

Agrovoc descriptors: grain legumes, plant extracts, amylases, enzyme inhibitors, enzymic activity, extraction, phaseolus vulgaris, kidney beans, flours, noncereal flours, organoleptic properties, bread

Agris category code: q04, f60

Inhibicija amilolitične aktivnosti mok z neoptimalnim padajočim številom

Boris KOVAČ¹

Delo je prispelo 3. aprila 2011; sprejeto 3. maja 2011.

Received April 3, 2011; accepted May 3, 2011.

IZVLEČEK

Študija proučuje vpliv dodatka ekstrakta nekaterih stročnic, ki naj bi vsebovale inhibitorje amilaz, na amilolitično aktivnost mok z nizkim padajočim številom (FN). Aktivnost amilaz je bila spremljana posredno z metodo določanja padajočega števila. Ugotovljen je bil optimalni čas vodne ekstrakcije. Raziskava je pokazala pozitivno povezavo dodatka moke stročnic z dvigom FN pšeničnih mok. Prikazane so povezave med različnimi koncentracijami ekstrakta in spremembo FN. Največji učinek je bil ugotovljen pri sorti fižola Top Crop. Opravljena je bila peka kruha z dodatki različnih koncentracij moke fižola z največjim vplivom na padajoče število. Učinek dodatka moke fižola se je izrazil v manjšem volumnu pečenega kruha. Spremembe organoleptičnih lastnosti ni bilo zaznati pri 5 % dodatka, pri kruhah z dodatkom nad 2,5 odstotka je bilo zaznati daljšo svežino sredice.

Gljučne besede: inhibitorji amilaz, fižol, padajoče število

ABSTRACT

AMYLOLYTIC ACTIVITY INHIBITION OF FLOURS WITH UNOPTIMAL FALLING NUMBER

The aim of this research was to discover the influence of supplementing pulses extract containing amylase inhibitors, on amylolytic activity of flour with low falling number. The amylase activity in flour was indirectly scanned with the falling number (FN) method. The optimal time of aqueous extraction was established. The research showed a positive correlation between pulses flour supplement and the rise of FN of wheat flour. Correlations between different concentrations of extract and change of FN are presented. The biggest effect on the FN was established with Top Crop beans. Bread-baking tests with different concentrations of bean flour that had the most pronounced effect of FN were made. The result of adding bean flour was a smaller volume of the bread. When adding 5% or less of bean flour, organoleptic characteristics did not change. The freshness of interior of the bread proved to be longer with breads containing more than 2.5% of the supplement.

Key words: amylase inhibitors, bean, falling number

1 UVOD

Na kvaliteto pšeničnega zrnja in posledično moke odločilno vplivajo vremenske razmere v sklepnem obdobju dozorevanja. Padavine z vmesnimi vročimi obdobji lahko povzročijo pričetek biokemijskih procesov, značilnih za kalitev zrnja. Spremembe je mogoče zaznati v sestavi in sicer v ključnih kvalitativnih parametrih, pomembnih za peko kruha. Pecilne lastnosti takih mok se lahko drastično poslabšajo. Razlog je v encimatski aktivnosti, zlasti beta-amilazni, ki ima za posledico razgrajevanje za peko pomembnih

makromolekul škroba. Na aktivnost amilaz bi lahko vplivala tudi morebitna kontaminacija in rast gliv v deževnem obdobju (Kovač, 2010). Amilazno encimsko aktivnost ugotavljamo s pomočjo analize padajočega števila, ekvivalenten angleški izraz je falling number (FN) (Apling, 1993). Vrednost FN je obratno sorazmerna z aktivnostjo amilaz. Optimalne pecilne lastnosti lahko pričakujemo pri mokah, ki izkazujejo zmerno amilolitično aktivnost in se vrednost padajočega števila giblje med 220 in 250 enotami (Edwards, 2007).

¹ Doc., dr., Mlinotest d.d. Ajdovščina, Oddelek za raziskave in razvoj, Tovarniška 14, SI-5270 Ajdovščina, Slovenija, e-pošta: boris.kovac1@siol.net

Moke z nizkimi vrednostmi padajočega števila, to je med 180 in 220 enot, so encimsko zelo aktivne in imajo preveč prostih sladkorjev. Zaradi povečane proteolitične aktivnosti, so lahko delno razgrajene tudi beljakovine. V kalečih žitih se namreč poleg amilolitične poveča tudi proteolitična aktivnost (Goesaert in sod., 2005). Kruh pečen iz take moke ima zaradi razgrajenih beljakovin lepka slabši volumen in packavo sredico. Pecilna vrednost moke z izrazito nizkim padajočim številom je lahko vprašljiva tudi zaradi preveč razgrajenih beljakovin. Visoka amilolitična aktivnost je torej lahko tudi indikator za razgrajene beljakovine (Lai in Lin, 2006). Pšenice in moke z vrednostjo padajočega števila, ki je manjša od 180, so v pekarstvu neuporabne. Take pšenice so primerne za animalno prehrano.

Pšenica ima lahko tudi prenizko amilolitično aktivnost, ki se kaže v visokem padajočem številu. Pecilne vrednosti takih mok lahko izboljšamo z dodatkom encimov amilaz v obliki sladne moke. Uporabljajo se tudi industrijsko pripravljeni dodatki, ki vsebujejo amilaze plesni in bakterij (Kovač in Raspor, 1994, Kovač, 2008). Mlinska industrija se zlasti ob slabih letinah sprašuje, kako bi moke z neoptimalnim padajočim številom, a še sprejemljivimi reološkimi lastnostmi uporabila. Pogoj je kvantitativno in kvalitativno ugodna vrednost lepka, torej nerazgrajenost beljakovin (Giorilli in Lauri, 2000). Neoptimalne moke bi bilo mogoče uporabiti v pekarstvu, če bi uspeli aktivnost amilaz zmanjšati z inhibitorji, literarnih podatkov, kako to doseči ni na voljo. Nasprotno, veliko virov navaja in raziskuje inhibitorje α -amilaz v povezavi z inhibiranjem amilaz slin in trebušne slinavke s ciljem manjše izkoristljivosti škroba (Harry, 2009).

Semena in posledično moke stročnic vsebujejo inhibitorje amilaz (Grant in sod., 1995), ki vplivajo na zmanjšano delovanje le-teh. Inhibitorji amilaz so relativno termostabilne beljakovine, ki imajo inhibitorski učinek na amilaze trebušne slinavke in jih najdemo v vodnih ekstraktih stročnic, pšenice in rži. Zaradi visoke termostabilnosti je inhibitorska aktivnost mogoče zaznati tudi v pripravljenih živilih. Inhibitor amilaz postane

aktiven šele po predhodni inkubaciji z encimom. Inhibitorji amilaz delujejo inhibitorsko na amilaze slin in trebušne slinavke *in vitro* in *in vivo*. Povprečne količine inhibitorjev, ki jih zaužijemo s hrano so v primerjavi z izločenimi amilazami v prebavnem traktu premajhne za evidenten učinek. V sodobni farmaciji in prehrani se že uporabljajo tudi kot sredstva za uravnavanje prekomerne telesne teže in v zdravilih za bolnike s sladkorno boleznijo, iščejo se novi naravni inhibitorji različnih izvorov (Subramanian in sod., 2008). Prisotni so v različnih vrstah stročnic, v kidney fižolu jih najdemo v znatnih količinah, v grahu in leči jih je manj (Dilis in Trichopoulou, 2009). Inhibitorje amilaz najdemo tudi v ajdi (Ikeda in sod., 2004).

Na amilolitično aktivnost mok bi lahko vplivali z dodajanjem različnih kovinskih ionov (Umar Dahota in sod., 2004). Problematike mok z nizkim padajočim številom se loteva tudi Rudolf, (2009); v praktičnem delu diplomske naloge ugotavlja vpliv inhibitorjev amilaz nekaterih stročnic, zelenega boba, zelenega stročjega fižola, boba, fižola češnjevca, belega fižola in rdečega »kidney« fižola ter graha na moko z nizkim padajočim številom. V poskusih ugotovi, da ima med testiranimi vzorci največji inhibitorski učinek na delovanje amilaz rdeč fižol. Rezultati so pokazali, da je koncentracija inhibitorjev višja v vzorcih zrelih semen stročnic kot pa v njihovih nezrelih plodovih. Natančnega podatka o uporabljenih sortah stročnic v omenjenem delu ni. Dejstvo, da je bila najmočnejša inhibicija dosežena s fižolom, je izhodišče za to študijo.

Namen raziskave je ugotoviti učinek petih sort fižola na vrednost padajočega števila moke, ki je glede na amilazno aktivnost neoptimalna za peko. Ugotavljane so bile spremembe vrednosti FN kot posledica dodatka vodnega ekstrakta stročnice. V nadaljevanju raziskave so bili testirani vplivi dodatka na kakovost kruha, pripravljenega iz mok z nižjim FN od optimalnega. Spremljan je bil učinek na organoleptične lastnosti in volumen pečenega kruha.

2 MATERIALI IN METODE

Iz kakovostno neoptimalnih pšenice letine 2010, po poreklu iz Slovenije in Madžarske, so bile na laboratorijskem mlinu zmlete polnozrnatke moke. Z mešanjem mok so bili pripravljeni vzorci s padajočim številom 160, 180, 206, 225 in 235. Določanje amilolitične aktivnosti in inhibitorskega učinka dodatka vodnega ekstrakta testiranih stročnic je potekalo z napravo »Falling Number« po standizirani metodi ICC 107/1 (AACC 56-81B, ISO/DIS 3093). Metoda je zasnovana na hitri zaklejitvi škroba iz suspenzije moke ter merjenju razgradnje škroba z amilazami. Ta se odraža v zmanjšanju

viskoznosti suspenzije, ki je v korelaciji s časom padanja mešala viskozimetra med dvema točkama.

V testih so bile uporabljene naslednje sorte fižola:

- Starozagorski, Semenarna Ljubljana, lot 1A0016, 15. 10. 2012,
- Anellino verde, Semenarna Ljubljana, lot N24/850-ML, 15. 10. 2011,
- Bergold, Semenarna Ljubljana, lot D:02298/112-0C, 15. 10. 2012,

- Top Crop, Semenarn, Ljubljana, lot 0608/150-0c, 15. 10. 2012,
- Češnjevec, Hrib d.o.o., lot 180810, 16. 08. 2011.

Vzorci so bili zmleti na laboratorijskem mlinu Perten Laboratory Mill 3100. Ekstrakti so bili pridobljeni s suspendiranjem mletih vzorcev v destilirani vodi 60 minut z mešanjem na magnetnem mešalu pri temperaturi 30 stopinj C. Postopek priprave kruha je potekal na aparatu za hitro pripravo kruha po naslednjem hodogramu: mesenje testa pri počasni hitrosti 5 min, mesenje testa pri hitri hitrosti 15 min, počivanje testa 10 min, mesenje 2 minuti, vzhajanje 45 minut in peka pri avtomatski nastavljeni temperaturi. Receptura testa

za pšenični kruh je bila naslednja: 500 g moke s testiranim padajočim številom, proizvajalec Mlinotest d.d. lot 15. 3. 2012, 270 ml vode, 7 g soli, 15 g kvasa, proizvajalec Kvasac d.d. Zagreb, lot 30. 4. 2011. Beli pšenični kruh z 1, 2,5, 5, in 10% fižolove moke, je imel za dodani odstotek fižola zmanjšano količino pšenične moke.

Volumen je bil določen šest ur po peki kruha. Določanje volumna je bilo izvedeno z merjenjem volumna izpodrinjene tekočine po potopitvi. Kruh se je organoleptično ocenilo 24 in 48 ur ter 7 dni po peki. Kruh je bil hranjen v PE/PP vrečki za pakiranje kruha s perforacijo 100 luknjic/kvadratni decimeter.

3 REZULTATI

V prvem testu je bila proučevana sprememba padajočega števila preiskovanega vzorca polnozrnat moke s padajočim številom 206 ob dodatku vodnega ekstrakta različnih stročnic. Koncentracija fižola v

vodnem ekstraktu je bila uravnana tako, da je bil dodatek med 1-15 % moke fižola/na testirano količino moke. Rezultati so podani v preglednici 1.

Preglednica 1: Odvisnost spremembe FN od koncentracije dodatka ekstrakta različnih mok stročnic.

Table 1: Correlation between variation of FN and concentration of the extract of different types of pulses flour supplement.

vrsta fižola/ bean types	padajoče število/Falling Number					
	% dodatka fižola /bean supplement					
	0	1	2,5	5	10	15
Starozagorski	206	206	210	115	220	220
Anellino verde	206	202	210	217	223	225
Bergold	206	204	208	210	230	227
Top Crop	206	204	212	216	235	235
Češnjevec	206	205	208	213	210	215

Iz preglednice je razvidno, da so vsi vzorci izkazovali dvig FN testirane moke z začetno vrednostjo 206 enot. Pri nekaterih meritvah je bilo pri 1% dodatku zaznati rahel padec FN, razlog bi lahko bil v interakciji med sestavinami filtrata, ki je vseboval ekstrakt fižola s sestavinami moke. Porast FN se stabilizira pri

povprečno 10 % dodatka. Največja inhibicija amilaz, torej porast FN, je zaznati pri sorti Top Crop, ekstrakt te sorte je bil uporabljen v nadaljnjih poskusih. Testiran je bil učinek 10% dodatka na inhibicijo, če je začetni FN moke variabilen. Rezultati so prikazani v Preglednici 2.

Preglednica 2: Odvisnost spremembe FN ob 10 % dodatku ekstrakta sorte Top Crop glede na začetno vrednost FN.

Table 2: Correlation between variation of FN when adding 10% Top Crop extract and initial FN value of the tested flour.

Padajoče število/Falling number		
začetna vrednost /initial value	z dodatkom/ with supplement	sprememba/change
160	190	30
180	205	25
206	236	30
225	259	34
233	258	35

Iz rezultatov je razvidno, da je pri mokah z višjo začetno vrednostjo ob dodatku 10% ekstrakta vrste Top Crop sprememba padajočega števila večja. Za optimalne lastnosti pečenega kruha vrednost padajočega števila naj ne bi bila manjša od 235. Glede na rezultate bi lahko sklepali, da padajoče število najslabše moke, ki bi lahko še izboljšali z dodatkom, ne sme znašati manj kot 200 enot. Moko s tako vrednostjo smo tudi pripravili in spekli kruh v modelih v obliki štručk. Pečenim

izdelkom je bil določen volumen, višina štručke, ocenjeni so bili morebitni priokus po stročnicah. Rezultati meritev volumna in višine kruhov z vsebnostjo moke fižola Top Crop so podani v preglednici 3. Kruhi iz moke s FN 206 so bili spečeni z 1, 2,5, 5 in 10% dodatkom fižolove moke. Kontrolni kruh je bil pečen samo iz pšenične moke. Pri zamesu testa z 5 in 10% fižolove moke je bilo potrebno korigirati dodatek vode za 20 in 40ml vode zaradi izrazito suhega testa.

Preglednica 3: Volumen in višina kruhov iz moke s FN vrednostjo 206 v odvisnosti od dodatka fižolove moke.

Table 3: Volume and height of bread made of flour with 206 FN value in correlation with bean flour supplement.

dodatek/supplement (%)	volumen (ml)/volume (ml)	višina/height (cm)
0	2500	11,7
1	2340	10,1
2,5	2270	11
5	2200	10,3
10	2105	10,2

Z namenom ugotoviti morebitne stranske učinke dodatkov fižolove moke smo spekli tudi kruh iz moke z

optimalno vrednostjo padajočega števila. Rezultati so podani v preglednici 4.

Preglednica 4: Volumen in višina kruhov iz moke s FN vrednostjo 250 v odvisnosti od dodatka fižolove moke.

Table 4: Volume and height of bread made of flour with 250 FN value in correlation with bean flour supplement.

dodatek/supplement (%)	Volumen (ml)/ volume (ml)	višina/height (cm)
0	2700	12,4
1	2640	12,0
2,5	2502	11,5
5	2340	10,7
10	2300	10,5

Iz rezultatov v preglednicah 3 in 4 ugotovimo, da ima dodatek fižola negativen vpliv na volumen kruha. Podoben učinek zasledimo pri obeh testiranih mokah, volumen je slabši pri moki z nižjim padajočim številom. Zmanjšanje volumna je v korelaciji z količino dodatka fižolove moke. Vzrokov za nižji volumen bi lahko bilo več. Delno je za padec volumna krivo dejstvo, da je v kruhah z deležem fižolove moke manj pšenične moke in s tem lepka, ki omogoča večji volumen. Delno bi lahko pripomoglo k zmanjšanju volumna več vezane vode pri zamesu testa. Zmanjšanje volumna je preveliko, da bi ga lahko pripisali samo slednjima dejstvom. Mogoča je razlaga, da komponente fižolove moke lahko negativno vplivajo na kvasovke in zavirajo njihovo delovanje. Pričakovani rezultat je bil namreč drugačen, dvig FN z dodatkom moke fižola naj bi tudi vplival na povečanje volumna kruhov.

Kruhi iz moke s FN 206 z dodatkom fižola niso imeli vidnih napak. Pri kontrolnem kruhu, pripravljenemu iz same pšenične moke pa je bilo na dotik čutiti, da je sredica malenkost lepljiva. To je potrdil tudi organoleptični test, predvsem teksture in občutka v ustih. Razlika je bila očitna ob vzporednem poskušanju kruha iz optimalne moke. Lepljivost je pričakovana napaka kruha, ki je spečen iz moke s prenizkim padajočim številom. Kruhi s fižolovo moko pa so bili za razliko od zgoraj omenjenega tudi po teksturi brez napak.

Kruhi iz moke s FN 250 niso imeli vidnih napak, njihova sredica pa prav tako ni bila packasta ne na otip in na občutek v ustih. Kruhi so bili brez napak verjetno tudi zato, ker je bil FN moke optimalne vrednosti za peko. Kruhi z dodatkom fižolove moke so bili bolj sveži, potreba po večjem dodatku vode se je pokazala že

pri zamesu testa. Večji vezavi vode gre pripisati tudi boljše svežino kruha.

Poleg packavosti, ki je služila kot test za preverjanje prenizke vrednosti FN, je bilo pri vseh kruhah, v katerih je bil delež moke fižola, zanimivo to, da so bili celo po 5 dneh hrambe v perforiranih plastičnih vrečkah na sobni temperaturi skoraj povsem sveži. Medtem pa je bil kruh, pečen samo iz pšenične moke skoraj povsem izsušen in trd. Vsekakor dodatek fižolove moke prispeva k svežini kruha, saj je fižol sposoben vezati več vode kot pa sama pšenična moka. V majhni koncentraciji dodatka, to je do 5 %, ni bilo zaznati priokusa fižola.

Glede na rezultate raziskave lahko zaključimo, da so v testiranih sortah prisotni inhibitorji amilaz, to dokazujejo porasti FN moke ob dodatku vodnega

ekstrakta fižola. Rešitev izboljšanja FN slabših mok z dodatkom moke fižola je vsekakor zanimiva, je pa res, da je odprtih še nekaj vprašanj, da bi lahko ta način prenesli v prakso. Ob dvigu padajočega števila moke s pomočjo inhibitorja amilaz ne smemo pozabiti na to, da ima moka z nizkim FN tudi druge slabše lastnosti, ki prav tako pomembno vplivajo na končen rezultat in z njim na izdelek. Pri peki kruha z dodano moko fižola je bila ugotovljena negativna korelacija z volumnom kruha. Razlog za manjši volumen bi lahko bil v inhibiciji kvasovk, kar bi pa vsekakor morali še potrditi. Kompleksnost problema ne onemogoča enostavne uporabe izsledkov raziskave v praksi. Volumen kruha je vsekakor za potrošnika zelo pomembna lastnost. Kljub vsemu pa so rezultati raziskave kot taki lahko tudi tržno zanimivi, kruhi z dodatki fižola so imeli v primerjavi z običajnimi kruhi izrazito daljšo svežino.

4 VIRI

- Apling, E. C. 1993. Breadmaking processes. V: Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Vol. 1. Macrae R., R. K. Robinson, M. J. Sadler ur. London: Academic Press, 457-467.
- Dilis, V., Trichopoulou, A. 2009. Nutritional and health properties of pulses. Review. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism, 1(3):149-157.
- Edwards, W. P. 2009. The Science of Bakery Products. W. P. Edwards ur. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 259 s.
- Giorilli, P., Lauri, S. 2000. Il pane. Un'arte, una tecnologia. Lucisano F. ur. Zanichelli, Milano, 251 s.
- Grant, G., Edwards, J. E., Pusztai, A. 1995. α -Amylase inhibitor levels in seeds generally available in Europe. Journal of the Science of Food and Agriculture, 67: 235-238.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., Delcour J. A. 2005. Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. Trends Food Science and Technology, 16: 12-30.
- Harry, G. Preuss. 2009. Bean amylase inhibitor and other carbohydrate absorption blockers: effects on diabetes and general health. Journal of the American College of Nutrition, 28 (3): 266-276.
- Ikedo, K., Shida K., Kishida, M. 1994. α -Amylase inhibitor in buckwheat seed. Fagopyrum, 14: 3-6.
- Kovač, B. 2009. Kemijska tveganja izdelkov iz žit: ostanki fitofarmaceutskih sredstev in mikotoksini. V: MAČEK, Jože ur. Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Nova Gorica, 4.-5. marec 2009. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 25-30.
- Kovač, B., Raspor, P. 1994. Zmanjšana uporaba aditivov v pekarstvu = Reduced additives in breadmaking technology. V: RASPOR, Peter ur. Aditivi: dodatki - tehnologija - zdravje : zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevo in 1. simpozija živilcev, Bled, Slovenija, 9. in 10. junij 1994 Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 47-56.
- Kovač, B. 2008. Emulgatorji, encimi, konzervansi. Mlinarstvo in pekarstvo, 9 (53): 12-14.
- Lai, H. M., Lin, T. C. 2006. Bakery products. V: Handbook of Food Science, Technology, and Engineering. Vol. 4. Hui Y. H. ur. Boca Raton, London, New York, Taylor & Francis Group, 44-48.
- Rudolf, S. 2009. Inhibicija amilaz moke z dodatkom moke stročnic. Diplomski naloga v višješolskem strokovnem izobraževalnem programu. BIC Ljubljana, Ljubljana. 55 s.
- Subramanian, R., Asmawi M., Sadikun, A. 2008. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. Acta Biochimica Polonica, 55 (2): 391-398.
- Umar Dahota, M., Saboury, A. A. Moosavi-Movahedib, A. A. 2004. Inhibition of P-amylase activity by calcium, magnesium and zinc ions determined by spectrophotometry and isothermal titration calorimetry. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19 (2): 157-160.