko, ki sva jo 24 ur hranili v hladilniku (1), moko sobne temperature (2) in moko sobne temperature, v katero sva dodali po pet steklenih kroglic (3). Vrste moke in pogoji so zbrani v preglednici 1.

Tako sva v 16 erlenmajeric s prostornino 100 mL zatehtali po 5,0 g moke in v vsako dodali 50,0 mL 0,1 M acetatnega pufra. Vseh 16 erlenmajeric sva postavili na stresalnik (300 vrtljajev min^{-1}) in pri sobni temperaturi stresali vsebino erlenmajeric 90 minut.

Po končanem stresanju oz. ekstrakciji sva odlili po 10 mL vzorca v centrifugirke in v centrifugi, ki je prikazana na sliki 6, centrifugirali 5 minut pri 8000 vrtljajih min^{-1} . Netopni delci so se pri centrifugiranju ločili oziroma usedli na dno centrifugirke, topni del (supernatant) pa sva odlili (oddekantirali) in ga shranili za nadaljnjo analizo. V tako pridobljenem supernatantu sva po Bradfordovi metodi z UV-VIS spektrofotometrom izmerili absorbance ter nato določili koncentracijo prisotnih proteinov.



Slika 6: Centrifuga.

3.4 Določevanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Bradfordova metoda spada med splošne metode za kvantitativno določevanje koncentracije proteinov v neznanem vzorcu in temelji na spektrofotometričnem določevanju proteinov. Coomassie Blue se veže na proteine ter pozitivno nabite in aromatske aminokislino v kislem.

Bradfordov reagent sva pripravili tako, da sva raztopili 100 mg Coomassie Blue v 50 mL 95 % etanola, dodali Milli-Q vodo ter z magnetnim mešalom mešali 10 minut. Nato sva dodali še 100 mL 85 % fosforne kisline H_3PO_4 in razredčili do oznake 1 L z Milli-Q vodo.

Bradfordov reagent sva pred uporabo dobro premešali in termostatirali na sobno temperaturo. V mikrocentrifugirke sva odpipetirali po 1000 μL Bradfordovega reagenta in po 20 μL vzorca. Pripravili sva še slepi vzorec s 1000 μL Bradfordovega reagenta in 20 μL destilirane vode.

Vsebinsko v mikrocentrifugirkah sva premešali in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm z UV-VIS spektrofotometrom s programom Advanced reads.

Za izračun koncentracij proteinov sva potrebovali umeritveno krivuljo. Za pripravo umeritvene krivulje sva kot protein uporabili albumin iz govejega seruma s koncentracijami med 0 in 1 mg mL^{-1} . Raztopino s koncentracijo 10 mg mL^{-1} sva pripravili tako, da sva zatehtali 10 mg albumina

in dodali 1 mL Milli-Q vode. Tako pripravljeno raztopino albumina sva ustrezno razredčili. Dobili sva koncentracije 0 mg mL⁻¹, 0,2 mg mL⁻¹, 0,4 mg mL⁻¹, 0,6 mg mL⁻¹, 0,8 mg mL⁻¹ in 1 mg mL⁻¹. Iz umeritvene krivulje sva določili naklon premice oziroma k . To vrednost sva kasneje uporabili pri izračunu koncentracije proteinov v vzorcih, po enačbi 1:

$$\gamma = \frac{A_{595}}{k}$$

Enačba 1

kjer je A_{595} - absorbanca, merjena pri valovni dolžini svetlobe 595 nm, k naklon premice (0,5655) in γ masna koncentracija proteina v vzorcu v mg mL⁻¹.

3.5 Določevanje vpliva SC CO₂ na aktivnost encimov

Zatehtali sva 5,0 g bele pšenične moke, jo zavili v filter papir in dali v reaktor. Reaktor sva predhodno segreti na 35 °C. Preučevali sva vpliv tlaka in časa izpostavitve na aktivnost encimov v moki. Po končanem izpostavljanju SC CO₂ sva izvedli hitro dekompresijo in medtem merili čas, dokler ni vrednost tlaka padla na nič.

Moko sva vzeli iz reaktorja, jo stresli v erlenmajerice in dodali 50 mL 0,1 M acetatnega puфра. Zmes sva stresali pri sobni temperaturi 90 minut pri 300 vrtljajih min⁻¹. Po pretečenem času sva odlili po 10 mL vzorca v centrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 8000 vrtljajih min⁻¹. Koncentracijo proteinov v supernatantu sva določili z Bradfordovo metodo. UV-VIS spektrofotometer, ki sva ga uporabljali za merjenje absorbanc, je prikazan na sliki 7.



Slika 7: UV-VIS spektrofotometer.

Aktivnost encima polifenol oksidaze sva določili z aktivnostnim testom. V ta namen sva pripravili štiri reagente:

- Reagent A - kalijev fosfatni pufer; pH 6,5.
- Reagent B - 9,859 mg L-DOPA sva raztopili v 10,0 mL merilni bučki z reagentom A.
- Reagent C - 4,160 mg askorbinske kisline sva raztopili v 10,0 mL merilni bučki z reagentom A.
- Reagent D - 1,210 mg EDTA sva raztopili v 50,0 mL merilni bučki z reagentom A.

Nato sva v vsako od petih epruвет odpipetirali po 2,6 mL reagenta A, 0,1 mL reagenta B, 0,1 mL reagenta C ter po 0,1 mL reagenta D. Pripravili sva tudi slepi vzorec v katerega sva dali 2,8 mL reagenta A, 0,1 mL reagenta B in 0,1 mL reagenta D. Tik preden sva pričeli z meritvijo absorbanc sva v epruvete dodali še po 0,1 mL posameznega vzorca. Absorbanco sva merili 5 minut pri valovni dolžini 265 nm. Iz izmerjenih absorbanc sva izračunali specifično aktivnost encima polifenol oksidaze.

Specifična aktivnost encima polifenol oksidaze (A), ki je izražena v $U\ mg^{-1}$, nam pove število encimskih enot na mg celotnih proteinov in jo izračunamo s pomočjo razlike absorbanc, ki jo dobimo tako, da od absorbance, izmerjene pri 0 minutah odštejemo absorbanco, izmerjeno pri 5 minutah. Specifično aktivnost encima polifenol oksidaze izračunamo po enačbi 2:

$$A = \frac{A_{265}(0\ min) - A_{265}(5\ min)}{5\ min} \cdot \frac{1}{(0,1)(0,001)} \quad \text{Enačba 2}$$

Kjer je A specifična aktivnost encima polifenol oksidaze, vrednost 0,1 predstavlja prostornino vzorca v mL, 0,001 pa spremembo absorbance v min^{-1} na enoto polifenol oksidaze v 3,0 mL reakcijske zmesi, ki smo jo merili pri pH 6,5 in temperaturi 25 °C.

Preostala aktivnost nam pove, za koliko se je dejansko zmanjšala aktivnost nekega encima, in predstavlja razmerje med specifično aktivnostjo encima po izpostavitvi $SC\ CO_2$ (A_2) in med specifično aktivnostjo encima pred izpostavitvijo $SC\ CO_2$ (A_1). Lahko jo izražamo v odstotkih, kot to kaže enačba 3.

$$\text{Preostala aktivnost v \%} = \frac{A_2}{A_1} \times 100 \quad \text{Enačba 3}$$

Kjer je A_2 specifična aktivnost encima polifenol oksidaze po izpostavitvi $SC\ CO_2$, A_1 pa specifična aktivnost encima polifenol oksidaze pred izpostavitvijo $SC\ CO_2$.

3.6 Določevanje deleža vitamina C

Določevanje deleža vitamina C poteka na podlagi redoks reakcije z jodom. Jod povzroči oksidacijo askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino, pri tem pa se jod reducira v jodidne ione, kot prikazuje reakcijska shema na sliki 8. Ko se vsa askorbinska kislina absorbira, jodid reagira s škrobnim indikatorjem in tvori kompleks trajno modre barve – končna točka titracije.

Delež vitamina C v moki sva določevali v vzorcih pred in po izpostavitvi $SC\ CO_2$. Zanimalo naju je tudi, kako se spreminja delež vitamina C v odvisnosti od časa. Zato sva vzorce moke raztopili v destilirani vodi in vsakih nekaj ur titrirali posamezni vzorec.

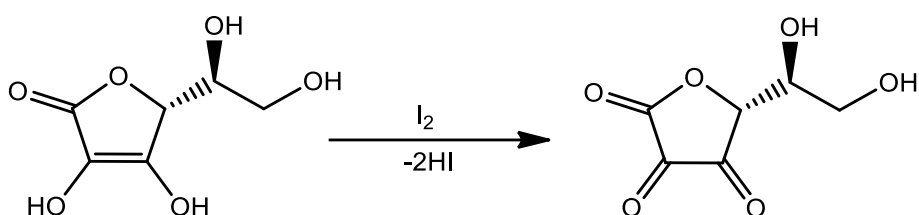
Najprej sva pripravili 0,005 M raztopino joda. V 100 mL čašo sva zatehtali 2,0 g kalijevega jodida in 1,3 g joda. Dodali sva nekaj mL destilirane vode in mešali dokler se ni raztopilo. Tako pripravljeno raztopino sva nato prelili v 1 L merilno bučko in z destilirano vodo razredčili do oznake.

Nato sva pripravili indikator 0,5 % raztopino škroba. V 50 mL čašo sva zatehtali 0,25 g topnega škroba in do oznake napolnili z vročo vodo. Mešali sva dokler se ni ves škrob raztopil. Pred uporabo sva raztopino škroba ohladili na sobno temperaturo.

Vzorci za določevanje deleža vitamina C sva pripravljali v dveh paralelkah. V 250 mL erlenmajerice sva zatehtali po 0,10 g posameznega vzorca moke ter dodali po 20 mL destilirane vode. Vse skupaj sva dobro premešali, nato pa dodali še po 150 mL destilirane vode in po 1 mL 0,5 % indikatorja. Bireto sva napolnili z 0,005 M raztopino joda do oznake in titrirali pripravljene vzorce do preskoka barve v obstojno modro barvo. Delež vitamina C sva izračunali po enačbi 4.

$$w_{AK} = \frac{c \times V \times M_{AK}}{m(\text{moke})} \quad \text{Enačba 4}$$

Kjer je w_{AK} masni delež askorbinske kisline, c množinska koncentracija jodovice ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$), V prostornina porabljenega titranta – jodovice v mililitrih, M_{AK} molska masa askorbinske kisline ($176,12 \text{ g mol}^{-1}$), m je masa moke v gramih.



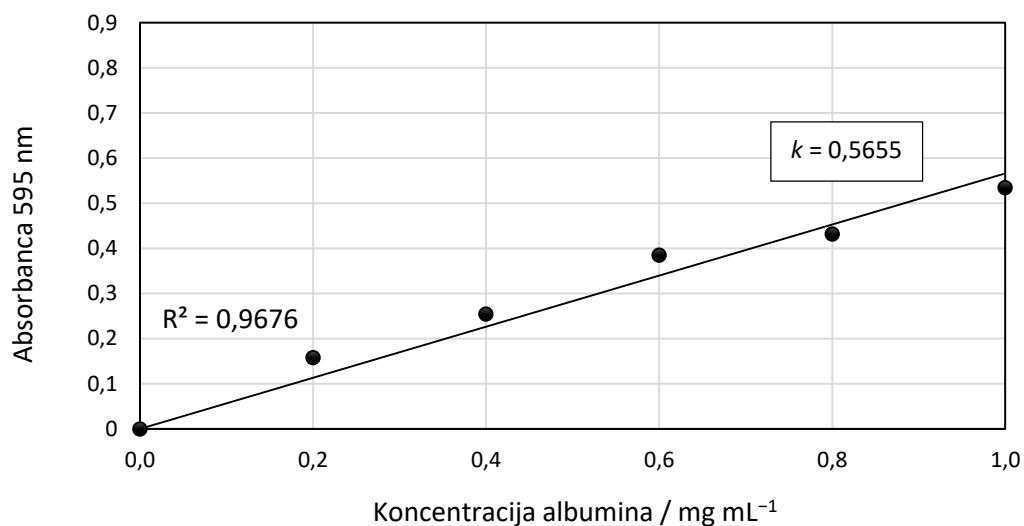
Slika 8. Reakcijska shema, ki prikazuje oksidacijo L-askorbinske kisline z jodom.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

Vse rezultate, ki sva jih dobili z ekstrakcijo proteinov iz moke pred in po izpostavitvi SC CO₂ podajava tabelarno in grafično. Prav tako sva v tabelah in grafih zbrali rezultate meritev deleža vitamina C v moki pred in po izpostavitvi moke SC CO₂.

4.1 Določevanje koncentracije proteinov v moki

Po ekstrakciji sva po Bradfordovi metodi določili koncentracijo proteinov. Predhodno sva pripravili umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 9. S koeficientom, ki predstavlja naklon premice (0,5655), sva iz absorbanc izračunali koncentracijo proteinov v moki. Absorbance in koncentracije proteinov so podane v preglednici 2.

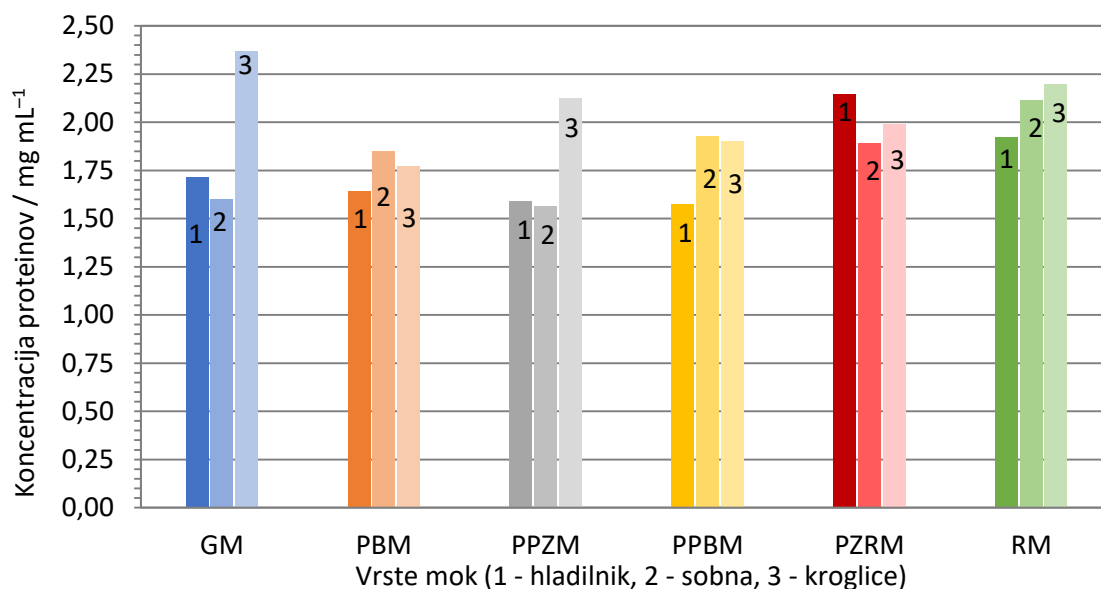


Slika 9: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracij proteinov po Bradfordu.

Preglednica 2. Absorbance in masne koncentracije proteinov v mg mL⁻¹, ki sva jih ekstrahirali iz različnih vrst moke in po različnih metodah.

Vzorec	$A_{595\text{ nm}}$	γ mg mL ⁻¹	Vzorec	$A_{595\text{ nm}}$	γ mg mL ⁻¹
PBM1	0,9279	1,6408	RM1	1,0862	1,9208
PBM2	1,0468	1,8511	RM2	1,1971	2,1169
PBM3	1,0019	1,7717	RM3	1,2425	2,1972
PPBM1	0,8916	1,5767	PPZM1	0,8986	1,5890
PPBM2	1,0919	1,9309	PPZM2	0,8842	1,5636
PPBM3	1,0755	1,9019	PPZM3	1,203	2,1273
PZRM1	1,2151	2,1487	GM1	0,9708	1,7167
PZRM2	1,0694	1,8911	GM2	0,9044	1,5993
PZRM3	1,1243	1,9882	GM3	1,3401	2,3698

Kot je razvidno iz preglednice 2 in slike 10, sva najvišje absorbance in koncentracije proteinov izmerili pri graham moki, pirini polnozrnati moki in pri rženi moki po ekstrakciji s kroglicami. Pri pšenični beli in pšenični polbeli moki so bile te vrednosti najvišje pri vzorcih sobne temperature, pri polnozrnati rženi moki pa so bile izmerjene vrednosti absorbance najvišje pri moki iz hladilnika. Pri pšenični beli in pšenični polbeli moki je razlika v koncentraciji proteinov pri uporabi drugega in tretjega načina ekstrakcije majhna.



Slika 10: Masne koncentracije proteinov v mg mL^{-1} , ekstrahiranih iz različnih vrst moke, ki so bile izpostavljene različnim pogojem.

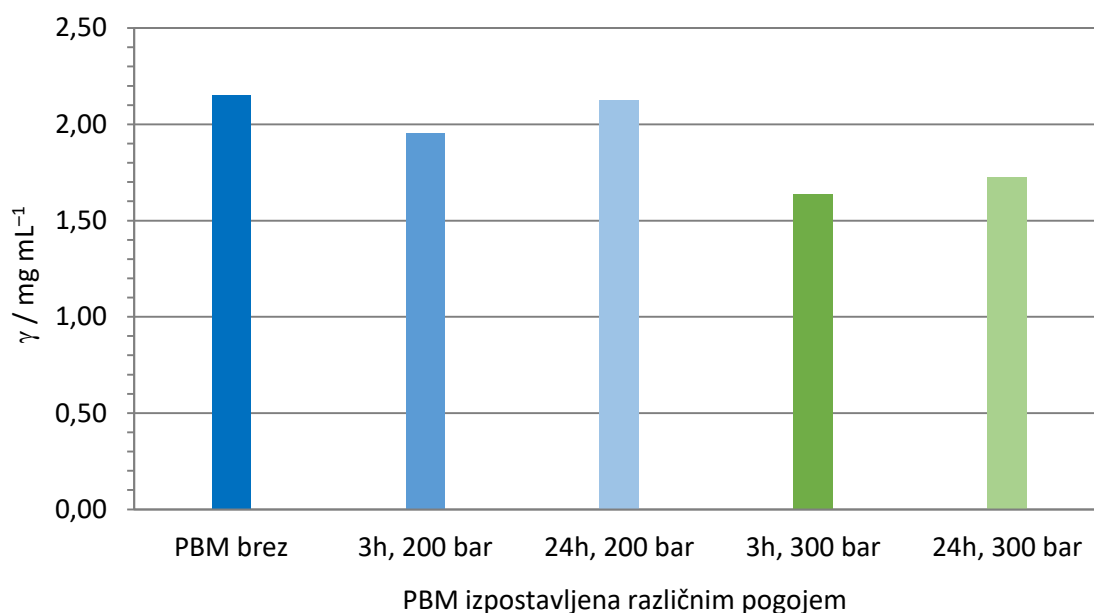
Najvišjo koncentracijo proteinov sva dosegli po tretjem postopku ekstrakcije pri graham moki, kjer smo k moki v procesu ekstrakcije dodali steklene kroglice. Kljub temu, sva se v nadaljnjem delu odločili za uporabo pšenične bele moke. Je najpogosteje uporabljena in najbolj raziskana. Proces rjavenja je pri njej najbolj opazen. V nadaljevanju sva izbrali način ekstrakcije z dodajanjem steklenih kroglic, ki je v treh primerih dajal najugodnejše rezultate.

4.2 Določevanje vpliva SC CO₂ na aktivnost encimov

Vzorec pšenične bele moke sva izpostavili SC CO₂. Po ekstrakciji proteinov sva določili koncentracijo encimov po Bradfordovi metodi. Rezultati so podani v preglednici 3.

Preglednica 3. Absorbance (A) in masne koncentracije proteinov γ v mg mL^{-1} , ki sva jih ekstrahirali iz PBM z uporabo kroglic, potem ko sva belo moko izpostavili SC CO₂ pri različnih pogojih.

Pogoj	$A_{595 \text{ nm}}$	γ mg mL^{-1}
brez	1,2171	2,1523
3h, 200 bar	1,1055	1,9549
24h, 200 bar	1,2034	2,1280
3h, 300 bar	0,9250	1,6357
24h, 300 bar	0,9777	1,7288



Slika 11: Masne koncentracije encimov v PBM izpostavljeni različnim pogojem.

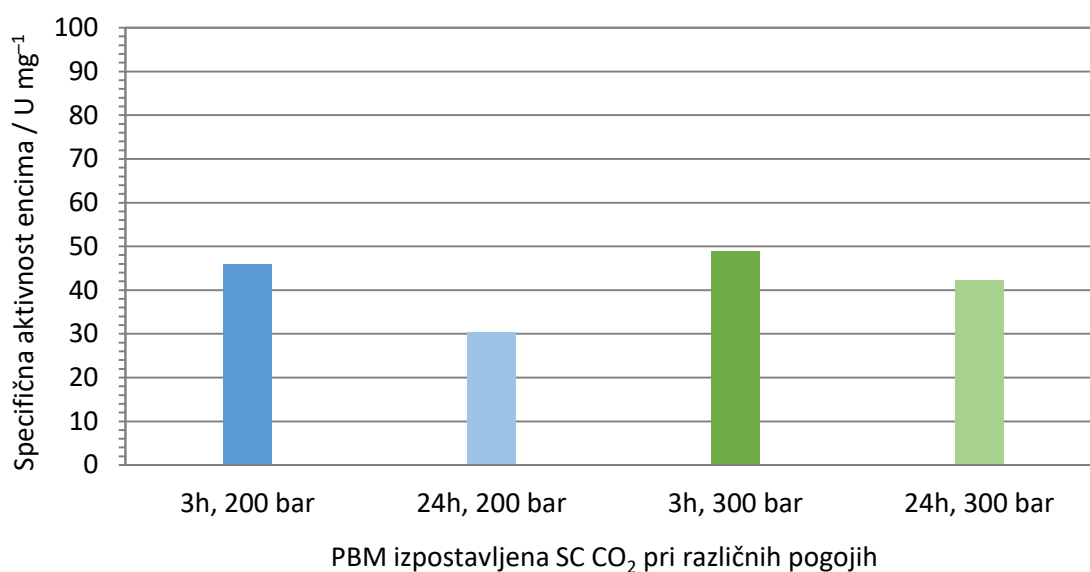
Kot smo pričakovali, je iz rezultatov razvidno, da smo iz moke, ki je bila dlje časa izpostavljena SC CO₂, ekstrahirali več proteinov. To vidimo v višji absorbanca oz. v višji izračunani koncentraciji encimov (slika 11). Iz rezultatov sva ugotovili, da so koncentracije proteinov višje pri izpostavitvi moke SC CO₂ pri nižjih tlakih (200 bar). Pri tlaku 300 bar so koncentracije encimov nižje. Iz meritev lahko ugotovimo, da se koncentracije proteinov niso bistveno spremenile, proteini so v vzorcu moke še zmeraj prisotni, vendar sva z aktivnostnim testom dokazali, da se njihova aktivnost zaradi vpliva SC CO₂ zniža.

Pomembnejša od koncentracije proteinov je aktivnost encima. Za izračun preostale aktivnosti encima polifenol oksidaze sva morali najprej določiti specifično aktivnost encima, ki sva jo izračunali iz razlik absorbanc pri 5 in 0 minutah. Vrednosti so prikazane v preglednici 4 in na sliki 12.

Preglednica 4: Izmerjene absorbance pri aktivnostnem testu pri 0 in 5 minutah ter razlika absorbanc med 5 in 0 minutami za vzorce, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem (časa in tlaka) v primerjavi z vzorcem, ki ni bil izpostavljen.

<i>t</i> in <i>P</i> SC CO ₂	<i>A</i> _{265nm} (0 min)	<i>A</i> _{265 nm} (5 min)	<i>A</i> _{265 nm} (0 min) – <i>A</i> _{265 nm} (5 min)
00h, atm tlak	0,5398	0,5135	0,00526
03h, 200 bar	0,5280	0,5051	0,00458
03h, 300 bar	0,4673	0,4429	0,00488
24h, 200 bar	0,5472	0,5409	0,00126
24h, 300 bar	0,5253	0,5042	0,00422

Na sliki 12 vidimo, da je specifična aktivnost encima polifenol oksidaze najnižja pri vzorcu, ki je bil izpostavljen SC CO₂ 24 ur pri 200 bar, najvišja pa pri izpostavitvi vzorca SC CO₂ 3 ure pri 300 bar. Na splošno je razvidno, da je specifična aktivnost encimov v moki nižja z daljšanjem časa izpostavitve SC CO₂. S poviševanjem tlaka v reaktorju se specifična aktivnost zvišuje. V preglednici 5 so prikazane vrednosti specifične aktivnosti encima (*A*) in preostala aktivnost encima polifenol oksidaze v moki (*A_p*) v odstotkih.



Slika 12: Specifična aktivnost encima v moki po izpostavitvi v SC CO₂ U mg⁻¹.

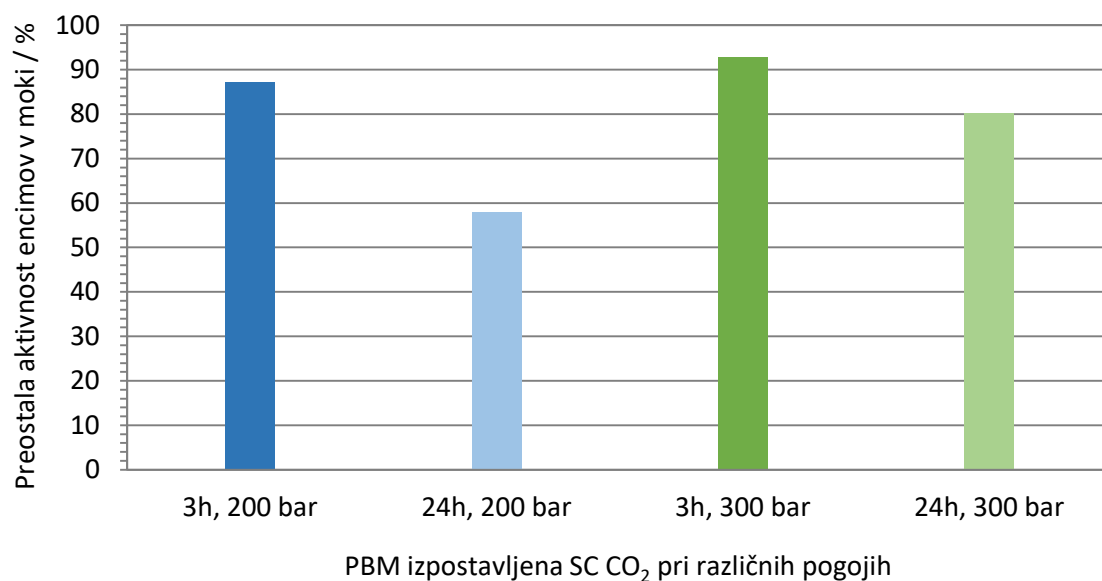
Preglednica 5: Specifična aktivnost encima (A) v U mg⁻¹ in preostala aktivnost encima v moki po izpostavitvi SC CO₂ (A_p) v odstotkih.

<i>t</i> in <i>p</i> SC CO ₂	A U mg ⁻¹	A _p %
00h, Atm. tlak	52,60	100,0
03h, 200 bar	45,80	87,07
24h, 200 bar	30,40	57,79
03h, 300 bar	48,80	92,78
24h, 300 bar	42,20	80,23

Iz slike 13 je razvidno, da je preostala aktivnost encima polifenol oksidaze najnižja pri vzorcu, ki je bil SC CO₂ izpostavljen 24 ur pri 200 bar, najvišja pa pri vzorcu, ki je bil pri 300 bar izpostavljen SC CO₂ 3 ure. To je bilo že razvidno pri določeni specifični aktivnosti encima na sliki 12.

Najugodnejši pogoj za inaktivacijo encima polifenol oksidaze je izpostavitve moke SC CO₂ 24 ur pri tlaku 200 bar. Zakaj se pri 300 bar aktivnost encimov zviša, ni pojasnjeno. Tudi iz znanstvenih raziskav drugih avtorjev je razvidno, da višji tlak včasih vzpodbudi encimsko aktivnost. To so s svojo raziskavo dokazali Terefe in drugi, ki pojasnjujejo, da se aktivnost polifenol oksidaze v borovničevem soku pri izpostavitvi visokemu tlaku ireverzibilno poviša.

Tudi iz naših rezultatov je razvidno, da se pri nižjem tlaku doseže višja inaktivacija encima, kar je iz ekonomskega vidika ugodneje in pomeni nižje proizvodne stroške, v primeru da bi takšno tehnologijo vpeljali v industrijski proces (Terefe, Delon, Buchow in Versteeg, 2015).



Slika 13: Preostala aktivnost encima v moki po izpostavitvi SC CO₂ v %.

4.3 Določevanje deleža vitamina C

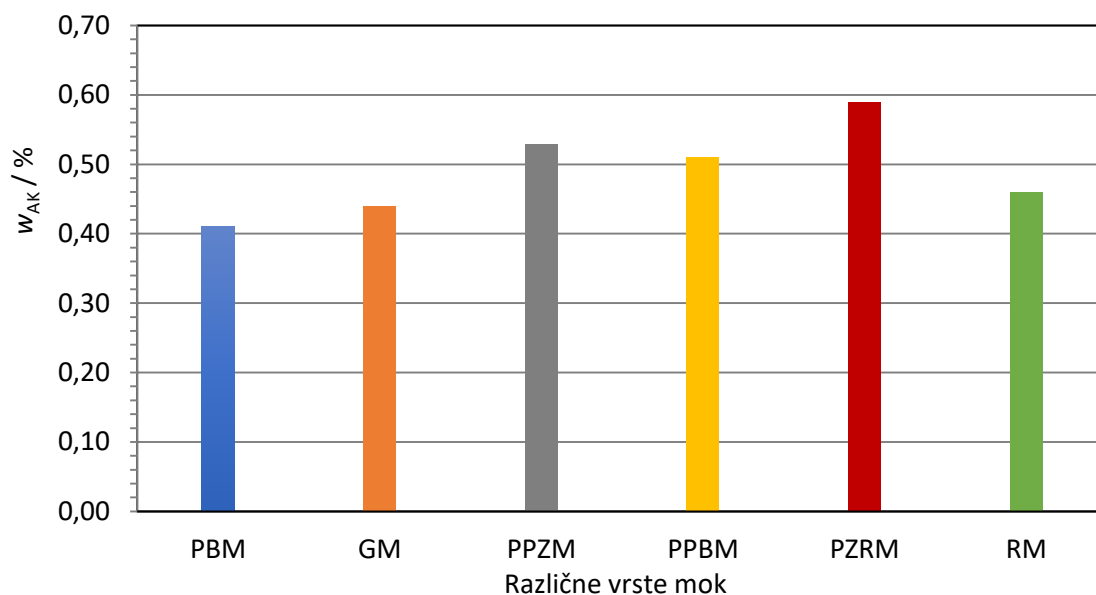
4.3.1 Določevanje deleža vitamina C pred izpostavitvijo SC CO₂

V preglednici 6 so prikazane vrednosti porabljenega titranta – jodovice. S pomočjo teh vrednosti sva izračunali delež vitamina C v odstotkih. Vse meritve sva izvajali paralelno. Nato sva izračunali povprečno vrednost prostornin in v nadaljevanju uporabljali le te. Računali sva po enačbi 4.

Preglednica 6: Masa moke v g, poraba jodovice pri titraciji v mL in izračunan masni delež vitamina C v različnih vrstah moke pred izpostavitvijo SC CO₂.

Vzorec	$m(\text{moke})$ g	$V(I_2)$ mL	W_{AK} %
PBM	0,20	0,93	0,41
GM	0,20	1,00	0,44
PPZM	0,20	1,20	0,53
PPBM	0,20	1,15	0,51
PZRM	0,20	1,33	0,59
RM	0,20	1,05	0,46

S preglednice 6 in slike 14 je razvidno, da je delež vitamina C najvišji pri polnozrnati rženi moki, sledita ji pirina polnozrnata in pšenična polbela moka. Najnižji delež vitamina C pa je pri pšenični beli moki.



Slika 14: Masni delež vitamina C v odstotkih za različne vrste moke.

4.3.2 Določevanje deleža vitamina C po izpostavitvi SC CO₂

V preglednici 7 so prikazane vrednosti porabljenega titranta pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni SC CO₂. S pomočjo teh vrednosti sva izračunali delež vitamina C v odstotkih. Meritve sva izvajali paralelno, izračunali povprečno vrednost prostornin in v nadaljevanju uporabljali te.

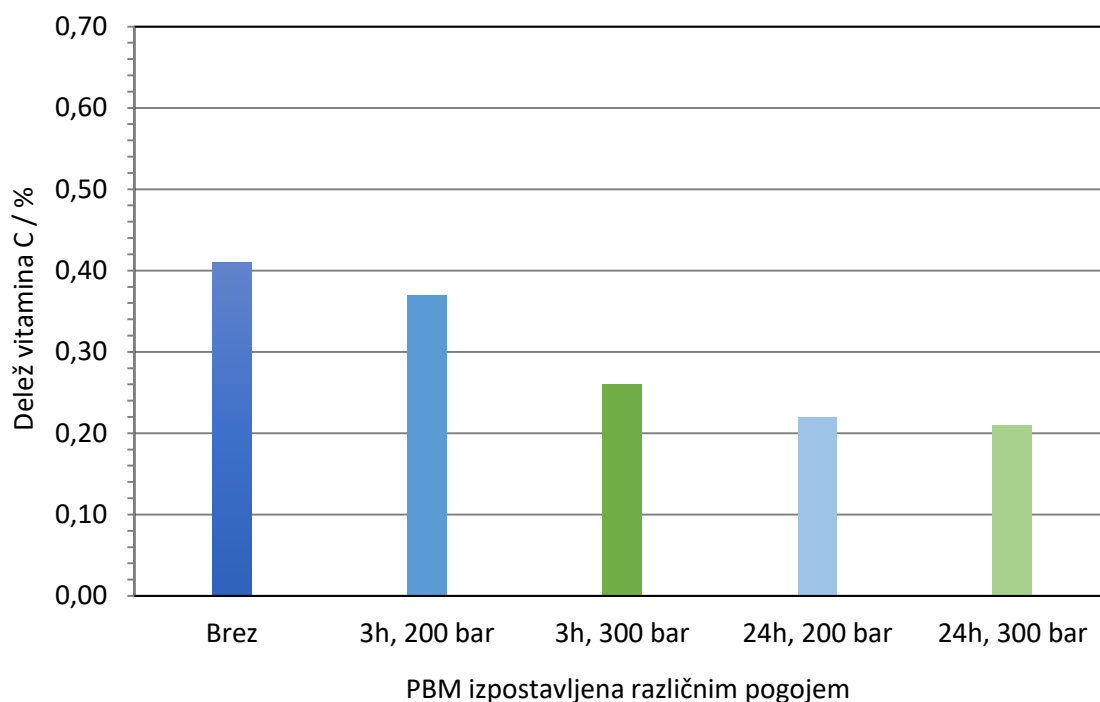
Preglednica 7: Masa moke v g, poraba jodovice pri titraciji v mL in izračunan masni delež vitamina C v PBM po izpostavitvi SC CO₂.

t in P SC CO ₂	$m(\text{moke})$ g	$V(I_2)$ mL	W_{AK} %
00h, Atm. tlak	0,20	0,93	0,41
03h, 200 bar	0,20	0,85	0,37
24h, 200 bar	0,20	0,50	0,22
03h, 300 bar	0,20	0,58	0,26
24h, 300 bar	0,20	0,48	0,21

Primerjali sva deleže vitamina C v vzorcih moke po izpostavitvi SC CO₂ z deleži vitamina C v neobdelani moki. Iz slike 15 je razvidno, da je delež vitamina C nižji pri obdelani moki. Dalj časa kot je vzorec izpostavljen SC CO₂, nižji je delež vitamina C v moki. S poviševanjem tlaka delež vitamina C v vzorcu moke prav tako pada.

Ogljikov dioksid ima močan vpliv na delež vitamina C. Visoke koncentracije CO₂ povzročijo dvig vrednosti pH v reaktorju, kar povzroči hitrejši razpad askorbinske kisline, saj je proces oksidacije askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino odvisen od pH medija (reakcija je počasna v kislem pH, hitra v nevtralnem ter zelo hitra v alkalnem pH).

Povišana koncentracija CO₂ torej vodi v hitrejšo degradacijo askorbinske kisline. To pomeni, da se dobljeni rezultati skladajo z rezultati raziskav iz prebrane literature. Agar in drugi so s svojo raziskavo dokazali, da zvišanje koncentracije CO₂ vodi do znižanja deleža vitamina C v nekaterih vrstah sadja (Agar, Streif in Banger 1997).



Slika 15: Delež vitamina C v moki po izpostavitvi SC CO₂ v %.

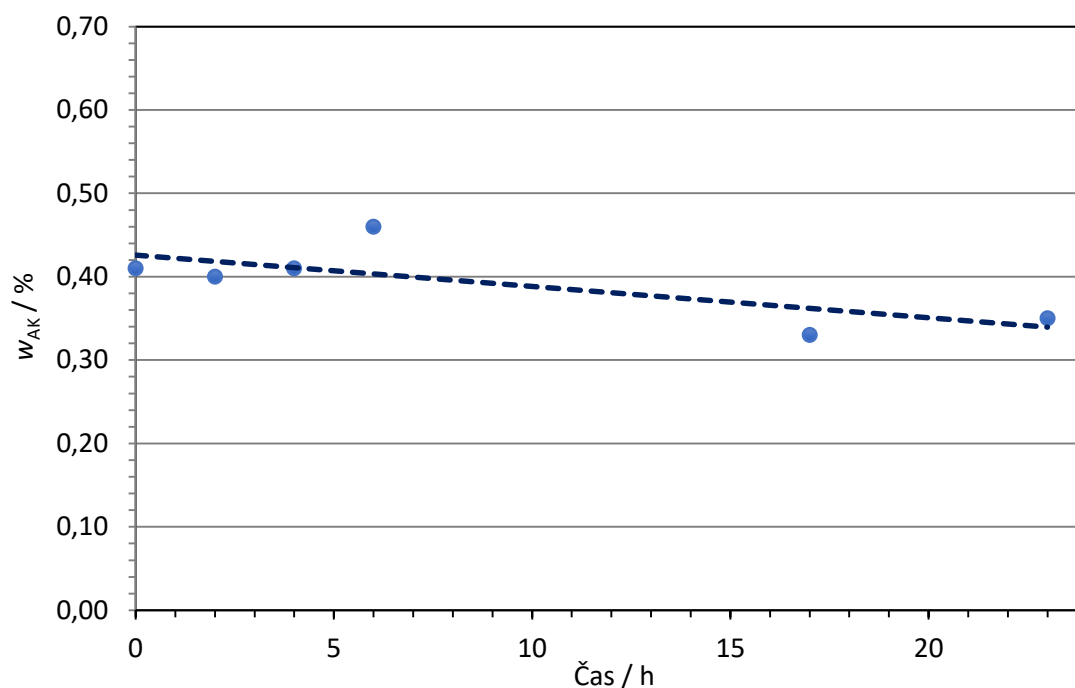
4.3.3 Določevanje deleža vitamina C v različnih časovnih intervalih

V preglednici 8 so prikazane vrednosti porabljenega titranta pri vzorcih, ki niso bili izpostavljeni SC CO₂. S pomočjo teh vrednosti sva izračunali deleže vitamina C v vzorcih moke. Meritve sva izvajali paralelno, izračunali sva povprečno vrednost prostornin in v nadaljevanju uporabljali le te. Vzorce sva pripravili pred titracijo in šele po določenem času določili delež vitamina C v posameznem vzorcu. Nato sva izračunali deleže vitamina C po enačbi 4.

Preglednica 8: Masa moke v g, poraba jodovice pri titraciji v mL in izračunan masni delež vitamina C v PBM glede na čas pred titracijo v %.

<i>t</i> (pred titracijo) h	<i>m</i> (moke) g	<i>V</i> (I ₂) mL	<i>W</i> _{AK} %
0	0,20	0,93	0,41
2	0,20	0,90	0,40
4	0,20	0,93	0,41
6	0,20	1,05	0,46
17	0,20	0,75	0,33
23	0,20	0,80	0,35

Delež vitamina C v odvisnosti od časa pred titracijo lahko vidimo tudi na sliki 16. Viden je trend zniževanja deleža vitamina C v vzorcu moke. V 23 urah se je delež vitamina C znižal za 14,6 %. Dlje kot hranimo v vodi topen vitamin C, več ga razpade.



Slika 16: Masni delež vitamina C v vzorcu PBM glede na čas pred titracijo. S črtkano črto je prikazan trend zniževanja deleža vitamina C v odvisnosti od časa.

Pri titraciji sva opazili večjo napako pri določevanju deleža vitamina C. Vzrok so najverjetneje nizki deleži vitamina C. Pri tako nizkih deležih je težko natančno titrirati, še posebej, ker neraztopljeni del moke moti barvo indikatorja.

Kljub temu lahko opazimo trend zniževanja deleža vitamina C, kar pa je precej pričakovano, saj vemo, da askorbinska kislina na zraku oksidira. Posledično v vzorcu, ki pred titracijo dalj časa stoji, določimo nižji delež vitamina C. Tudi druge raziskave spreminjanja deleža vitamina C v živilih v odvisnosti od časa kažejo na zniževanje deleža vitamina C. Tako so tudi v sadno-žitni rezini ugotovili znižanje deleža vitamina C v 24. urah za 4 % (Žvokelj, 2009). To je precej manj kot v najinem primeru, a je razpad vitamina C v vodnih raztopinah hitrejši.

Kljub ugotovitvi, da je s to metodo težko natančno določiti nizke deleže vitamina C v vzorcu moke, lahko tretirava najine rezultate za primerljive tistim iz literature (Huelin, 1949).

5 ZAKLJUČEK

Moka je živilo, ki ga vsebuje skoraj vsaka jed. Odločili sva se, da ji bova poskusili podaljšati rok uporabnosti, saj se nam tudi v gospodinjstvih včasih zgodi, da moka, ki jo hranimo v naših shrambah, ni več primerna za uporabo. Ta problem je še večji v živilski industriji, kjer moko zaradi neuporabnosti, ki jo povzroči proces rjavenja ob prisotnosti encima polifenol oksidaze, zavržejo v velikih količinah.

Kot je delno navedeno tudi v raziskovalnem vprašanju, sva se odločili moko izpostaviti SC CO₂ in s tem poskusili inaktivirati encim polifenol oksidazo. Rezultati, ki sva jih dobili potrjujejo najino prvo hipotezo in delno ponujajo odgovor tudi na zastavljeno raziskovalno vprašanje.

Ugotovili sva namreč, da s SC CO₂ lahko vplivamo na aktivnost encima polifenol oksidaze. Postopek inaktivacije je potekal v več fazah. Skozi eksperimentalni del naloge sva moko izpostavljali SC CO₂ dalj časa pri visokem tlaku. Izkazalo se je, da inaktivacijo največjega deleža encima (preostala aktivnost encima je 57,79 %) polifenol oksidaze dosežemo z izpostavitvijo vzorca SC CO₂ 24 ur pri 200 bar. Z nadaljnjimi raziskavami na tem področju bi morda lahko dosegli še višjo inaktivacijo encima.

Poleg tega, da sva želeli ugotoviti ali SC CO₂ vpliva na aktivnost encima polifenol oksidaze, sva želeli preveriti, ali vpliva tudi na kakšne druge lastnosti oz. sestavo moke. Tekom eksperimentalnega dela nisva imeli možnosti spremljati vpliva SC CO₂ na celotno sestavo moke, zato sva se odločili, da bova opazovali le vpliv na delež vitamina C. Nekaterim vrstam moke vitamin C dodajo že pri procesu mletja z namenom, da prepreči oksidacijske procese in kot dodatek vpliva na obstojnost moke. Zato sva se odločili, da bova spremljali delež vitamina C v neobdelani moki in v moki obdelani s SC CO₂.

Ugotovili sva, da SC CO₂ vpliva na delež vitamina C v vzorcu moke, ki pa je že v osnovi zelo nizek. S tem sva potrdili tudi najino drugo hipotezo. Najvišji delež vitamina C sva določili v pirini polnozrnatih moki in sicer 0,59 %. V pšenični beli moki, ki sva jo uporabljali večji del raziskovalnega dela, pa sva izmerili najnižji delež vitamina C in sicer samo 0,41 %. Po izpostavitvi pšenične bele moke SC CO₂ je imel vzorec izpostavljen 24 ur pri 300 bar najnižji delež vitamina C.

Načrtovano delo sva uspešno opravili, saj sva uspeli delno inaktivirati encim polifenol oksidazo in s tem preprečiti nadaljnje reakcije encima polifenol oksidaze v moki. Prišli sva do zaključka, da se možnost oksidacije moke, obdelane na tak način, zniža. Nalogo sva uspešno zaključili in potrdili obe zastavljeni hipotezi.

6 LITERATURA

6.1 Monografije

- Carreira, R. L., Silva, M. R., Starling, A. L. P. in Silvestre, M. (2008). *Association of Two Enzymes for Obtaining Low Phenylalanine Protein Hydrolysates from Wheat Flour*. International Journal of Food Engineering.
- Erjavec, A. (2007) *Vloga polifenol-oksidadze, peroksidaz in fenilalanin-deminaze pri porjavenju krompirja: Diplomsko delo*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo.
- Fajs, M. (2006). *Uporaba emulgatorjev na osnovi monogliceridov v pekarstvu : diplomsko delo, univerzitetni študij = Use of emulsifier monoglycerides in breadmaking : graduation thesis, university studies*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.
- Gselman, D. (2012). *Vpliv superkritičnega ogljikovega dioksida na aktivnost zamreženih encimskih agregatov (CLEAs) iz celuloze : Diplomsko delo*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor.
- Knez, Ž. in Škerget, M. (2009). *Termodifuzijski separacijski procesi: zbrano gradivo*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor.
- Krajnc, I. (1953). *Žito in moka*. Ljubljana: Založba Kmečka knjiga.
- Krečič Stres, H. (2008). *Osnove živilske kemije*. Ljubljana: Zavod IRC.
- Prša, L. (2019). *Inaktivacija encimov v živilih : diplomsko delo visokošolskega strokovnega študijskega programa I. stopnje*. Maribor.
- Salvador, A. in Chisvert, A. (2017). *Analysis of Cosmetic Products 2nd Edition Elsevier Science*.
- Stušek, P. (2006). *Biologija človeka za gimnazije*. Ljubljana: DZS
- Šešek, F. (1975). *Blagoznanstvo s tehnologijo za kadre v blagovnem prometu*. Ljubljana: Državna založba Slovenije.
- Šimunid, N. (2010). *Aktivnost polifenol oksidadze u ekstraktima brašna od cjelovitog zrna različitih sorti pšenice : Diplomski rad*. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Katedra za biokemiju i toksikologiju
- Tašner, L. in Komerički J. (2007). *Tehnologija predelave žit. 1. in 2. del – študijsko gradivo za 2. letnik*. Maribor: Živilska šola Maribor, Višja strokovna šola.
- Voet, J. D., Voet, G. J., Pratt, W. C. (2008). *Principles of biochemistry, International student version 3rd Edition*. Wiley
- Žvokelj, M. (2009). *Obstojnost vitaminov in skupni antioksidativni potencial v sadno žitni rezini: Diplomsko delo*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

6.2 Članki

- Agar, I. T, Streif, J. in Banger, F. (1997). *Effect of high CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits*. Postharvest Biology and Tehnology. Elsener science, 11. 47-55.
- Arrigoni, O. in De Tullio, M.C. (2002). *Ascorbic acid: much more than just an antioxidant*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1569(1), 1-9.

- Grosch, W. in Wieser, H. (1999). *Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid*. Journal of Cereal Science, 29(1), 1-16.
- Hind, G., Marshak, D. R., Coughlan, S. J. (1995). *Spinach Thylakoid Polyphenol Oxidase: Cloning, Characterization, and Relation to a Putative Protein Kinase*. Biochemistry, 34, 8157-8164.
- Huelin F. E. (1949). *Investigations on the stability and determination of dehydroascorbic acid*. Division of Food Preservation and Transport, C.S.I.R.O. 346-354.
- Iqbal A., Murtazaa A., Hua W., Ahmada I., Aafaque A., Xua X. (2019). *Activation and inactivation mechanisms of polyphenol oxidase during thermal and non-thermal methods of food processing*. Food and Bioprocess Technology, 11, 170-182.
- Kahn, V. (1975). *Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 26, 1319-1324.
- Kumar, V., Gill, K. D. (2018). *To Estimate the Amount of Total Protein and Albumin in Serum and to Find A/G Ratio*. Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide, 43-48.
- Martinez M. V., Whitaker R. J., (1995). *The biochemistry and control of enzymatic browning*. Trends in Food Science & Technology, 6, 195-200.
- Shibuya, N. and Iwasaki, T. (1982). *Effect of the Enzymatic Removal of Endosperm Cell Wall on the Gelatinization Properties of Aged and Unaged Rice Flours*. Kannon-dai.
- Terefe, S. N., Delon, A., Buchow, R. in Versteeg, C. (2015). *Blueberry polyphenol oxidase: Characterization and the kinetics of thermal and high pressure activation and inactivation*. Food Chemistry. Elsevier Science, 188, 193-200.
- Tunay, D., Füsün, Y. M., Cem, H. A. in Kincal, N. S. (2002). *Wet separation of wheat flours into starch and gluten fractions: the combined effects of water to flour ratio–dough maturation time and the effects of flour aging and ascorbic acid addition*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82, 9.

6.3 Internetni viri

- Bio pšenična polnozrnata moka. (b. d.). Na [natura.zito.si](https://natura.zito.si/bio-psenicna-polnozrnata-moka/). Pridobljeno 5.2. 2020 s
- Ekstrakcija. (2019). Na [fran.si](https://fran.si/iskanje?View=1&Query=ekstrakcija&hs=1). Pridobljeno 26. 2. 2020 s
- Enzyme. (2019). Na [britannica.com](https://www.britannica.com/science/enzyme). Pridobljeno 15. 2. 2020 s
- Flour. (2020). Na [en.wikipedia.org](https://en.wikipedia.org/wiki/Flour). Pridobljeno 9.2. 2020 s
- Lastnosti moke. (b.d.). Na [mojirecepti.com](https://www.mojirecepti.com/zita/moka/). Pridobljeno 9.2. 2020 s
- Miguel, Â. S. M., Martins-Meyer, T. S., Veríssimo da Costa Figueiredo, É., Lobo, B. W. P., Dellamora-Ortiz G. M. (2013). *Enzymes in Bakery: Current and Future Trends*. Pridobljeno 16.2.2020 s
- Newman, T. (2017). *Enzymes: How they work and what they do*. Pridobljeno 12. 2. 2020 s
- Pšenične moke. (b.d.). Na [mlinotest.si](https://www.mlinotest.si/izdelki/mlinotest/moke-zdrobi-in-kase/psenicne-moke/). Pridobljeno 3.2. 2020 s

Šumer, A. (b. d.). *Pečemo z Anito Šumer*. Pridobljeno 5.2. 2020 s
<https://odprtakuhinja.delo.si/kroznik/pecemo-z-anito-sumer-vodnik-po-razlicnih-tipih-mok/>

Vse o mokah. (2010). Na *lifestyle.ena.com*. Pridobljeno 3.2. 2020 s
<http://lifestyle.ena.com/kulinarika/vse-o-mokah.html>