Primjena smrznutog ječmenog kiselog tijesta u proizvodnji kruha

Šicel, Tanita

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:465049

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Tanita Šicel
632/PI

Primjena smrznutog ječmenog kiselog tijesta u proizvodnji kruha

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Dubravke Novotni te uz pomoć doc. dr. sc. Nikoline Čukelj i Lidije Drobac, bacc. ing. agr. tehničke suradnice.

ZAHVALA

Hvala mentorici doc. dr. sc. Dubravka Novotni, te doc. dr. sc. Nikolina Čukelj i Lidija Drobac, bacc. ing. agr. na vremenu koje su izdvojili za provedbu eksperimentalnog dijela mojeg diplomskog rada. Osim na dobrim uvjetima rada, zahvalna sam i na strpljenju, susretljivosti, razmijevanju, stručnoj pomoći i ljubaznosti. Hvala obitelji na podršci tijekom svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju u tehnologiju žitarica
Znanstveno podrucje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA SMRZNUTOG JEČMENOG KISELOG TIJESTA U PROIZVODNJI KRUHA

Tanita Šicel, 632/PI

Sažetak: Cilj ovog rada je bio odrediti optimalni udio smrznuto skladištenog ječmenog kiselog tijesta u miješanom kruhu i ispitati utjecaj vremena skladištenja smrznutog kiselog tijesta na kvalitetu kruha. Kiselo tijesto je fermentirano s inokulumom bakterije mliječne kiseline *Weissella cibaria* i dodano je u krušno tijesto u količini od 10, 20 i 30%. Na temelju kiselog analiza tijesta, krušnog tijesta i kruha određeno je da je optimalni udio kiselog tijesta u kruhu 20%. Kiselo tijesto je skladišteno zamrznuto 4, 8 ili 12 tjedana. Tijekom skladištenja broj živih stanica se u tijestu značajno smanjivao s vremenom, titracijska kiselost je rasla, no vrijeme skladištenja nije negativno utjecalo na fermentacijsku sposobnost krušnog tijesta i nije bilo značajne razlike u kvaliteti kruha u odnosu na kruh sa svježim kiselim tijestom. Rezultati ovog rada pokazuju mogućnost industrijske primjene smrznutog kiselog tijesta za poboljšanje kvalitete miješanog ječmenog kruha.

Ključne riječi: kiselo tijesto, ječmeno brašno, *Weissella cibaria*, smrzavanje, skladištenje
Rad sadrži: 53 stranice, 18 slika, 11 tablica, 53 literaturnih navoda,
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Dubravka Novotni
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Nikolina Čukelj, Lidija Drobac, bacc. ing. agr.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (predsjednik)
2. Doc. dr. sc. Dubravka Novotni
3. Doc. dr. sc. Nikolina Čukelj
4. Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (zamjena)

Datum obrane: 30.09.2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Enginering
Laboratory for Chemistry and Technology of Cereals
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF FROZEN BARLEY SOURDOUGH IN BREAD PRODUCTION

Tanita Šicel, 632/PI

Abstract: The goal of this study was to determine the optimal proportion of frozen barley sourdough in a composite bread and examine the impact of sourdough frozen storage on bread quality. Sourdough was fermented with lactic acid bacteria *Weissella cibaria* and added to bread dough in quantity of 10, 20 or 30%. The results of testing sourdough, bread dough and bread features showed that the optimum sourdough addition in bread is 20%. Sourdough was frozen and stored for 4, 8, and 12 weeks. During storage the number of viable cells in the sourdough declined over time, titratable acidity was slightly increasing. Sourdough storage time did not negatively affect the ability of the dough fermentation and there was no differences in the quality of bread with stored sourdough compared to the bread with fresh sourdough. Results of this study demostrate the possibility of industrial application of frozen barley sourdough since it can improve the quality of bread compared native barley flour.

Keywords: sourdough, barley flour, *Weissella cibaria*, freezing, storage
Thesis contains: 53 pages, 18 figures, 11 tables, 53 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Dubravka Novotni, Assistant professor
Technical support and assistance: PhD Nikolina Čukelj, Assistant professor,
Lidija Drobac, bacc. ing. agr.

Reviewers:
1. PhD Jasna Mrvčić, Associate professor
2. PhD Dubravka Novotni, Assistant professor
3. PhD Nikolina Čukelj, Assistant professor
4. PhD Anet Režek Jambrak, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 30.09.2016

SADRŽAJ:

1 UVOD 1

2 TEORIJSKI DIO 2

2.1 ŽITARICE U LJUDSKOJ PREHRANI 2

2.2 JEČAM 3

2.2.1 Nutritivni sastav ječma 4

2.2.2 Zdravstveni učinci ječma 6

2.2.3 Prerada i proizvodnja ječmenog brašna 7

2.3 KISELO TIJESTO U PEKARSKOJ INDUSTRIJI 8

2.3.1 *Weissella cibaria* 10

2.3.2 Proces proizvodnje kruha s kiselim tijestom 11

2.4 ČUVANJE KISELOG TIJESTA 12

2.4.1 Utjecaj zamrzavanja na bakterije mliječne kiseline 13

3 EKSPERIMENTALNI DIO 15

3.1 MATERIJALI 15

3.2 METODE RADA 19

3.2.1 Priprema inokuluma 19

3.2.2 Određivanje broja živih stanica mikroorganizama i kiselom tijestu 19

3.2.3 Priprema kiselog tijesta 20

3.2.4 Ukupna kiselost titracijom 20

3.2.5 Određivanje organskih kiselina enzimskom reakcijom 20
3.2.6 Smrzavanje i skladištenje kiselog tijesta 21
3.2.7 Priprema krušnog tijesta i probna pečenja 22
3.2.8 Određivanje fermentacijske sposobnosti tijesta na reofermentoru 23
3.2.9 Senzorska analiza 25
3.2.10 Prinos tijesta, prinos kruha, prinos volumena i gubitak pečenjem 26
3.2.11 Oblik i specifični volumen kruha 26
3.2.12 Tekstura sredine kruha 26
3.2.13 Boja sredine i kore kruha 27
3.2.14 Statistička obrada 27
4 REZULTATI I RASPRAVA 28
4.1 SVOJSTVA JEČMENOG KISELOG TIJESTA 28
4.1.1 Fermentacija kiselog tijesta i pH vrijednost 28
4.1.2 Broj živih stanica u kiselom tijestu tijekom skladištenja 29
4.1.3 Kiselost tijekom skladištenja u kiselom tijestu 29
4.1.4 Udio organskih kiselina u kiselom tijestu tijekom skladištenja 31
4.2 FERMENTACIJSKA SPOSOBNOST KRUŠNOG TIJESTA 32
4.3 SVOJSTVA KRUHA S RAZLIČITIM UDJELOM JEČMENOG KISELOG TIJESTA 36
4.3.1 Senzorska svojstva kruha 36
4.3.2 Boja kore i sredine peciva 37

4.3.3 Specifični volumen i oblik kruha 39

4.3.4 Tekstura sredine kruha 40

4.4 UTJECAJ SKLADIŠTENJA KISELOG TIJESTA NA SVOJSTVA KRUHA 43

4.4.1 Prinos tijesta, prinos kruha, prinos volumena i gubitak pečenjem 43

4.4.2 Specifični volumen i oblik kruha sa skladištenim kiselim tijestom 44

4.4.3 Tekstura sredine kruha sa uskladištenim kiselim tijestom 46

5 ZAKLJUČCI 47

6 LITERATURA 48

1 UVOD

Ječmenom brašnu i proizvodima na bazi ječmenog brašna sve više raste popularnost budući da su prepoznati kao izvor topivih i netopivih prehrambenih vlakna, posebice β-glukana. Usprkos tome, zbog negativnog utjecaja na volumen i senzorska svojstva kruha i reologiju tijesta, ječmeno brašno se ne koristi često u pekarstvu.

Fermentiranje ječmenog brašna se pokazalo kao dobar način za poboljšanje kvalitete kruha sa ječmenim brašnom, jer pozitivno utječe na teksturu i volumen te produljuje rok trajanja proizvoda. Pekari obično koriste spontano fermentirana kisela tijesta u kojima mikroorganizmi prirodno prisutni u brašnu provode fermentaciju. Ova tijesta je potrebno redovito osvježavati dodatkom svježeg brašna i vode. Zbog uvjeta u pekari koji nisu konstantni i zbog dodavanja novog brašna, kiselom tijestu se mogu promijeniti svojstva (pH, sastav mikroflore, sastav organskih kiselina) što utječe na kvalitetu gotovog proizvoda.

Zbog toga se sve više istražuje novi način proizvodnje i skladištenja kiselog tijesta. Tijesta se fermentiraju sa čistim kulturama ili mješavinama čistih kultura bakterija mliječne kiseline i pokušavaju se sačuvati sušenjem, skladištenjem na niskim temperaturama 4-8 °C ili zamrzavanjem.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj smrznutog skladištenja ječmenog kiselog tijesta (do 12 tjedana) na njegova svojstva (kiselost, broj živih stanica bakterija mliječne kiseline) i mogućnost njegove direktne primjene u proizvodnji kruha. Kiselo tijesto je fermentirano sa starter kulturom *Weisella cibaria* uz dodatak saharoze i ksilanaze. U ovom radu je najprije određen optimalni udio ječmenog kiselog tijesta u kruhu, s obzirom na fermentacijske sposobnosti tijesta, senzorske karakteristike, volumen i teksturu miješanog kruha. Potom su određena fermentacijska sposobnost krušnog tijesta i svojstva kruha (volumen, teksturu sredine, oblik i prinos kruha) s dodanim ječmenim kiselim tijestom koje je bilo smrznuto skladišteno do 12 tjedana.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 ŽITARICE U LJUDSKOJ PREHRANI

Porast broja pretilih ljudi u zapadnim razvijenim zemljama povećava interes za zdravu i pravilnu prehranu te također time mijenja i interese i aktivnosti prehrambene industrije. To uključuje: korištenje prehrambenih vlakna u pekarskim proizvodima, smanjenje kalorijske vrijednosti, korištenje nisko kalorijskih zamjena za jednostavne šećere i masti. Te promijene imaju puno prednosti poput prevencije bolesti i dobar su marketinški argument za prodaju proizvoda.

Integralni kruhovi od cjelovitih žitarica i kruhovi bogati vlaknima imaju veliku ulogu u zdravoj prehrani. Cjelovite žitarice sadrže visoku koncentraciju prehrambenih vlakana, rezistentnog škroba i oligosaharida, te su bogate nutrijentima i fitokemikalijama s dobrotvornim učinkom na zdravlje. Imaju značajnu koncentraciju vitamina B-kompleksa (tiamina, niacina, riboflavina i pantenonske kiseline), minerala (kalcija, magnezija, kalija, fosfora, i željeza), aminokiselina, te povećan udio tokoferola. Prehrambena vlakna su nutritivni koncept koji se može svrstati pod pojmove funkcionalna hrana i nutraceutici. Žitarice su jedan od glavnih izvora vlakana budući da čine oko 50% ukupnog izvora vlakna u prehrani populacije iz zapadnih razvijenih zemalja (Collar, 2008). Unos vlakna i hrane koja ih sadrži je u zapadnim zemljama manji od preporučenog. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO-World Health Organization, 2006) preporučuje više od 25 g vlakna dnevno, a unos u mnogim zemljama je puno manji; npr. u SAD (2001) je unos bio 15 g dnevno, dok u je Danskoj (1999) da žene unose procijenjeno 18 g vlakana dnevno, a za muškarci 22 g dnevno (Collar, 2008).

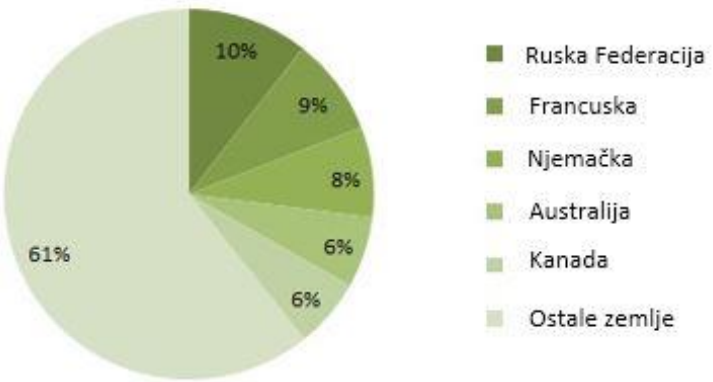
Istraživanja su dala čvrste dokaze da unos cjelovitih žitarica može štititi od mnogih bolesti. Epidemiološka istraživanja dokazuju da se redovitim unosom cjelovitih žitarica smanjuje rizik i učestalost pojave kardiovaskularnih bolesti (Truswell, 2002) i nekih vrsta raka (Chatenoud i sur., 1998). Također pomaže i u reguliranju razine glukoze u krvi (Bruce i sur., 2000), te pretilosti (Slavin, 2004).

Zahvaljujući sadržaju vlakna topljivih u vodi (prije svega β-glukana), 2006. je američki FDA izdao zdravstvenu tvrdnju da je konzumacija proizvoda od ječma povezana sa smanjenjem

rizika od koronarnih bolesti srca. Primjer zdravstvene tvrdnje koja se smije navoditi na proizvodima od ječma je: „Vlakna iz namirnica kao što je ječam, a koje su dio prehrane siromašne zasićenim mastima i kolesterolom mogu smanjiti rizik od koronarnih bolesti srca.“ Sadržaj vlakna mora biti 0,75 g po obroku ili veći kako bi se tvrdnja smjela navesti na proizvodu. Prema FDA-u 3 g/dan-u β-glukana iz ječma je dovoljno da bi se smanjio udio LDL-kolesterola u serumu (Sullivan i sur. 2012).

2.2 JEČAM

Ječam je jedan od najstarijih usjeva koji je imao ulogu u razvoju poljoprivrede, civilizacija, kultura i razvoju znanosti kao što su agronomija, fiziologija, genetika, biotehnologija (sladovanje i vrenje). Uzgaja se i koristi širom svijeta. Danas je najpoznatiji kao sirovina i za proizvodnju slada i vrenje u pivarstvu dok je njegova upotreba u prehrani niska iako je kroz povijest bio glavni izvor hrane u nekim kulturama u zapadnoj i istočnoj Aziji, u predjelu Himalaja te sjevernoj i istočnoj Africi (Ullrich, 2011). Na slici 1 je prikaz udjela proizvodnje ječma pojedinih zemalja u svijetu 2002. godine.



Slika 1. Udio zemalja u proizvodnji ječma 2002 godine (Anonymous 2, 2015)

Ječam (slika 2) je jednogodišnja biljka iz porodice trava *Poaceae*, tribusa *Triticeae*, roda *Horederum*. Postoje 32 vrste koje se prema Bothmeru dijele na: *Hordeum, Anisolepis, Critesion i Stenostachys*. Osnovni broj kromosoma ječma je X=7. Prema broju kromosoma ječam se dijeli na diploidni (2n=2X=14), tetraploidni (2n=4X=28) i heksaploidni (2n=6X=42). Glavni

anatomski dijelovi biljke ječma su tipični za članove tribusa *Triticeae*, kao što su pšenica i raž, sadrži korijenje, stabljiku, lišće, klas i zrno. Korijenje, stabljika i zrno se anatomski ne razlikuju mnogo među vrstama *Triticeae*, međutim klas i zrno ječma su različiti od pšenice i raži (Newman i Newman, 2008a). Vrste ječma se mogu podijeliti na ljetne i ozime, s dva reda ili šest redova u klasu, na vrste s ljuskom i bez ljuske, i vrste za sladovanje i prehranu. Prema sastavu zrna se može podijeliti na: normalan, tip bogat amilozom, bogat lizinom, bogat β-glukanom i bez proantocijanidinima (Sullivan i sur., 2012).



Slika 2. Zrno ječma s prednje i stražnje strane (Anonymous 2, 2016)

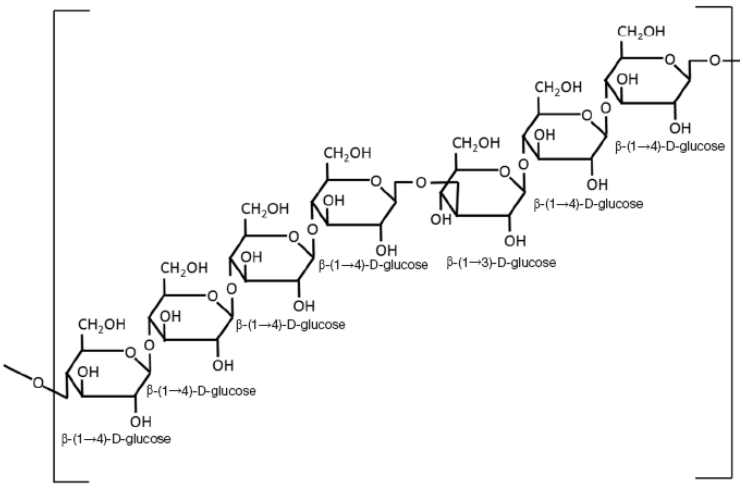
2.2.1 Nutritivni sastav ječma

Kemijski sastav zrna ječma se može dosta razlikovati između genotipova, ovisno o načinu uzgoja, okolišu i uvjetima rasta. Sastav je prikazan kao srednje vrijednosti, iako može doći do većih odstupanja ovisno o sorti (Newman i Newman, 2008).

Najveći udio u sastavu ima škrob - u zrnu ječma s ljuskom ga ima 57,1-59,5 g/kg (Newman i Newman, 2008), a u oljuštenom 60,5-65,2 g/kg (Newman i Newman, 2008). Škrob je glavni izvor energije za rast i razvoj biljke. Sastoji se od dvije molekulske strukture: amiloze i amilopektina. Amilopektin ima razgranatu strukturu od jedinica glukoze koja je povezana α-

(1,4) i α-(1,6) glikozidnom vezom. Amiloza ima uglavnom ne razgranatu, linearnu, strukturu povezanu α-(1,4) glikozidnim vezama. Bočni lanci amiloze ječma nisu još u potpunosti karakterizirani; amiloza može imati od 4 do 100 jedinica glukoze. Molekule amilopektina su veće i čine veći dio škroba ječma, no najčešće je omjer amilopektina i amiloze 3 prema 1. Omjeri se razlikuju od vrste do vrste (Newman i Newman, 2008).

Ostali ugljikohidrati u zrnu ječma su šećeri i vlakna. Šećera (glukoze, fruktoze, saharoze i fruktana) ima 2,8-3,3 g/kg u neoljuštenom i 2,0-4,2 g/kg u oljuštenom zrnu ječma (Newman i Newman, 2008). Jednostavnih šećera glukoze i fruktoze u ječmu ima malo (<0,2%), maltoze, saharoze i rafinaze je još manje. Prehrambenih vlakna ima 18,8–22,6 g/kg u zrnu s ljuskom i 12,6–15,6 g/kg u zrnu bez ljuske (Newman i Newman, 2008). Netopiva vlakna su neprobavljiva za ljudski probavni sustav, ali su jako važni dijelovi ljudske prehrane zbog mikrobne probave u debelom crijevu. Glavna vlakna ječma su β-glukani, arabinoksilani i celuloza. Celuloza se uglavnom nalazi u ljusci, dok je nešto malo ima u škrobnom endospermu. Za ljudsku prehranu su najvažniji β-glukani - oni sadrže lance β-glukozidnih ostataka polimeziranih β-(1,3) i β-(1-4) vezama. β-glukani su djelomično topljivi u vodenim otopinama (Newman i Newman, 2008). Strukturni prikaz β-glukana je na slici 3.



Slika 3. Strukturni prikaz β-glukana (Anonymous 3, 2016)

Udjel proteina u zrnu s ljuskom je od 12,5-15,4 g/kg, a u zrnu bez ljuske 12,1-16,6 g/kg. Proteina ima u mnogo oblika u zrnu i odgovorni su za strukturu, metaboličku aktivnost i izvor su dušika. Često su lipidi i ugljikohidrati kemijski vezani za proteine pa se klasificiraju kao

lipoproteini i glikoproteini ili ako su vezani i za lipide i proteine onda su glikolipoproteini. Udio proteina u ječmu je kao i u drugim žitaricama relativno mali i nema posebno veliki udio esencijalnih aminokiselina (Newman i Newman, 2008).

Tradicionalno (prema Osbornu) se proteini žitarica dijele na temelju razlike u topljivosti u vodi na četiri frakcije: albumini, prolamini, globulini i glutelini. Albumini su topljivi u vodi, globulini nisu topljivi u čistoj vodi, ali su topljivi u vodenim otopinama soli. Prolamini su topljivi u alkoholnim vodenim otopinama. Glutelini nisu topljivi u vodi, vodenim otopinama soli, smjesama vode i alkohola, otopina kiselina. Albumini i glutelini su uglavnom metabolički proteini (enzimi ili inhibitori), a prolaminske frakcije ječma se nazivu hordein. Prolaminske i gluteninske frakcije se zajednički nazivaju imenom gluten (Koehler i Wieser, 2013).

Lipida u zrnu sa ljuskom ima 1.9-2.4 g/kg, a u zrnu bez ljuske 2,7-3,9 g/kg. Lipidi se nalaze u svim dijelovima zrna ječma i dijele se u dvije skupine: škrobni lipidi i neškrobni lipidi. Neškrobni lipidi se nalaze u obliku kapljice ulja koje su okružene membranom. Škrobni lipidi se nalaze u granulama škroba i njihov je sadržaj proporcionalan udjelu amiloze i oni su uglavnom fosfolipidi. Glavne masne kiseline u triacilglicerolima ječma su palmitinska, oleinska i linolenska kiselina (Newman i Newman 2008b).

Žitarice su poznate kao dobar izvor određenih vitamina. Zrno ječma sadrži sve vitamine osim A, D, K i B_{12}. Cjelovite žitarice su dobar izvor vitamina B-kompleksa. Ječam sadrži široki spektar B-vitamina. Koncentracija određenog vitamina B- kompleksa se razlikuju s obzirom na razne analitičke metode i tehnike u različitim laboratorijima (Newman i Newman, 2008b).

Mjera ukupnog mineralnog sastava ječma je pepeo koji ostane nakon spaljivanja uzorka. Udio pepela tipičnog zrna ječma je 2-3%. Makroelementi prisutni u ječmu su: kalcij, fosfor, kalij, magnezij, natrij, fluor; mikroelementi su: bakar, željezo, jod, selenij, mangan, kobalt i cink (Newman i Newman, 2008b).

2.2.2 Zdravstveni učinci ječma

1) Sprječavanje koronarnih bolesti srce

β-glukani i vlakna iz žitarica pozitivno djeluju na smanjenje koncentracije kolesterola. Mehanizam kojim vlakna smanjuju koncentraciju kolesterola u serumu nije potpuno jasan, ali se vjeruje da vlakna povećavaju viskoznost u tankom crijevu što dovodi do povećanog izlučivanja kolesterola i žuči u debelom crijevu. Smanjuje se koncentracija žuči u jetri što dovodi do sinteze žuči za što se koristi kolesterol iz krvi (Andersson i Aman, 2008).

2) Hipoglikemijski učinak

Vlakna kao što su β-glukani su na povećanje razine glukoze u krvi pokazala ponašanje slično puferu. Iako mehanizam djelovanja nije potpuno poznat sigurno je da vlakna smanjuju glikemijski odgovor povećavajući viskoznost hrane (Sullivan i sur., 2012) .

3) β-glukani kao prebiotik

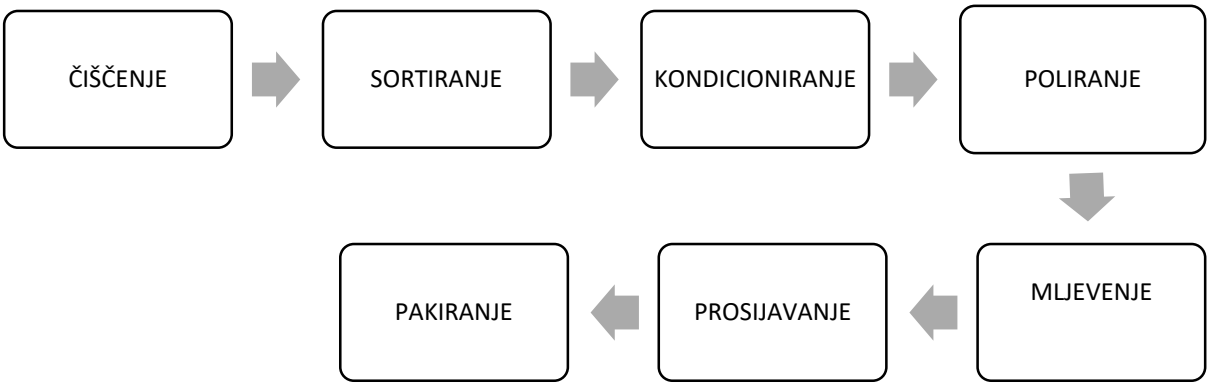
β-glukani selektivno potiču rast dobrih intestinalnih mikroorganizama laktobacila i bifidobakterija (Sullivan i sur., 2012). β-glukani ne probavljeni prolaze kroz probavni sustav gdje se ponašaju kao supstrati za mikrobnu fermentaciju određenih bifidobakterija (Lam i Cehung, 2013).

2.2.3 Prerada i proizvodnja ječmenog brašna

Utjecaj kemijskog sastava ječma na mljevenje i tehnike procesiranja i mljevenja je manje bitan od izbora pravog genotipa. Mnoštvo je prehrambenih proizvoda koji se mogu proizvesti iz ječma koristeći jedan ili više tehnika prerade i mljevenja. Ječam se može polirati, mljeti, ljuštiti, brusiti, prosijavati, ekstrudirati i termički obrađivati. Sladovanje je proces kojim se ječam priprema kao posebni prehrambeni aditiv za proizvodnju piva.

Na slici 4 je prikazan proces proizvodnje ječmenog brašna. Za proizvodnju brašna, ječam se prvo pročišćava da se uklone nečistoće i strani predmeti (separatorima, magnetima, pregledavanjem, prosijavanjem itd.). Zatim se sortira prema veličini. Za mljevenje je potrebno imati što jedno ličniju veličinu i oblik zrna. Nakon toga se sirovina kondicionira, čime se podešava vlažnost i temperatura zrna. Slijedi ljuštenje i poliranje zrna pri čemu se uklanjaju vanjski dijelovi ljuske i zrna trenjem o abrazivnu površinu. Sirovina je potom spremna za mljevenje. Mljevenje može biti samo jednostavna abrazija kojom se proizvodi integralno

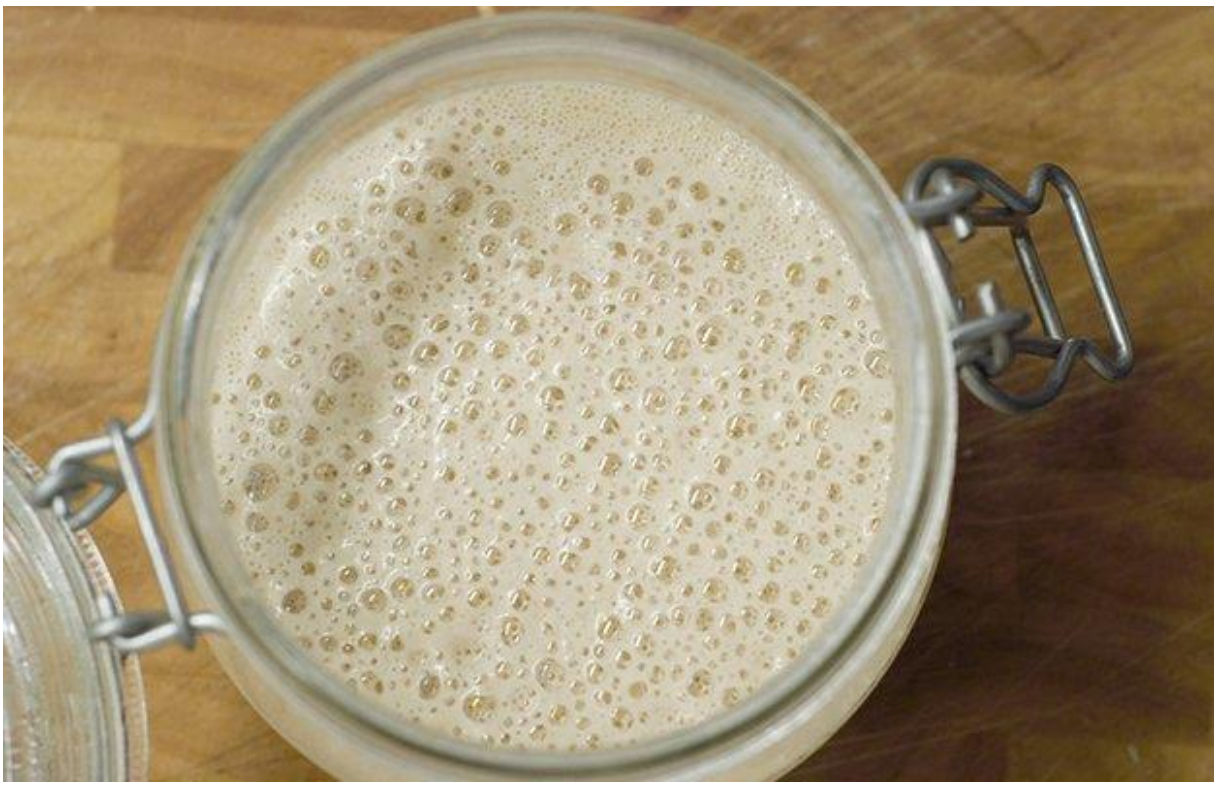
brašno u kamenim mlinovima. U modernoj proizvodnji se koriste čekićasti ili klipni mlinovi za proizvodnju integralnog ječmenog brašna. Valjkasti mlinovi se koriste za proizvodnju ječmenog brašna koje nije integralno. Standardni sustavi valjkastih mlinova za proizvodnju pšeničnog brašna se trebaju prilagoditi kako bi se dobilo maksimalno iskorištenje ječma. Brašno se dalje razdvaja prosijavanjem ili separacijom propuhivanjem zraka (Newman i Newman, 2008c).



Slika 4. Proces proizvodnje ječmenog brašna

2.3 KISELO TIJESTO U PEKARSKOJ INDUSTRIJI

Kiselo tijesto je mješavina brašna (najčešće pšeničnog, ječmenog ili raženog) i vode koja spontano fermentira (Slika 5). Upotreba kiselog tijesta ima dugogodišnju tradiciju, a spontana kisela fermentacija je jedno od najstarijih procesa poznatih čovječanstvu. Zbog kontrole fermentacije u novija vremena se koriste poznate i specifične kulture mikroorganizama. Kiselo tijesto se koristi u pekarstvu s ciljem poboljšanja kvalitete i produžetka rok trajanja proizvoda. Bakterije mliječne kiseline koje provode fermentaciju proizvedu brojne metabolite, kao što su organske kiseline, egzopolisaharidi i enzimi, a koji imaju pozitivan učinak na teksturu kruha. Osim toga transformacija aminokiselina i peptida u tvari arome značajno pridonosi okusu i aromi kruha (Torrieri i sur., 2014).



Slika 5. Kiselo tijesto (Anonymous 4, 2016)

Kiselo tijesto se dijeli na tri različita tipa (Decock i Cappelle, 2005):

Tip I: Tradicionalna kisela tijesta, spontano fermentirana gdje fermentacija započinje dodatkom kiselog tijesta iz prethodne fermentacije,

Tip II: Industrijska kisela tijesta fermentirana pomoću starter kultura mikroorganizama,

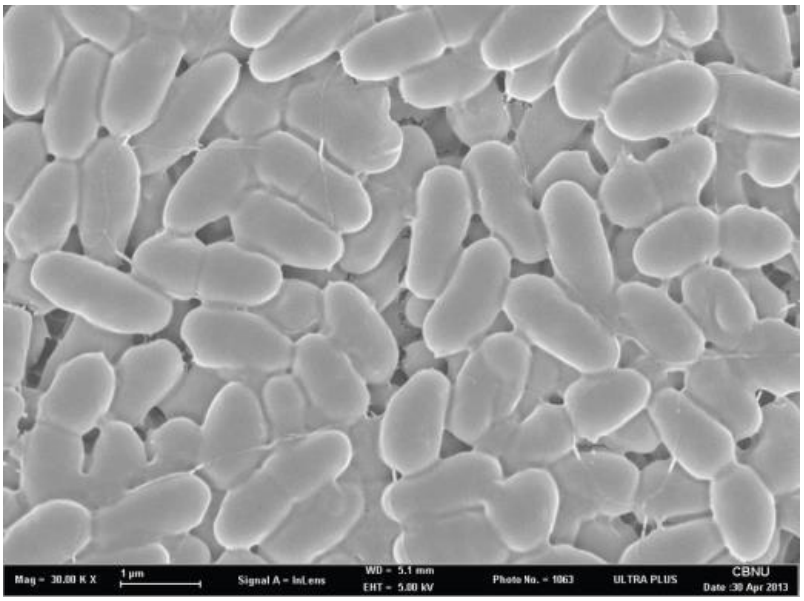
Tip III: Kisela tijesta koja su konzervirana sušenjem; često se koriste u industrijskim pekarama zbog konstantne kvalitete i malih varijacija proizvoda.

Važan parametar u proizvodnji kiselog tijesta su starter kulture upotrebljene za fermentaciju. Bakterije mliječne kiseline (BMK) mogu biti homofermentativne ili heterofermentativne.

Produkti heterofermentativnih bakterija su mliječna i octena kiselina, a koje kiseline će više nastati često ovisi o temperaturi fermentacije, pa se okus može regulirati promjenom temperature. Homofermentativne bakterije uglavnom proizvode mliječnu kiselinu. Na tržištu su dostupne starter kulture kombinacija različitih BMK i one osiguravaju dobru fermentaciju i aromatizaciju tijesta (Decock i Cappelle, 2005).

2.3.1 *Weissella cibaria*

Bakterije genoma *Weissella* su gram-pozitivne, katalaza-negativne koki bakterije, koje spadaju u bakterije mliječne kiseline. Pripadaju razredu *Bacilla*, redu *Lactobacillales* i rodu *Leuconostocaceae*. Obligatno su heterofermentativne bakterije koje proizvode CO_2 iz metabolizma ugljikohidrata uz mješavinu D(-)- i L(+)- mliječne kiseline i octenu kiselinu. Devetnaest različitih vrsta *Weissella* je poznato i izolirano iz različitih izvora (koža, mlijeko, feces životinja i ljudi, sa voća i povrća i iz fermentiranih namirnica kao što je kiselo tijesto). Na slici 6 je *Weissella cibaria* slikana elektronskim mikroskopom.



Slika 6. *Weissella cibaria* pod elektronskim mikroskopom (Anonymous 5, 2016)

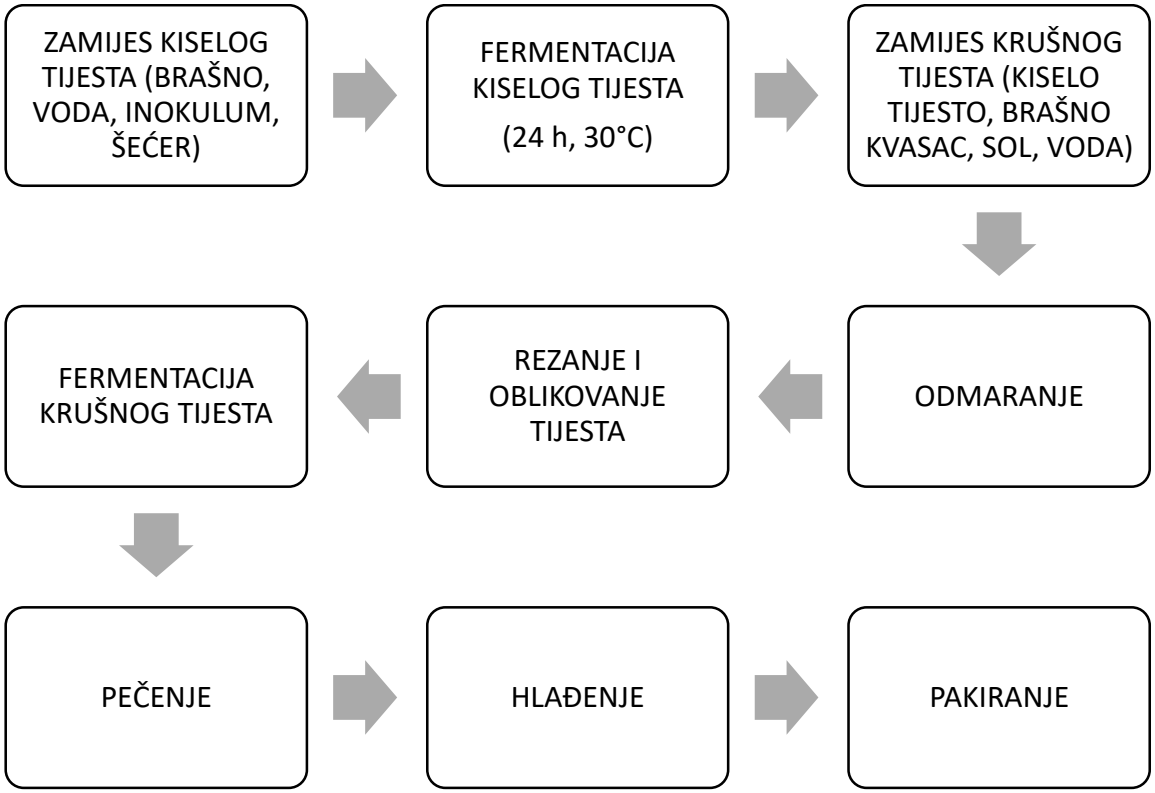
Weissella cibaria proizvodi obilne količine dekstrana, neprobavljivog oligosaharida, koji dobiva sve više pažnje zbog mogućeg prebiotičkog učinka i zbog primjene u pekarskoj

industriji. Raste pri temperaturi od 15°C i 45°C, ali ne i 4°C, a idealna temperatura za rast je 30°C (Fusco i sur., 2015). Wolter i suradnici (2013) su istraživali utjecaj dekstrana proizvedenog *Weissella cibaria*-om na senzorska svojstva bezglutenskih i pšeničnih kruhova od heljde, kvinoe i sirka i na svojstva pečenja. U krušno tijesta su dodali 20% kiselog tijesta ferementiranog s *Weissella cibaria*-om i uspoređivali su karakteristike s kruhom bez kiselog tijesta. Dodatak kiselog tijesta nije utjecao na volumen, međutim smanjena je tvrdoća mrvica, povećana je snaga tijesta kod kruha od heljde sirka i pšenice. Aroma tijesta se nije promijenila dodatkom kiselog tijesta. Do sada nije istraživan utjecaj ječmnog kiselog tijesta fermentiranog *Weissella cibaria*-om na karakteristike pečenja kruha i na senzorska svojstva kruha.

2.3.2 Proces proizvodnje kruha s kiselim tijestom

Kiselo tijesto može se proizvesti na tradicionalan način tako da se smjesa brašna i vode ostavi da fermentira spontano s prirodno prisutnim mikroorganizmima iz brašna (Tip I). Ta smjesa se nekoliko puta osvježi dodatkom brašna i vode. Dominantni mikroorganizmi u kiselom tijestu su homofermentativne i heterofermetativne bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus, Leuconostoc* i *Pediococcus*. Bakterije proizvode organske kiseline u tijestu i često su uz njih prisutni rod gljiva *Candida* ili *Saccharomyces*. Danas su na tržištu dostupni preparati kultura i mješavine kultura mikroorganizama. Kiselo tijesto fermentira od 24 do 48 sati na temperaturi od 22 do 33 °C. Tijesto se proizvodi od različitih žitarica i u obliku je stabilne tekućine ili paste (Tip II) ili može biti osušeno (Tip III). Za proizvodnju kruha s kiselim tijestom tip-a II i tip III je potrebno dodati i pekarski kvasac u zamjes (Ćurić i sur., 2014).

Pri proizvodnji kvasnog kruha, ječmeno brašno je manje poželjno zbog manjeg udjela glutena i većeg zadržavanja vode u odnosu na pšenično brašno. Ječmeno brašno negativno utječe na volumen i teksturu kruha. Ječmeno brašno se može koristiti u obliku kiselog tijesta kako bi se poboljšao okus. U ječmu ima manje pentoza nego u raži, pa je volumen kruha s ječmenim kiselom tijestom tijestom manji od volumena kruha da raženim kiselim tijestom (Anderssin i Aman, 2008). Na slici 7 je shema proizvodnje kruha s ječmenim brašnom.



Slika 7. Shema proizvodnje kruha s dodatkom kiselog tijesta

2.4 ČUVANJE KISELOG TIJESTA

Kisela tijesta tipa I koja su dobivena spontanom fermentacijom pekari čuvaju tako da ga svaki dan osvježavaju dodatkom svježeg brašna i vode, što im omogućava da imaju uvijek spremno kiselo tijesto. Međutim ovaj način čuvanja dovodi do rizika od poremećaja u mikroflori koji mogu promijeniti tehnološke karakteristike kiselog tijesta i utjecati na kvalitetu gotovog proizvoda (Ganzle i sur., 2003). Neki pekari izbjegavaju svakodnevno osvježavanje tijesta tako da ga čuvaju na nižim temperaturama ili ga prije skladištenja osuše. Ako tijesto namjeravaju čuvati na temperaturi između 4 i 10 °C, brašno i voda se pomiješaju i skladište između 20 i 30 dana. Neki čuvaju tijesto na temperaturi između -20 i -30 °C i tada je prije korištenja tijesto potrebno nekoliko puta osvježiti kako bi se reaktiviralo (Latanzzi i sur., 2013).

Lattanzi i sur. (2013) su uspoređivali tri načina skladištenja kiselog tijesta na +4°C, na -20°C te kao osušeno. Za skladištenje u hladnjaku na +4°C su brašno i vodu samo promiješali i odmah nakon toga smjesu su uskladištili. Zamrznuto kiselo tijesto su prvo jedan sat držali na –80°C.

Tijesto su sušili na 40 °C 20 h dok nisu dobili relativnu vlažnost od 85 g/kg. Tijesta su reaktivirali tako što su ih dva ili tri puta osvježili nakon 7, 30, 60, 90 dana. Rezultati su pokazali da tijesto koje je bilo skladišteno zamrznuto nakon 90 dana pokazuje djelomično očuvanje mikroflore. Skladištenje sušenjem i u zamrzivaču pokazalo se zadovoljavajućim za očuvanje tijesta do 30 dana.

2.4.1 Utjecaj zamrzavanja na bakterije mliječne kiseline

Zamrzavanje se često koristi za skladištenje (održavanje na životu i očuvanje tehničkih karakteristika) bakterija mliječne kiseline duže vremena. Na preživljavanje bakterija tijekom smrzavanja utječe više faktora. Oblik i veličina stanice utječu na preživljavanje, a što je stanica veća i kompleksnija šanse za preživljavanje su manje. Pokazalo se da stanice bolje preživljavaju ako su prije samog zamrzavanja pod utjecajem manjeg stresa (Fonesca, 2001). Bakterije mliječne kiseline prilikom nepovoljnih uvjeta, kao što su niske temperature, mijenjaju svoje ponašanje tako da proizvode proteine stresa ili mijenjaju kompoziciju membrane (Fonesca, 2001).

Kada se voda u namirnici nalazi u obliku vodene otopine ledište vode se smanjuje na -3°C, a smrzavanje uzrokuje nastanak kristala leda u otopini. Pri nastanku kristala leda pada i temperatura cijele otopine. S povećanjem udjela leda se ostale tvari otopljene u otopini koncentriraju pa može doći do naglih promjena pH što može negativno djelovati na mikroorganizme. Smrzavanjem vode se smanjuje aktivitet vode, ali i nastali kristali leda dok njihova lokalizacija može uzrokovati stanična oštećenja mikroorganizama (Gilll, 2014).

Brzina smrzavanja utječe na preživljavanje bakterija mliječne kiseline. Kod sporijeg zamrzavanja dolazi do dehidracije zbog koncentriranja elektrolita u međustaničnoj tekućini i do akumulacije kristali leda koji više narušavaju strukturu (Fusco i sur., 2001). Kod brzog zamrzavanja nastaju manji kristali koji dovode do manjih promjena u samoj namirnici (Lovrić, 2003), ali dolazi i do stvaranja unutar staničnog leda koji oštećuje stanicu. Prema Mazur (1984) postoje dva mehanizma oštećenja stanice neovisna jedan o drugom, jedan je aktivan pri sporom, a drugi pri brzom smrzavanju. U oba slučaja oštećenja su povezana s nastajanjem unutarstaničnog leda.

Na preživljavanje bakterija mliječne kiseline utječu i uvjeti (temperatura) i vrijeme skladištenja. Na temperaturama višim od -130°C s vremenom pada broj preživjelih bakterija mliječne kiseline i njihova aktivnosti, a što je temperatura viša pad je značajniji (Fonesca i sur., 2000; Foscino i sur., 1996).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

Za probna pečenja kruha korišteno je polubijelo pšenično brašno T-850 (Žitoproizvod, Karlovac), integralno ječmeno brašno (Advent, Pula), s 11% vlage, 1,15% pepela, 10,0% proteina, svježi pekarski kvasac *Saccharomyes cerevisiae* (Vivo, Kvasac d.o.o, Prigorje Brdovečko), sladno brašno (Ireks aroma d.o.o., Jastrebarsko), vodovodna voda iz hladnjaka temperature 10-15 °C, konzumni šećer (Viro d.d., Virovitica), kuhinjska sol (Paška solana, Pag) i askorbinska kiselina (Drogerie Markt). Reološka svojstva pšeničnog brašna su prikazana u tablici 1. Za ječmeno brašno broj padanja je iznosio 414 s, a maksimalna viskoznost mu je bila 1730 BU.

Za pripremu kiselog tijesta korišteno je navedeno ječmeno brašno, liofilozirana starter kultura bakterija mliječne kiseline *Weissella cibaria* (DSM 15787) proizvođača DSMZ (Njemačka) i enzim bakterijska ksilanaza (AB Enzymes Veron XL).

Tablica 1. Reološka svojstva pšeničnog brašna

AMILOGRAM			
Početak bubrenja (°C)	51,1		
Temperatura maksimalne viskoznosti (°C)	84,4		
Vrijeme tvorbe ljepka (min)	22,2		
Maksimalna viskoznost AJ	1200		
FARINOGRAM			
Pijanje vode (%)	60		
Razvoj tijesta (min)	3		
Stabilnost (min)	0,7		
Rezistencija (min)	4,2		
Stupanj omekšanja (FJ)	70		
Kvalitetni broj	65		
Grupa kvalitete	B1		
EKSTENZOGRAM			
Vrijeme (min)	45	90	135
Energija (cm2)	66,95	72,75	63,95
Rastezljivost (mm)	165,5	160,5	146,5
Otpor (EJ)	2220	245	255
Max.otpor (EJ)	307,5	360	342.5
Omjer O/R	1,3	1,55	1,7

Kemikalije

- 96%-etanol
- 0,1 M NaOH
- Carezz I otopina (otopina kalijeva heksacijanoferata-3-hidrata, 0,085 mol/L)
- Carezz II otopina (otopina cinkova sulfata-7-hidrata, 0,25 mol/L)
- Megazyme Acetic acid (Rapid, Manual, Simple and End-Point AK/PTA Format) Assay procedure
- Megazyme D-i L- Lactic Acid (D-Lactate) (Rapid) Assay Kit

Za pripremu inokuluma je korištena MRS (de Man, Ragosa and Sharpe) hranjiva podloga. Sastav hranjive podloge je prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Sastav hranjive podloge

Pepton (g)	10
Mesni ekstrakt (g)	10
Kvaščev ekstrakt (g)	5
Glukoza (g)	20
Tween 80 (g)	1
Dikalij-hidrogen fosfat (K_2HPO_4) (g)	2
Natrij-acetat (g)	5
Amonij-citrat (g)	2
Magnezij-sulfat (g)	0,2
Mangan-sulfat (g)	0,05
Destilirana voda (l)	1

Oprema

- Analitička vaga 0,01g plb 200-2 (Kern, Njemačka)
- Bakto boce 500 mL
- Brabenderov farinograf (Brabender, Njemačka)
- Bunsenov plamenik
- Centrifuga Rotina 35 (Hetich, Njemačka)
- Električno kuhalo (Corona)
- Epruvete od 20 mL
- Erlenmayerove tikvice zapremnine 25 mL i 100 mL
- Fermentacijska komora (Weisheu, Njemačka)
- Filter papir Watman br.1
- Kivete plastične
- Kolorimetar (Konica Minolta)
- Laboratorijske čaše 10 ml, 25 i 50 ml
- Lijevak
- Magnetska mješalica Worke (IKA, Njemačka)
- Menzura 100 ml
- Mikropipete od (0,02, 0,10, 0,50, 2,00, 5,00 ml)
- Odmjerna tikvica 100 mL
- Pekarska peć (Weisheu, Njemačka)
- Petri ploče
- pH metar za tijesto (Testo)
- pH-elektroda sa zapisivačem podataka (Omega, Stamford, Connecticut, SAD)
- Pipeta 10 ml, 25 ml
- Pomično mjerilo
- Posude plastične za spremanje kiselog tijesta, 200 ml
- Reofermentor (Chopin, Francuska)
- Ručni mikser (Tefal, Francuska)
- Skener (Canon)
- Solarna pipeta (Pipetus)
- Spektrofotometar (Pye Unicam)

- Sterilne pipete od 1 ml
- Uređaj za brzo smrzavanje strujom hladnog zraka (Everlasting, Italija)
- Teksturometar (TA.HDplus Texture Analyser, Stable Micro Systems, Velika Britanija)
- Vaga kapaciteta 0,5kg, točnosti 0,01g
- Zamrzivač (Zanussi, Italija)

3.2 METODE RADA

3.2.1 Priprema inokuluma

Inokulum bakterija mliječne kiseline je pripreman u sterilnim uvjetima pored plamenika i sa sterilnim posuđem. Malo (na vrhu špatule) liofilizirane čiste kulture *Weissella cibaria* je prvo hidratizirano u sterilnoj vodi 30 minuta. Zatim je smjesa prebačena u epruvetu sa sterilnom hranjivom podlogom i inkubirana 24 sata na temperaturi 30°C, što je činilo prvu fazu. Nakon inkubacije je sa sterilnom pipetom u 5 epruveta prebačeno po 10 kapi iz prve faze i ponovo stavljeno na inkubaciju 24 h na 30°C. Epruvete iz 2. faze su prebačene u bakto-bocu sa 300 ml tekuće hranjive podloge. Bakto boca je ponovo inkubirana 48 h na 30°C. Zatim je sadržaj bakto-boce centifugiran na 4000 okretaja u minuti 10 minuta. Sadržaj je raspoređen u kivete za centrifugu po 50 ml. Svaka kiveta je centrifugirana s hranjivom podlogom. Nakon centrifuge istaložena biomasa je još dva puta isprana sa sterilnom vodom. Količina dobivene biomase je suspendirana u sterilnoj vodi što je činilo inokulum za pripremu kiselog tijesta.

3.2.2 Određivanje broja živih stanica mikroorganizama i kiselom tijestu

Određivanje broja živih stanica u kiselom tijestu je provedeno pri sterilnim uvjetima uz plamenik i sa sterilnim posuđem, a za svako razrjeđenje se koristila sterilna pipeta. Da se dobije prvo razrjeđenje (10^{-1}), 1 g uzorka kiselog tijesta je otopljeno u 10 ml sterilne vode, te je otopina dobro promiješana. Iz prvog razrjeđenja, 1 ml je prenesen u novu epruvetu sa 9 ml vode i promiješao, kako bi dobili drugo razrjeđenje. Iz drugog razrjeđenja je preneseno u novu epruvetu s 9 ml vode za treće razrjeđenje. Postupak je ponavljan dok nije postignuto željeno razrjeđenje. Zatim je od svakog željenog razrjeđenja, stavljeno po 1 ml na sterilnu Petri ploču. Kako bi se postigli anaerobni uvjeti, uzorak je ravnomjerno preliven MRS podlogom. Nakon što se prvi sloj podloge ohladio, dodan je još jedan sloj hranjive podloge. Petri ploče su nakon

hlađenja inkubirane u termostatu na 30°C 48 sati. Nakon inkubacije su izbrojane porasle kolonije na Petri pločama. Broj živih stanica je izražen u CFU (Colony-forming unit).

3.2.3 Priprema kiselog tijesta

Ječmeno kiselo tijesto je pripremljeno od 700 g integralnog ječmenog brašna, 1005 ml vode, 45 ml inokuluma *Weissella Cibaria*, 70 g šećera i enzima bakterijska ksilanaza u količini od 0,035 g (0,002%). Omjer brašna i vode u tijestu je bio 1:1,5. Smjesa je promiješana kuhinjskim mikserom marke Tefal 5 minuta i stavljena je na fermentaciju 24 sata u komoru na 30°C u zatvorenoj posudi. Tijekom fermentacije praćena je pH vrijednost pomoću pH-elektroda sa zapisivačem podataka koji su se pratili na računalu.

3.2.4 Ukupna kiselost titracijom

Ukupna kiselost kiselog tijesta je određena tako da je 10 g tijesta otopljeno u 90 ml destilirane vode. Otopina je titrirana uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici sa 0,1 M NaOH do porasta pH do 8,5. Ukupna kiselost je volumen NaOH potrebnog za postizanje pH 8,5 (Katina i sur., 2006). Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost od dva mjerenja.

3.2.5 Određivanje organskih kiselina enzimskom reakcijom

Priprema uzorka provedena je prema Lefevbre i sur. (2002). Dvije paralelne probe uzoraka smrznutog tijesta (10 g) su otopljene u 90 ml destilirane vode i na magnetskoj miješalici (Ika, Njemačka) homogenizirane 10 do 15 minuta. Zatim je otopina centrifugirana 15 minuta pri 4000 okretaja u minuti (Rotina 35, Hettich, Kirchlengern, Njemačka). Supernatanat je profiltriran preko filter-papira (Whatman br. 1). 25 ml profiltriranog alikvota je razrijeđeno s 40 ml destilirane vode i dodano je 5 mL Carezz I otopine (otopina kalijeva heksacijanoferata-3-hidrata, 0,085 mol/L), a zatim je dodano 5 mL Carezz II otopine (otopina cinkova sulfata-7-hidrata, 0,25 mol/L). Otopina uzorka je neutralizirana s 9,5 mL otopine natrijeva hidroksida (c=0,1 mol/L). Volumen je u odmjernoj tikvici podešen na 100 mL s destiliranom vodom. Uzorak je ponovno filtriran preko filter papira (Whatman br. 1).

3.2.5.1 Enzimska reakcija

Uz dvije paralele uzorka za L- i D- mliječnu kiselinu zasebno, paralelno je napravljena jedna slijepa proba za svaku kiselinu. U 0,1 ml uzorka je dodano 1,5 ml destilirane vode, 0,5 ml otopine 1 (pufer), 0,1 ml otopine 2 (NAD^+), zatim je dodano 0,02 ml otopine 3 (D-GPT) i promiješano. U slijepu probu je umjesto uzorka dodano 1,6 ml destilirane vode.

Kod određivanja D-mliječne kiseline, nakon 3 minute izmjerena je apsorbancija (A1) pri 340 nm i dodana je otopina 5 (D-LDH) 0,02 ml. Nakon 5 minuta reakcije, očitana je apsorbancija (A2). Količina kiseline izračunata je prema kalkulatoru dostupnom na https://www.megazyme.com/.

Za određivanje koncentracije L-mliječne kiseline, nakon 3 minute izmjerena je apsorbancija (A_1) pri 340 nm i dodana je otopina 5 (D-LDH) 0,02 ml. Reakcija je trajala 10 min. i izmjerena je apsorbancija (A_2). Količina kiseline izračunata je prema kalkulatoru dostupnom na https://www.megazyme.com/.

Koncentracija octene kiseline određena je u dvije paralele i s 1 slijepom probom. U 0,1 ml uzorka je dodano 2 ml destilirane vode, 0,5 ml otopine 2 (NAD+/ATP/PVP/CoA pufer), 0,2 ml otopine 3 (CoA) i 0,02 ml otopine 4 (D-LDH/PTA/PK). Nakon 2 minute je očitana apsorbancija A_1. Potom je započeta reakcija dodatkom 0,02 ml otopine 5 (AK) i nakon 4 minute je očitavana apsorbancija A_2. U slijepu probu je umjesto uzorka dodano 2,1 ml destilirane vode. Koncentracija octene kiseline je izračunata prema kalkulatoru dostupnom na https://www.megazyme.com/.

3.2.6 Smrzavanje i skladištenje kiselog tijesta

Nakon fermentacije, 205 g kiselog tijesta je odvagano u plastične posude s poklopcem i zamrznuto u uređaju za brzo smrzavanje (šokeru) dok nije postignuta temperatura u sredini tijesta od -18 °C. Kiselo tijesto je skladišteno u zamrzivaču na -18°C do 12 tjedana.

Nakon 4, 8 i 12 tjedana po dvije posude kiselog tijesta su odmrznute u hladnjaku na +6 °C preko noći.

3.2.7 Priprema krušnog tijesta i probna pečenja

Kontrolni kruh je pečen bez kiselog tijesta s integralnim ječmenim brašnom, a kiseli kruh s 10%, 20% i 30% svježeg ječmenog kiselog tijesta, odnosno s 20% ječmenog kiselog tijesta nakon 4, 8 i 12 tjedana skladištenja kiselog tijesta u zamrzivaču. Tijesta su pripremljena prema recepturama prikazanim u tablici 3.

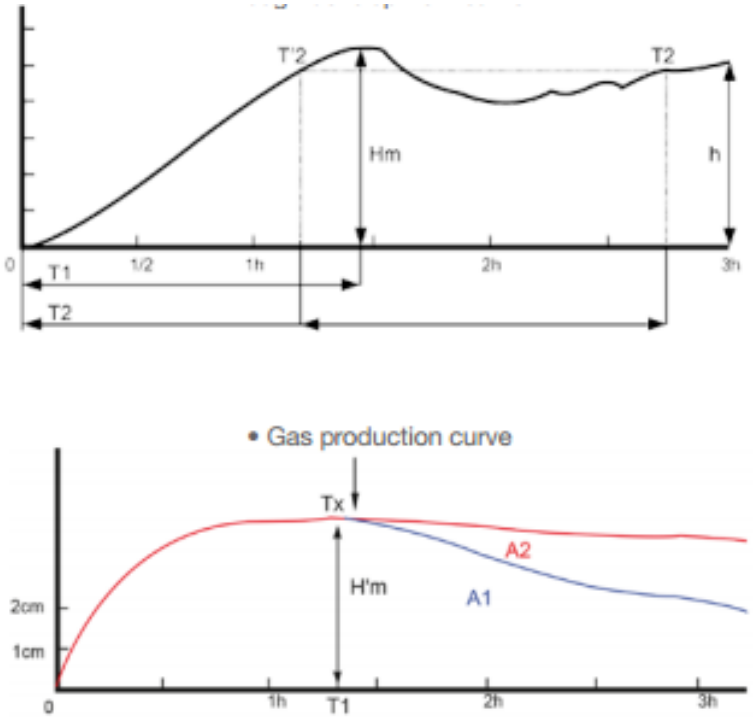
Tijesto za određivanje fermentacijske sposobnosti na reofermentometru (ukupno ~315g) i utjecaja skladištenja smrznutog kiselog tijesta (ukupno ~460g) je miješano u miješalici farinograma i to 2 minute sporo i 7 minuta brzo. Tijesto s različitim udjelom kiselog tijesta za određivanje senzorskih i fizikalnih svojstava kvalitete je miješano na laboratorijskoj miješalici (Diosna SP12) 2 minute sporo i 11 minuta brzo. Nakon miješanja, tijesto je odmaralo 10 minuta. Nakon odmaranja je ponovo ručno premiješano, podijeljeno na komade od 90±1 g i okruglo oblikovano. Tijesto je fermentirano u fermentacijskoj komori na 35°C do povećanja volumena do 330% (45 min). Nakon fermentacije kruh je pečen 15 minuta na 230°C uz naparavanje (130 ml vode) i sa zatvorenim ventilom za dovod zraka nakon 11 minuta. Kruh je ohlađen 1 sat na sobnim uvjetima prije analiza.

Tablica 3. Receptura kruha (u gramima)

Sirovina	Kontrolni kruh	10% kiselog tijesta	20% kiselog tijesta	30% kiselog tijesta
Pšenično brašno T-850	234,8	747,8	695,6	643,4
Voda vodovodna	170,1	425,7	347,4	269,1
Kvasac svježi	8,1	24	24	24
Sol kuhinjska	4,05	12	12	12
Šećer	5,02	14,88	14,88	14,88
Slad	0,81	2,4	2,4	2,4
Vitamin C	0,014	0,04	0,04	0,04
Ječmeno brašno	35,24	-	-	-
Ječmeno kiselo tijesto	-	135,73	271,46	407,19

3.2.8 Određivanje fermentacijske sposobnosti tijesta na reofermentoru

315 g tijesta je stavljeno u reofermentometar na fermentaciju 3h na 35°C. Reofermentometar je uređaj za određivanje fermentacijske sposobnosti tijesta. Mjeri se razvoj tijesta tijekom fermentacije u posudi za fermentaciju u kojoj je tijesto pod pritiskom utega mase 2 kg. Tijesto raste tijekom fermentacije i tako podiže klip sa utezima, a klip je povezan sa senzorima koji mjere porast (visinu) tijesta i porast tlaka. Rezultati testa daju 2 krivulje krivulju razvoja tijesta i krivulju oslobađanja plinova, prikaz krivulja sa rheofermentometra je na slici 8. Mjerenja su provedena u dvije paralele za svaki od uzoraka.



Slika 8. Krivulja razvoja tijesta i oslobađanja plinova (Anonymous 6, 2016)

Na krivulji razvoja tijesta je:

- Hm- maksimalna visina tijesta
- T1- vrijeme maksimalnog rasta
- T2-T2'-tolerancija tijesta

Na krivulji oslobađanja plinova je:

- H'm-maksimalna visina krivulje
- T1- vrijeme potrebno da se postigne H'm
- Tx- vrijeme kada tijesto postaje porozno i počinje otpuštati CO_2
- Ukupni volumen nastalog CO_2 (A1+A2)
- Volumen oslobođenog CO_2 (A2)
- Volumen zadržanog CO_2

3.2.9 Senzorska analiza

Senzorska analiza je provedena s 40 ispitanika, izabranih slučajnim odabirom, koji su ocjenjivali: vanjski izgled, izgled sredine, boju, miris, okus, teksturu i sveukupni dojam kruha s 10, 20 i 30% smrznutog kiselog tijesta (tablica 4). Uzorci su bili šifrirani i ocjenjivali su opisno razinu sviđanja od izrazito mi se ne sviđa do izrazito mi se sviđa. Analiza je provedena u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu opremljenom za senzorska analize. Za svaki opis izrazito mi se ne sviđa uzorku je pridodana ocjena 1, a za svaki izrazito mi se sviđa ocjena 7.

Tablica 4. Primjer testa za senzorsku analizu kruha s različitim udjelom kiselog tijesta

Opis	Vanjski izgled	Izgled sredine	Boja	Miris	Okus	Tekstura	Sveukupni dojam
Izrazito mi se sviđa							
Umjereno mi se sviđa							
Neznatno mi se sviđa							
Niti mi se sviđa, niti ne sviđa							
Neznatno mi se ne sviđa							
Umjereno mi se ne sviđa							
Izrazito mi se ne sviđa							

3.2.10 Prinos tijesta, prinos kruha, prinos volumena i gubitak pečenjem

Prinos tijesta, prinos kruha, prinos volumena i gubitak pečenjem su izračunati prema niže navedenim formulama:

- Prinos tijesta:

$$Pt=\frac{ukupna\ masa\ sirovina}{masa\ brašna}*100 \quad (1)$$

- Prinos kruha:

$$Pk=\frac{masa\ kruha*Pt}{masa\ tjestenog\ komada}*100 \quad (2)$$

- Prinos volumena:

$$Pv=\frac{(volumen\ kruha*Pt)}{masa\ tjestenog\ komada}*100 \quad (3)$$

- Gubitak pečenjem:

$$GP=\frac{masa\ tjestenog\ komada-masa\ kruha}{masa\ tjestenog\ komada}*100 \quad (4)$$

3.2.11 Oblik i specifični volumen kruha

Peciva su vagana 1 h nakon pečenja na digitalnoj vazi. Volumen je mjeren prema standardnoj metodi AACC 10-05.01 pomoću uljane repice (AACC, 2000). Specifični volumen je izračunat kao omjer volumena i mase. Oblik je izračunat tako da je visina podijeljena sa srednjom vrijednosti dviju širina koje su izmjerene pod kutom od 90°C. Širina i visina izmjerene su pomičnim mjerilom.

3.2.12 Tekstura sredine kruha

Tekstura sredine kruha je određena na teksturometru TA.HD plus Texture Analyser (Stable Micro Systems, Velika Britanija), sa sondom promjera 25 mm. Ohlađeni kruh je narezan na kriške debljine 12,5 mm i odstranjena je korica. Na teksturometar je stavljeno po dvije kriške

skupa tako da debljina sredine bude 25 mm. Brzina kompresije je bila 1,7 mm/s, a kompresija je iznosila 40% visine uzorka (AACC metoda 74-09, 2000). Za svako pečenje tekstura je određena u 6 paralelnih uzoraka.

3.2.13 Boja sredine i kore kruha

Na kolorimetru (Spectrophotometer CH-3500 D, Konica Minolta, Engleska) je izmjerena boja kore gornje površine i sredine kruha sa 10, 20 i 30% kiselog tijesta, a na uzorku su izmjerene *L**, *a**, *b**, *C** i *h* vrijednosti. Prema CIELAB (Commission Internationale de l'Eclairage's) sustavu boja vrijednost *L** je aproksimativno mjera svijetlosti odnosno, svojstvo prema kojem se određena boja može smatrati jednakom boji između sive i crne (Granato i Masson 2010). Parametar *a** nosi pozitivne vrijednosti za crvenkaste tonove, a negativne vrijednosti za zelenkaste dok, *b** nosi pozitivne vrijednosti za žućkaste tonove a, negativne za plavkaste. *C** se smatra kvantitativnim svojstvom punoće boja, koristi se za određivanje stupnja razlike u nijansi u usporedbi sa sivom bojom iste svjetline. Vrijednost H je kut nijanse to jest kvalitativno svojstvo boje, koristi se da se odredi razlika između određene boje i nijanse sive iste svijetlosti (Pathare i sur., 2012).

3.2.14 Statistička obrada

Na rezultatima za specifični volumen, oblik, boju i teksturu kruha je provedena analiza varijance (ANOVA) i post-hoc Tukey test u programu GraphPad Prism 5, a uspoređivani su međusobno svi uzorci i statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti ($p<0,05$).

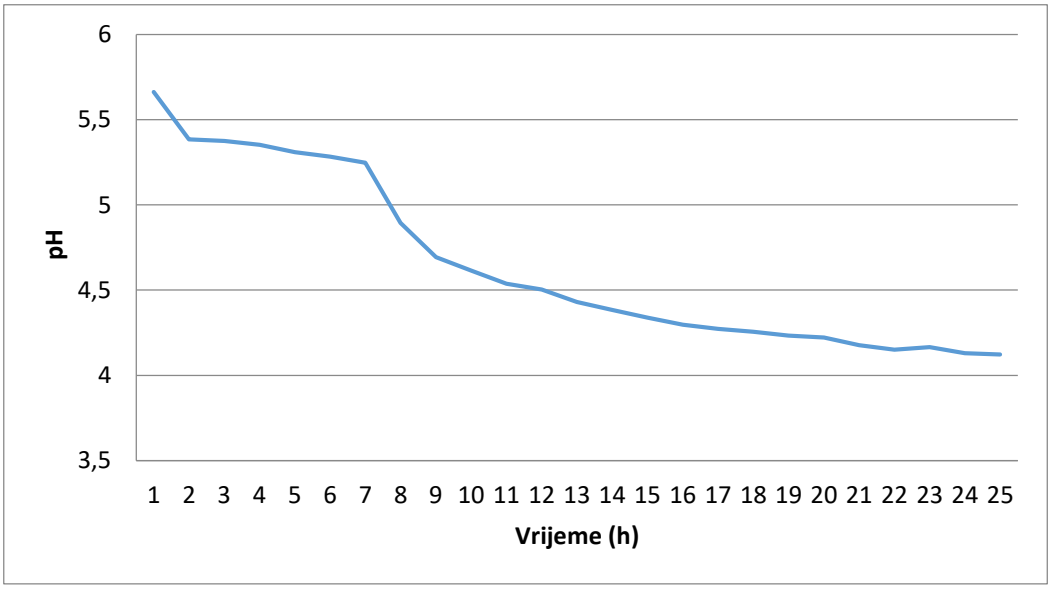
4 REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju su prikazani rezultati analiza kiselog tijesta, krušnog tijesta i kruha. Prikazani su rezultati određivanja pH, titracijske kiselosti, udjela organskih kiselina, broja živih stanica bakterija mliječne kiseline u svježem i smrznutom (skladišteno smrzavanjem 4, 8 i 12 tjedana) kiselom tijestu. Prikazani su rezultati fermentacijske sposobnosti krušnog tijesta sa 10%, 20% i 30% smrznutog ječmenog kiselog tijesta i fermentacijska sposobnost krušnog tijesta sa 20% kiselog tijesta koje smrznuto skladišteno 4, 8 i 12 tjedana. Za kruhove s različitim udjelom kiselog tijesta, 10%, 20% ili 30%, prikazan je specifični volumen, oblik, boja kore i sredine, tekstura sredine i senzorska svojstva. Za kruh sa skladištenim kiselim tijestom prikazan je specifični volumen, oblik i tekstura.

4.1 SVOJSTVA JEČMENOG KISELOG TIJESTA

4.1.1 Fermentacija kiselog tijesta i pH vrijednost

Na slici 9 je prikazan tijek fermentacije kiselog tijesta, odnosno promjena pH vrijednosti kroz 24 h kiseljenja.



Slika 9. Tijek kiseljenja tijesta

Vrijednost pH na početku fermentacije je bila 5,7 i u prvih sedam sati fermentacije je polagano padala do 5,3. Od sedmog do devetog sata fermentacije, pH je naglo pao s 5,3 na 4,7. Od 9. sata do kraja fermentacije, pH se polagano smanjivao do konačne vrijednosti 4,1. Ta vrijednost je tipična za kisela tijesta. Smatra se da je optimalna pH vrijednost kiselog tijesta za primjenu u pekarstvu od 3,9-4,1. U istraživanju Maričić (2015) kinetika kiseljenja ječmenog kiselog tijesta s *Weissella cibaria*-om je slična; pH je naglo krenuo padati nakon 8 h i u slijedeća 2-3 sata se znatno smanjio, nakon toga je pad gotovo linearan da bi na kraju fermentacije bio oko 3,8. Mariotti i sur. (2014) su pri fermentacije ječmenog brašna sa *Weissella cibaria*-om, također dobili nešto nižu pH vrijednost (3,9) u odnosu na ovo istraživanje. Harth i sur. (2016) su uspoređivali spontano fermentirana tijesta u laboratorijskim uvjetima i spontano fermentirana tijesta u pekari. Tijesta su osvježavali 10 puta kroz 10 dana. Zaključili su da bakterije roda *Weissella* sporije rastu što uzrokuje sporiji pad pH vrijednosti odnosno veći pH na kraju fermentacija od bakterija *L. brevis, L. fermentum* i *L. plantarum.*

4.1.2 Broj živih stanica u kiselom tijestu tijekom skladištenja

U tablici 5 su prikazani brojevi živih stanica laktobacila tijekom smrznutog skladištenja.

Tablica 5. Broj živih stanica bakterija mliječne kiseline tijekom skladištenja u smrznutom

Vrijeme skladištenja	CFU/g kiselog tijesta
Svježe kiselo tijesto	$1,1*10^9$
4 tjedna	$2,3*10^6$
8 tjedana	$2,1*10^3$
12 tjedana	$2,2*10^3$

Broj poraslih kolonija u svježem kiselom tijestu je bio tipičan za ječmena kisela tijesta (Zannini i sur., 2009; Mariotti i sur., 2014). U kiselom tijestu koje je bilo smrznuto i skladišteno 8 i 12

tjedana broj živih stanica je relativno mali. Slično kao u ovom radu, u prethodnom radu (Maričić, 2015) je broj preživjelih stanica *Weissella cibaria* u ječmenom kiselom tijestu zamrznutom u šokeru nakon 4 tjedna skladištenja je bio $8,5*10^6$. Između 8. i 12. tjedna skladištenja broj preživjelih stanica se nije znatno smanjio.

4.1.3 Kiselost tijekom skladištenja u kiselom tijestu

Ukupna kiselost svježeg i skladištenog kiselog tijesta određena titracijom je prikazana u tablici 6.

Tablica 6. Ukupna kiselost svježeg ječmenog kiselog tijesta i smrznutog kiselog tijesta tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja	Ukupna kiselost (ml 0,1 M NaOH)
svježe	10,03
4 tjedna	11,15
8 tjedna	11,16
12 tjedna	11,20

Titracijska kiselost je malo porasla tijekom skladištenja. Tako je titracijska kiselost svježeg tijesta bila 10,03 da bi u krajnjoj točki skladištenja porasla do 11,2. U istraživanju Lattazini i sur. (2014) je titracijska kiselost zamrznutog kiselog tijesta fermentiranog mješavinama čistih kultura također rasla nakon skladištenja i obnavljanja. U istraživanju Vrana Špoljarić (2015) također je zabilježen porast titracijske kiselosti ječmenog kiselog tijesta tijekom smrznutog skladištenja.

4.1.4 Udio organskih kiselina u kiselom tijestu tijekom skladištenja

Tablica 7. Udio mliječne i octene kiseline (g/100g) u kiselom tijestu tijekom skladištenja

Vrijeme skladištenja	D-mliječna kiselina	L-mliječna kiselina	Ukupno mliječna kiselina	Octena kiselina
1 dan	0,246 (±0,038)	0,195 (±0,055)	0,441	/
4 tjedna	0,224 (±0,006)	0,156 (±0,006)	0,384	0,053 (±0,005)
8 tjedana	0,194 (±0,004)	0,260 (±0,035)	0,453	0,014 (±0,007)
12 tjedana	0,176 (±0,000)	0,268 (±0,093)	0,444	/

Koncentracija organskih kiselina u kiselom tijestu prikazana je u tablici 7. Određivane su D(+) mliječna kiselina i L(-) mliječna kiselina na svježem kiselom tijestu od prethodnog dana i zamrznutom, pa odmrznutom nakon 4, 8 i 12 tjedana. U svježem kiselom tijestu i zamrznutom kiselom tijestu čuvanom 4 tjedna bilo je više D(+) mliječne kiseline, dok u zamrznutom kiselom tijestu čuvanom 8 i 12 tjedana bilo više L(-) mliječne kiseline. Objašnjenje za ove rezultate je to što D- oblik s vremenom prelazi u L-oblik. Iz tog razloga, nema razlike u ukupnoj količini mliječne kiseline (suma D i L) prije i nakon 12 tjedana skladištenja. Octene kiseline je bilo jako malo, na primjer nakon 8 tjedana skladištenja octena kiselina je iznosila samo 3% od količine mliječne kiseline. To je u skladu s istraživanjem Galle i sur. (2010) koji su fermentirali sirak i pšenično brašno sa *Weissella cibaria*-om i također su primjetili male količine octene kiseline u kiselom tijestu i zaključili su da *Weissella cibaria* sintetizira octenu kiselinu pentoza fosfatnim putem kao i ostale heterofermentativne bakterije.

4.2 FERMENTACIJSKA SPOSOBNOST KRUŠNOG TIJESTA

U tablici 8 su prikazani rezultati sa reofermentora za krušna tijesta sa 10%, 20% i 30% ječmenog kiselog tijesta u usporedbi s krušnim tijestom s nativnim ječmenim brašnom.

Tablica 8. Fermentacijska sposobnost krušnog tijesta u reofermentometru s dodatkom 10, 20 i 30% ječmenog kiselog tijesta skladištenog smrzavanjem 8 tjedana

% Kiselog tijesta	Bez kiselog tijesta	10	20	30
Hm-maksimalna visina tijesta (mm)	54,6	64,15	63,8	61,6
h-visina na kraju fermentacije (mm)	52,6	59,7	50,05	44,8
(Hm-h)/Hm (%)	3,7	6,9	21,65	27,35
T1- vrijeme potrebno za postizanje Hm (min)	130,5	119	108,5	108,65
H'm-maksimalna visina plina (mm)	106,9	105,45	115,95	123,1
T"1-vrijeme potrebno da se postigne H'm (min)	51	103,55	118,3	132,5
Ukupni volumen CO_2 (ml)	2639	2574	2756	2785,5
Volumen otpuštenog CO_2 (ml)	16	34	21	19
Volumen zadržanog CO_2 (ml)	2623	2540	2735	2766
Koeficijent zadržavanja plina (%)	99,4	98,7	99,25	99,3

Na maksimalnu visinu tijesta udio kiselog tijesta nije imao veliki utjecaj, ali njegova prisutnost je utjecala. Tijesto s dodatkom nativnog ječmenog brašna imalo je maksimalnu visinu 54,6 mm, a ono s 10% ječmenog kiselog tijesta 64,15 što pokazuje da dodatak kiselog tijesta je pozitivno utjecao na volumen i razvoj tijesta. Krušnom tijestu s 10% kiselog tijesta je bilo potrebno najdulje vrijeme za postizanje maksimalne visine, dok je tijestima s 20 i 30% kiselog tijesta bilo potrebno nešto kraće vrijeme. Tijesto s 10% kiselog tijesta je imao znatno manji pad visine

nakon 3 sata od tijesta s 30% kiselog tijesta, što ukazuje na slabiju glutensku mrežu kod većih količina kiselog tijesta.

Kruh sa dodanim kiselim tijestom ima veću maksimalnu visinu u odnosu na kontrolni kruh što upučuje na to da je kombinacija mikrostrukture tijesta i nastalog plina bolja u odnosu na kontrolni kruh. Egzopolisaharidi koje proizvodi *W. cibaria* su vjerojatno zaslužni za zadržavanje plina u tijestu i poboljšavaju stabilnost tako da ojačaju strukturu tijesta i interakcije u glutenskoj mreži (Tieking i Ganzle, 2005). Osim poboljšavanja svojstva tijesta i kruha egzopolisaharidi imaju prednosti za ljudsko zdravlje. Stimulirajući rast probiotičkih mikroorganizama u crijevima i sintezom kratkolančanih masnih kiselina egzopolisaharidi poboljšavaju rad crijeva i sudjeluju u prevenciji rasta patogenih bakterija (Ketabi i sur., 2011).

Udio kiselog tijesta utjecao je na maksimalnu visinu krivulje CO_2 - što je udio kiselog tijesta veći to je i maksimalna visina krivulje CO_2 bila veća. Krušno tijesto s nativnim ječmenim brašnom po maksimalnoj visini CO_2 bilo je slično krušnom tijestu s 10% dodanog kiselog tijesta. No, s povećanjem udjela kiselog tijesta produženo je i vrijeme potrebno da se postigne ta veća maksimalna visina. Količina kiselog tijesta također je imala utjecaja na ukupni volumen CO_2 nastao u fermentaciji i na volumen zadržanog CO_2. Veći ukupni volumen CO_2 nastao u fermentaciji su imala tijesta s većim udjelom kiselog tijesta (tijesto sa 20% i tijesto sa 30% kiselog tijesta). Isto vrijedi i za volumen zadržanog CO_2, jer iz krušnih tijesta s više kiselog tijesta manji volumen CO_2 je otpušten (iscurio) nego li iz onih s manje ili bez kiselog tijesta. Koeficijent zadržavanja plina je bio visok i na njega udio kiselog tijesta nije utjecao.

U tablici 9 su prikazani rezultati sa reofermentora za krušna tijesta sa 20% kiselog tijesta koje je skladišteno smrznuto do 12 tjedana. Najvišu visinu postiglo je krušno tijesta s dodatkom 20% kiselog tijesta smrznuto skladištenog 4 tjedna. Vrijeme smrznutog skladištenja kiselog tijesta nije utjecalo negativno na maksimalnu visinu krušnog tijesta. Naime tijesto skladišteno 12 tjedana je imalo veću maksimalnu visinu od svježeg. Varijacije u maksimalnoj visini tijesta i vremenu potrebnom za postizanje Hm bi se mogle pripisati i aktivnosti svježeg pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dodanom u zamjese čija aktivnost nije uvijek konstantna.

Tablica 9. Fermentacijska sposobnost krušnog tijesta s dodatkom 20% svježeg i smrznutog kiselog tijesta različitog vremena skladištenja

Vrijeme čuvanja kiselog tijesta	svježe	Smrznuto 4 tjedana	Smrznuto 8 tjedana	Smrznuto 12 tjedana
Hm-maksimalna visina tijesta (mm)	55,9	67,9	63,9	60,9
h-visina na kraju fermentacije (mm)	41,8	58	55,7	54,4
(Hm-h)/Hm (%)	25,2	13,4	12,8	10,7
T1- vrijeme potrebno za postizanje Hm (min)	100,3	117	97,3	109
H'm-maksimalna visina plina (mm)	105,7	112,1	115,9	107,7
T"1-vrijeme potrebno da se postigne H'm (min)	133,3	139,3	114	117
Ukupni volumen CO_2 (ml)	2463	2496	2778	2702
Volumen otpuštenog CO_2 (ml)	30	38	22	62
Volumen zadržanog CO_2(ml)	2433	2458	2757	2639
Koeficijent zadržavanja plina (%)	98,8	98,5	99,2	97,7

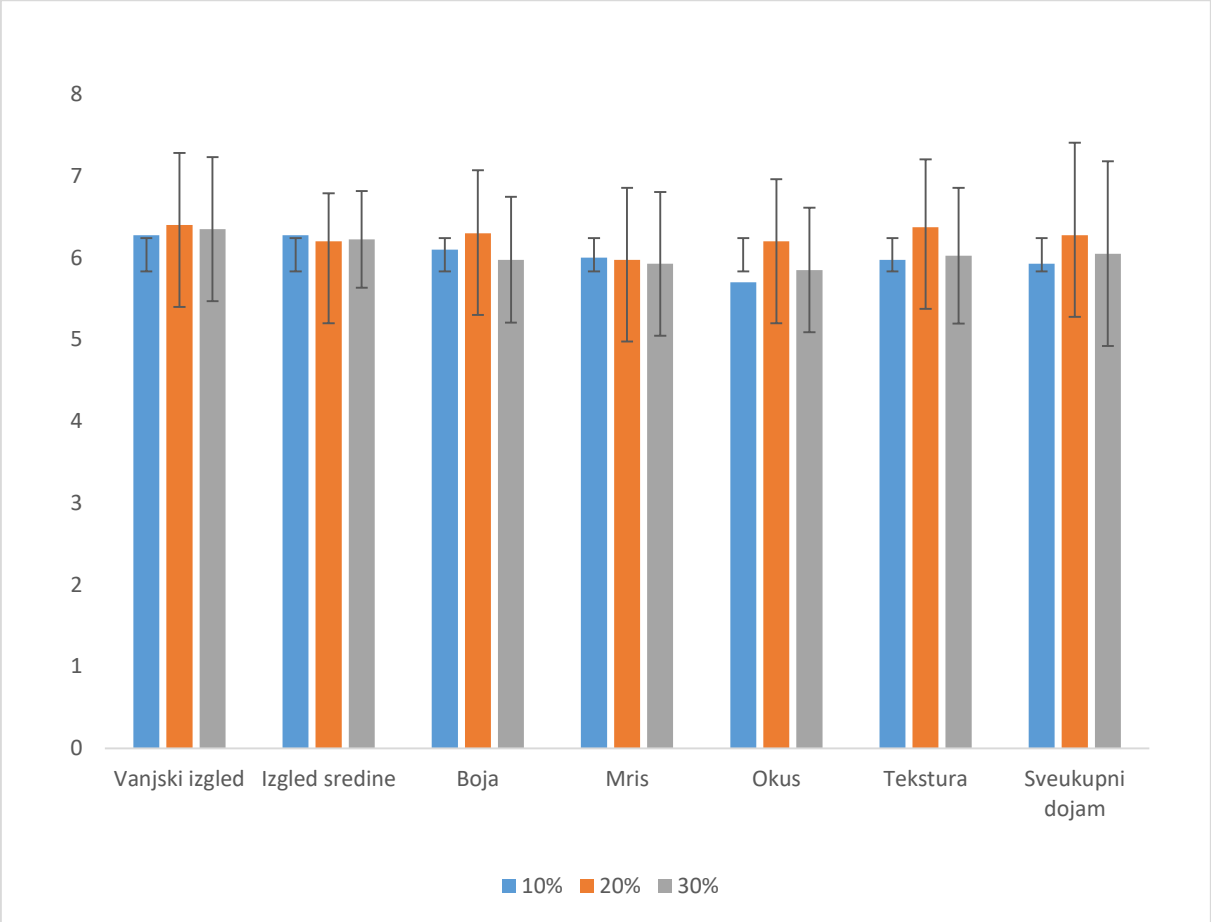
Tijesta s kiselim tijestom skladištenim 4 i 8 tjedana su imala nešto veće maksimalne visine krivulje CO_2 (H'm) od tijesta sa svježim kiselim tijestom i skladištenim 12 tjedana. U skladu s time najviše vremena da se postigne H'm je trebalo tijestu s kiselim tijesto skladištenim 4 tjedna, ali nasuprot tome tijestu sa svježim kiselim tijestom koji ima manji H'm je potrebno više vremena nego tijestu sa kiselim tijestom skladištenim 8 i 12 tjedana. U tijestima s dulje skladištenim kiselim tijestima (8 i 12 tjedana) određen je veći ukupni volumen CO_2 i veći volumen zadržanog CO_2. Količina oslobođenog CO_2 najviše ovisi o aktivnosti kvasca, a obzirom da je dodan svježi pekarski kvasac s tržišta, njegova aktivnost nije uvijek ista. *Weissella cibaria* sintetizira egzopolisaharide koji poboljšavaju stabilnost tijesta tijekom

skladištenja smrzavanjem (Tieking i Gänzle, 2005). Tijestu s ječmenim brašnom je također određen veći ukupni volumen CO_2 (tablica 8). To ukazuje na moguće antagonističko djelovanje *W. cibaria*-e i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, jer je s duljim vremenom skladištenja bio manji broj živih laktobacila. Vrijeme skladištenja nije utjecalo na koeficijent zadržavanja plina. Može se zaključiti kako skladištenje zamrzavanjem i vrijeme skladištenja kiselog tijesta nije utjecalo negativno na fermentacijske sposobnosti krušnog tijesta.

4.3 SVOJSTVA KRUHA S RAZLIČITIM UDJELOM JEČMENOG KISELOG TIJESTA

4.3.1 Senzorska svojstva kruha

Za prikazivanje rezultata senzorske analize dodijeljene su ocjene od 1 do 7, 1 za izrazito mi se ne sviđa, a 7 za izrazito mi se sviđa. Rezultati senzorske analize su prikazani na slici 10. Prikazane su srednje vrijednosti ocjena i standardna devijacija.



Slika 10. Senzorska svojstva kruha s različitim udjelom kiselog tijesta

Najbolje ocijene za najviše karakteristika je dobio kruh s 20% kiselog tijesta, i to za vanjski izgled, boju, okus, teksturu i ukupni dojam. Najbolji miris i izgled sredine je imao kruh sa 10% kiselog tijesta. Od 40 ispitanika njih 19 (48%) je ocijenilo kruh s 20% kiselog tijesta najboljim.

4.3.2 Boja kore i sredine peciva

U tablici 10 su prikazane srednje vrijednosti rezultata za boju gornje kore, dna i sredine kruha s 10%, 20% i 30% kiselog tijesta.

Tablica 10. Srednje vrijednosti svojstava boje kore i sredine kruhova sa 10, 20 i 30 % smrznutog kiselog tijesta skladištenog 8 tjedana

	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)
Kora gore	57,65 (±1,87)	17,08 (±0,64)	35,37 (±0,89)	39,28 (±0,9)	64,22 (±0,92)
Kora dno	54,94 (±2,17)	17,46 (±0,71)	31,76 (±0,77)	36,25 (±0,57)	61,18 (±1,39)
Sredina	53,26 (±1,07)	1,69 (±0,20)	18,08 (±0,55)	18,16 (±0,56)	84,66 (±0,50)
Kora gore	52,06 (±3,36)	17,80 (±0,80)	33,31 (±1,24)	37,78 (±0,79)	61,86 (±1,87)
Kora dno	50,23 (±2,05)	17,46 (±0,46)	29,52 (±1,30)	34,30 (±1,27)	59,38 (±0,90)
Sredina	48,52 (±0,99)	1,82 (±0,31)	17,12 (±0,73)	17,22 (±0,74)	83,94 (±0,88)
Kora gore	53,65 (±3,75)	18,36 (±0,53)	33,07 (±2,13)	37,85 (±1,68)	60,89 (±2,11)
Kora dno	58,3 (±1,94)	15,91 (±0,71)	21,09 (±2,02)	26,43 (±1,88)	52,86 (±2,24)
Sredina	62,24 (±0,62)	2,78 (±0,2)	17,46 (±0,32)	17,67 (±0,35)	80,96 (±0,58)

Rezultati za *L**, *a** i h vrijednost su se statistički značajno razlikovali između korice kruha sa 10% kiselog tijesta i 30% kiselog tijesta, dok ostali uzorci se nisu razlikovali međusobno. To je uzrokovano većim udjelom šećera i slobodnih aminokiselina koje sudjeluju u Maillardovim reakcijama posmeđivanja kore (Helou i sur., 2015). Vrijednosti *b** i *c** se nisu statistički značajno razlikovale niti za jedan uzorak.

*L**, *a**, *b**, *c** i h vrijednosti za dno kruha su se razlikovale između kruha sa 10% kiselog tijesta i 30% kiselog tijesta i između kruha s 20% kiselog tijesta i 30% kiselog tijesta.

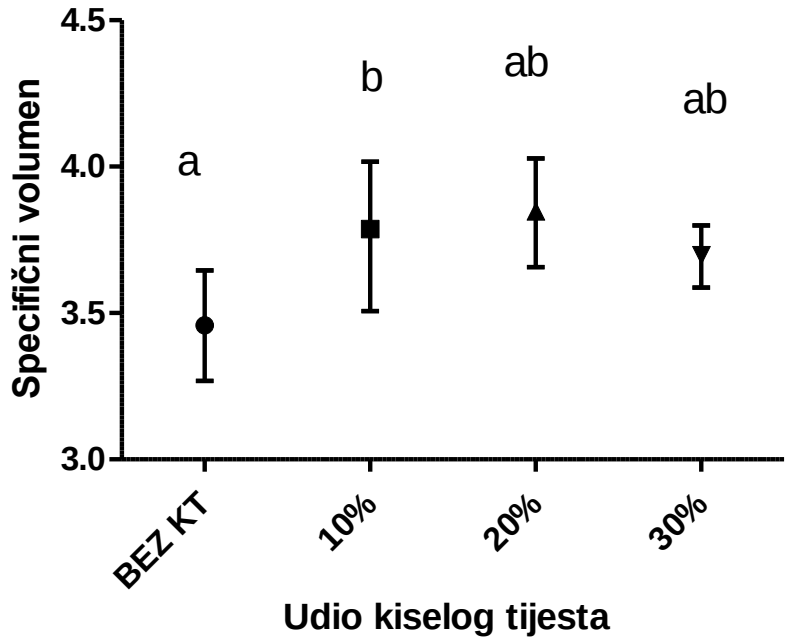
Sredina kruhova s 10%, 20% ili 30% kiselog tijesta nije se statistički značajno razlikovala u parametrima boje.



Slika 11. Vanjski izgled kruha s 10% kiselog tijesta (lijevo), kruha s 20% kiselog tijesta (sredina) i kruha s 30% kiselog tijesta (desno) (Vlastita fotografija)

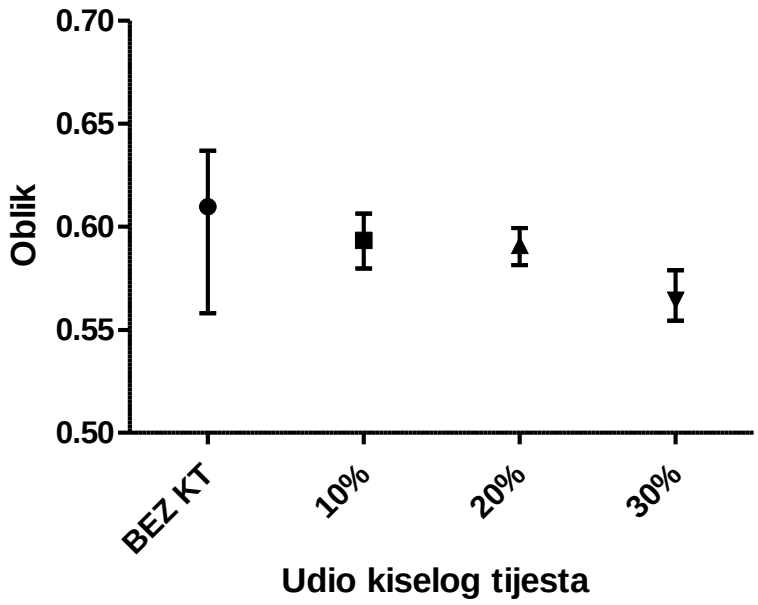
Na slici 12 su fotografije sva tri uzorka na kojima se vide mrlje od pečenja tj. boja korice je neujednačena na kruhovima sa 30% kiselog tijesta, što i svakako utjecalo na odluku panelista. Također je vidljivo da je kora kruha s 30% kiselog tijesta tamnija od onog sa 10%.

4.3.3 Specifični volumen i oblik kruha



Slika 12. Utjecaj udjela kiselog tijesta na specifični volumen kruha

Specifični volumeni kruhova su prikazani na slici 12. Statistički značajna razlika postoji samo između uzorka bez kiselog tijesta i onog sa 20% kiselog tijesta. Kruhovi s 10% i s 20% kiselog tijesta su imali najveći specifični volumen, a kruh s 30% nešto manji, što je i u korelaciji s maksimalnom visinom tijesta tijekom fermentacije na reofermentometru. Ipak, specifični volumeni svih uzoraka su bili slični. Ovisno o količini dodanog kiselog tijesta i starter kulturi upotrijebljenoj za fermentaciju ono može utjecati pozitivno ili negativno utjecati na specifični volumen kruha. U pšeničnom kruhu dodatak kiselog tijesta je ograničen, jer previše kiselog tijesta negativno utječe na specifični volumen radi proteolitičke razgradnje glutena (Barber i sur., 1992). Torrieri i sur. (2014) su pokazali da kad se koriste sojevi bakterija mliječne kiseline koji luče egzopolisaharide, tada se može dodati i 20 -30% kiselog tijesta bez negativnog utjecaja na volumen, što je u skladu s našim rezultatima. Naime, proizvodnja egzopolisaharida može nadomjestiti negativan učinak zakiseljavanja, a soj *Weisella cibaria-e* koji smo koristili u našem radu u prisutnosti saharoze ima mogućnost njihove sinteze.

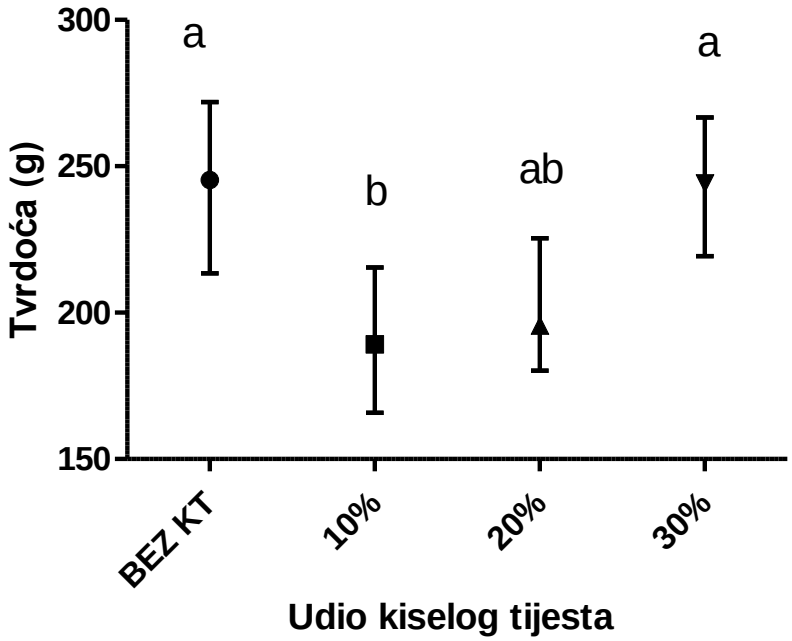


Slika 13. Oblik kruha ovisno o udjelu kiselog tijesta

Oblik kruha je prikazan na slici 13. Za oblik kruha ANOVA i Tukey post hoc su pokazali statistički značajnu razliku između uzorka s 30% kiselog tijesta i onog bez kiselog tijesta. Između ostalih uzoraka nije bilo statistički značajne razlike. Kruh s 30% je imao manji omjer visine i širine iz razloga što kiselo tijesto oslabi glutensku mrežu, jer se tijekom fermentacije kiselog tijesta aktiviraju cerealne proteaze.

4.3.4 Tekstura sredine kruha

Tvrdoća sredine uzoraka kruha je prikazana grafički na slici 14. Kruh s 30% kiselog tijesta nije se razlikovao u tvrdoći sredine od kruha bez kiselog tijesta, dok su kruhovi s 10 i 20% kiselog tijesta bili značajno mekši.



Slika 14. Tvrdoća sredine kruha bez i sa 10, 20 i 30% kiselog tijesta

To je u korelaciji sa podacima za specifični volumen, jer kruhovi s većim volumenom su u pravilu mekši, a kruhovi manjeg volumena su zbijeniji i tvrđi. Ako ove rezultate usporedimo sa rezultatima sa reofermentora možemo zaključiti da se rezultati podudaraju. Na slici 14 su prikazani poprečni presjeci kruha s nativnim ječmenim brašnom i kruha s 20% kiselog tijesta. Vidljivo je kako kruh s 20% kiselog tijesta ima veću poroznost i promjer mjehurića dok je sredina kruha bez kiselog tijesta zbijenija. Tekstura sredine kruha ovisi o veličini, obliku i rasporedu mjehurića plina, koji su povezani sa ponašanjem glutenske mreže tijekom ekspanzije CO_2 u fermentaciji i pečenju (Fessas i Schiraldi, 1998).



Slika 15. Poprečni presjek kruha bez kiselog tijesta (lijevo) i kruha s 20% kiselog tijesta (desno) (vlastita fotografija)

Obzirom da je kruh sa 20% kiselog tijesta dobio najviše senzorske ocjene za vanjski izgled, boju, okus, teksturu i sveukupni dojam, da mu je sredina i instrumentalno bila najmekša, a volumen jedan od najvećih, i da je cilj bio dobiti kruh sa što više ječmenog brašna, receptura s 20% kiselog tijesta je izabrana za daljnje istraživanje. Kruh s 30% kiselog tijesta nije izabran zbog njegove zbijenije teksture, nešto manjeg volumena i boje kore koja nije bila ujednačena i bila je tamnija je od onog što većina potrošača očekuje.

4.4 UTJECAJ SKLADIŠTENJA KISELOG TIJESTA NA SVOJSTVA KRUHA

U ovom poglavlju su prikazani rezultati mjerenja specifičnog volumena, oblika, i teksture kruha sa svježim kiselim tijestom i sa kiselim tijestom koje je bilo skladišteno 4, 8 ili 12 tjedana u smrznutom.

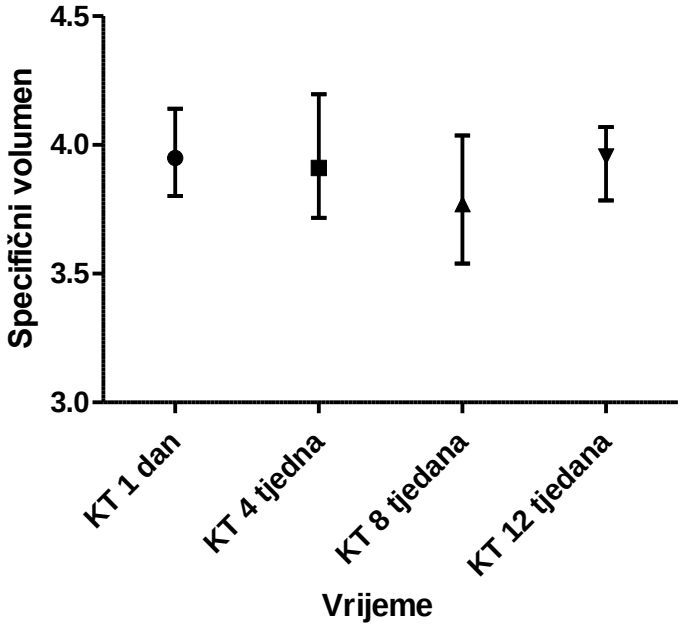
4.4.1 Prinos tijesta, prinos kruha, prinos volumena i gubitak pečenjem

Tablica 11. Prinos tijesta, prinos kruha, prinos volumena i gubitak pečenjem

	Bez kiselog tijesta	Sa svježim kiselim tijestom	Sa kiselim tijestom nakon 4 tjedna čuvanja	Sa kiselim tijestom nakon 8 tjedna čuvanja	Sa kiselim tijestom nakon 12 tjedna čuvanja
Prinos tijesta (%)	195,12	196,60	196,60	196,60	196,60
Prinos kruha (%)	172,41 (±0,91)	172,51 (±12,32)	172,27 (±0,77)	171,77 (±0,87)	172,37 (±0,96)
Prinos volumena (%)	595,86 (±15,59)	679,20 (±25,70)	671,70 (±36,44)	645,59 (±39,25)	679,73 (±23,63)
Gubitak pečenjem (%)	11,64 (±0,5)	12,25 (±0,25)	12,38 (±0,39)	12,63 (±0,44)	12,32 (±0,49)

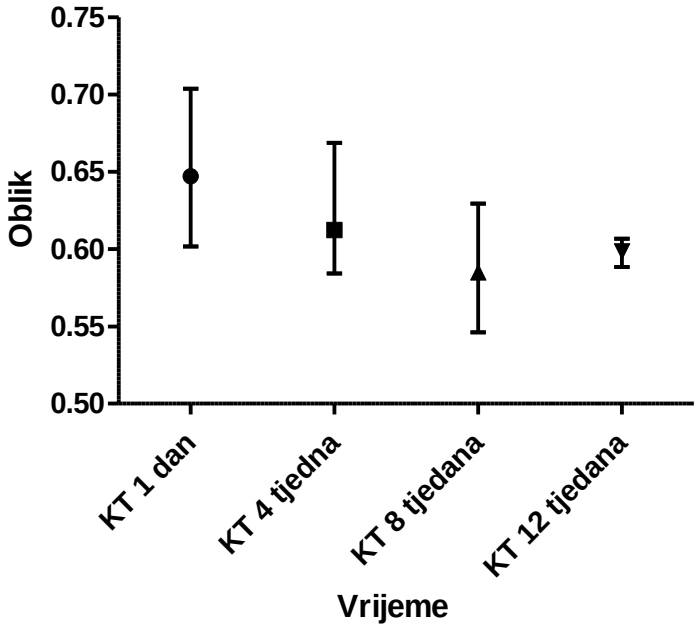
U tablici 11 su podaci za prinos tijesta, prinos kruha, prinos volumena i gubitak pečenjem za uzorke s nativnim ječmenim brašnom, sa svježim kiselim tijestom i zamrznutim kiselim tijestom koje je bilo skladišteno 4, 8 i 12 tjedana. Na prinos kruha vrijeme skladištenja kiselog tijesta i njegovo prisustvo nije imalo utjecaja. Prinos volumena je bio nešto manji kod kruha s nativnim ječmenim brašnom nego li kod kruha s ječmenim kiselim tijestom, ali vrijeme skladištenja kiselog tijesta nije utjecalo na prinos volumena. Gubitak pečenjem je manji za kruh s nativnim ječmenim brašnom, ali vrijeme skladištenja kiselog tijesta nije utjecalo.

4.4.2 Specifični volumen i oblik kruha sa skladištenim kiselim tijestom



Slika 16. Specifični volumen kruha sa skladištenim kiselim tijestom

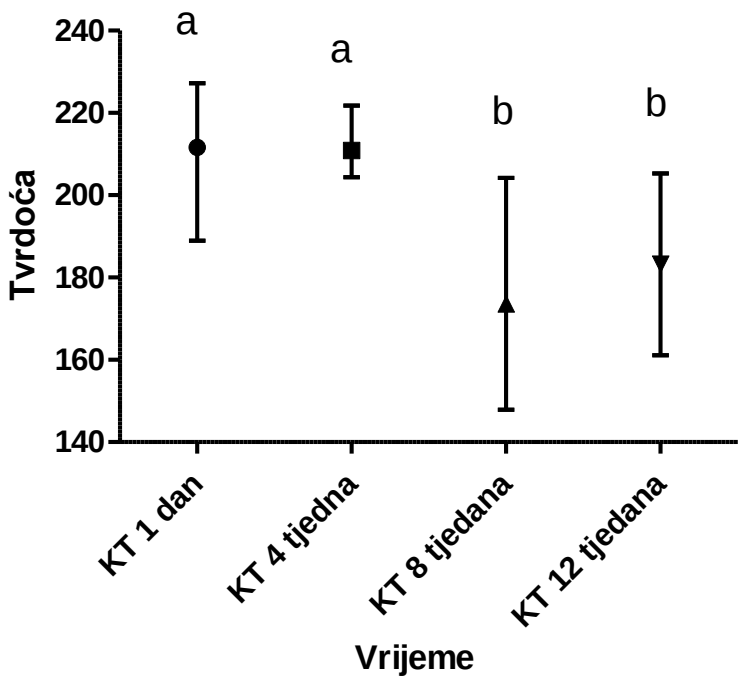
Na slici 16 su prikazani specifični volumeni kruhova s kiselim tijestom koje je bilo smrznuto skladišteno 4, 8 i 12 tjedana. Između specifičnih volumena kruhova nije bilo značajne razlike što ukazuje na to da vrijeme skladištenja i zamrzavanje kiselog tijesta nema utjecaj na volumen kruha i time potvrđuje rezultate s reofermentora (tablica 9).



Slika 17. Oblik kruha sa skladištenim kiselim tijestom

Oblik kruha s dodanim kiselim tijestom nakon smrznutog skladištenja je prikazan na slici 17. Između oblika kruhova nije bilo statistički značajne razlike, iz čega se može zaključiti da smrzavanje i vrijeme skladištenja kiselog tijesta nije utjecalo na oblik kruha. Oblik kruha ovisi o čvrstoći glutenske mreže, kruh je spljošteniji ako je došlo do hidrolize glutena i povećane aktivnosti amilaze tijekom fermentacije kiselog tijesta (Gobbetti, 1998).

4.4.3 Tekstura sredine kruha sa uskladištenim kiselim tijestom



Slika 18. Tekstura sredine kruha s kiselim tijestom koje je bilo skladišteno određeno vrijeme

Rezultati teksture sredine kruha s dodatkom kiselog tijesta su prikazani na slici 18. Statistički značajne razlike između svježeg kiselog tijesta i kiselog tijesta koje je skladišteno 4 tjedna nije bilo, kao ni između uzoraka koji su bili skladišteni 8 i 12 tjedana. Između ostalih uzoraka je bilo statistički značajne razlike. Kruhovi koji su skladišteni manje vremena odnosno 1 dan i 4 tjedna imaju veću tvrdoću (12-16%) od onih koji u duže skladišteni (8 i 12 tjedana).

Koliko je poznato do sada nisu rađena istraživanja o utjecaju skladištenja ječmenog kiselog tijesta fermentiranog sa čistom kulturom *Weissella cibaria*-om u zamrznutom obliku na i njegov utjecaj na gotovi proizvod kruh. Rezultati ovog rada ukazuju na mogućnost primjene kiselog tijesta koje je bilo smrznuto skladišteno u industrijskoj proizvodnji u kojoj se dodaje pekarski kvasac za dizanje, a kiselo tijesto kao poboljšivač. Rezultati otvaraju nove mogućnosti za daljnja istraživanja i implementaciju u pekarskoj industriji.

5 ZAKLJUČCI

1. U ovom radu fermentirano svježe ječmeno kiselo tijesto sa starter kulturom *Weisella cibaria* je imalo tipične karakteristike (pH, titracijska kiselost, broj živih stanica) za kisela tijesta. Tijekom smrznutog skladištenja od 12 tjedana, ukupna kiselost je neznatno porasla, a broj živih stanica se značajno smanjivao.

2. Ispitan je utjecaj dodatka ječmenog kiselog tijesta fermentiranog sa starter kulturom *Weisella cibaria* u količini od 10-30% na kvalitetu miješanog kruha. Određen je optimalni udio ječmenog kiselog tijesta od 20%, obzirom na najveći volumen, najmekšu teksturu i najbolje senzorske ocjene miješanog kruha.

3. Kruh s dodanim ječmenim kiselim tijestom u količini do 20% boljeg je volumena i teksture u odnosu na kruh s nativnim ječmenim brašnom.

4. Skladištenje zamrznutog kiselog tijesta do 12 tjedana ne utječe na fermentacijsku sposobnost krušnog tijesta, volumen i oblik kruha, ali povoljno utječe na njegovu teksturu.

5. Direktnom primjenom zamrznutog ječmenog kiselog tijesta u kruh s dodanim kvascem se može dobiti funkcionalni pekarski proizvod dobre kvalitete. Zamrzavanjem kiselog tijesta bi se bitno pojednostavila proizvodnja kruha u pekarskom obrtu i industriji, jer bi stalno imali na raspolaganju kiselo tijesto poznate kvalitete.

6 LITERATURA

AACC International Approved Methods (2000) Method 74-09 Measurement of Bread Firmness by Universal Testing Machine i AACC 10-05.01 Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A.

Andersson, A. A. H., Aman, P. (2008) Functional barley products. U: Technology of functional cereal products (Hamker, B.R.,) Woodhead publishing limited, Cambrige, str. 261-276

Anonymous 1 (2016) Udio zemalja u proizvodnji ječma 2002 godine
http://www.eastagri.org/sector_detail.asp?id=44
Pristupljeno 05.09.2016

Anonymous 2 (2016) Zrno ječma s prednje i stražnje strane
http://www.grain-gallery.com/en/barley/images
Pristupljeno 05.09.2016

Anonymous 3 (2016) Strukturni prikaz β-glukanahttps://lh3.googleusercontent.com/IxuHQRlQboqofeCR1aHnwx9MAq3XGh97G0NKg_YJN_U2siiQ_JKRdGEEJNBbKewlIRJC=s128
Pristupljeno 30.08.2016.

Anonymous 4 (2016) Kiselo tijesto
http://pioneersettler.com/diy-recipe-sourdough-starter
Pristupljeno: 06.09.2016.

Anonymous 5 (2016) Weissella cibaria pod elektronskim mikroskopomhttp://pioneersettler.com/diy-recipe-sourdough-starter/
Pristupljeno: 06.09.2016.

Anonymous 6, 2016 Krivulja razvoja i oslobađanja plinova Anonymous 6, http://www.chopin.fr/en/
Pristupljeno:06.09.2016.

Barber, B., Ortola, C., Barber, S., Fernandez, F. (1992). Storage of packaged whitebread. III. Effect of sourdough and addition of acids on bread characteristics. *Int. J. Food Sci. Tech*, **194**, 442-449.

Bruce, B., Spiller, G.A., Klevay, L.M., Gallagher, S.K. (2000) A diet high in whole and unrefined foods favorably alters lipids, antioxidant defenses, and colon function. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**, 61–67.

Chatenoud, L., Tavani, A., La Vecchia, C., Jacobs, D.R., Negri, E., Levi, F., Franceschi, S. (1998) Whole-grain food intake and cancer risk, *Int. J Cancer*, **77**, 24–28.

Collar, C. (2008) Novel high-fibre and whole grain breads. U: Technology of functional cereal products (Hamaker, B.R., ured.) Woodhead publishing limited, Cambrige, str. 184-24.

Ćurić, D., Novotni, D., Smerdel, B. (2014) Bread making. U: Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products (Pinho Ferreira Guine, R., Reis Correia P. M.), CRC Press, str. 149-175.

Decock, P., Cappelle, S. (2005) Bread technology and sourdough technology. *Trends Food sci. tech.* **16**, 113-120

Fessas, D., Schiraldi, A. (1998) Texture and staling of wheat bread crumb: effect of water extractable proteins and pentosans. *Thermochimica Acta*, **323**, 17-26.

FDA-Food and Drug Administration (2006) FDA allows barley products to claim reduction in risk of coronary heart disease, Federal Register, **70**, 76150–76162.

Fonesca, F., Beal, C., Corrieu, G. (2001) Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology* **43,** 189–198

Fonseca, F., Béal, C., Corrieu, G. (2000) Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J. Dairy Res.* **67,** 83–90.

Foschino, R., Fiori, E., Galli, A. (1996) Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. *J. Dairy Res.* **63,** 295–303.

Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., Franz, C. M. A. P. (2015) The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol.* **6**, 1.

Galle, S., Schwab, C., Arendt, E., Gantle, M., (2010) Exopolysaccharide-forming Weissella strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 834-5843,

Ganzle, M. G., Vogel, R. F. (2003) Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of Lactobacillus reuteri in an industrial sourdough fermentation. Int. J. Food Microbiol., **80**, 31-45.

Gill, C. (2014) Freezing of foods damage to microbial cells. *Food Science*, **4**, 964-967.

Granato, D., Masson, M. L. (2010). Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. C*iencia Tecnol Alime*, **30**, 1090–1096.

Harth, H., Van Kerrebroeck, S., De Vuyst, L. (2016) Community dynamics and metabolite target analysis of spontaneous, backslopped barley sourdough fermentations under laboratory and bakery conditions. *Int J. Food Microbiol.* **228**, 22-32.

Helou, C., Jacolot, P., Niquet-Léridon, C., Gadonna-Widehem, P., Tessier, F. J. (2015) Maillard reaction products in bread: A novel semi-quantitative method for evaluating melanoidins in bread, *Food Chem*, **190**, 904-911.

Megazyme
https://www.megazyme.com/
Pristupljeno:29.07.2016.

Katina, K., Sakmenkallio-Martila, M., Partanen, R., Forselli, P., Autio, K. (2006) Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *Food Sci. Technol-leb,* **39,** 479-491.

Ketabi, A., Dieleman, L. A., Gänzle, M. G. (2011): Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats, *J. Appl. Microbiol*. **110**, 1297-1306.

Koehler, P., Wieser, H. (2013) Chemistry of Cereal Grains. U: Handbook on Sourdough Biotechnology (Gobetti, M., Ganzle, M., ured.), Springer, New York, str. 11-46.

Lam, K., Cheung, P.C. (2013) Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre,*1-91.

Lattanzi, A., Minervini, F., Di Cagno, R., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G. (2013). The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *Int. J. Food Microbiol*. **8**, 71-79.

Lattanzi, A., Minervini, F., Gobetti, M., (2014) Assessment of comparative methods for storing type-I wheat sourdough. *Food Sci Technol,* **59,** 948-955.

Lefebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., Fontagne-Faucher, C. (2002) Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process. Lebensm-Wiss. Technol. 35, 407-414.

Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb.

Maričić, N. (2015) Utjecaj smrzavanja na svojstva kiselog tijesta, Diplomski rad (PBF).

Mariotti, M., Garofalo, C., Aquilanti, L., Osimani, A., Fangaro, L., Tavoletti, T., Hager, A.S., Clementi, F. (2014) Barley flour exploitation in sourdough bread-making: A technological, nutritional and sensory evaluation. *Food. Sci. Technol.,* **59,** 973-980.

Newman, K.J., Newman, C.J. (2008) Barley for food and health Science, Technology and Products, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Novotni, D., Čukelj, N., Smerde, B., Ćurić, D. (2013) Quality attributes and firming kinetics of partially baked frozen wholewheat bread with sourdough. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **48**, 2133-2142.

Pagani, M. A., Bottega, G., Mariotti, M. (2013) Technology of Baked Goods. U: Handbook on Sourdough Biotechnology (Gobetti, M., Ganzle, M., ured.), Springer, New York, str. 47-85.

Pathare, P.B., Opara, U.L., Al-Julanda Al-Said, F. (2012). *Food Bioprocess. Technol.*, **24**, 36-60

Pejcz, E., Gil, Z., Wojciechowicz-Budzisz, A., Połtorak, M., Romanowska, A. (2015) Effect of technological process on the nutritional quality of naked barley enriched rye bread. *J. Cereal. Sci.*, **65**, 215-219.

Rieder, A., Holtekjølen, A. K., Sahlstrøm, S., Moldestad, A. (2011) Effect of barley and oat flour types and sourdoughs on dough rheology and bread quality of composite wheat bread. *J. Cereal Sci.*, **56**, 44-52.

Serrazanetti, D., Gottardi, D., Montanari, C., Gianott., A., (2013) Dynamic Stresses of Lactic Acid Bacteria Associated to Fermentation Processes. U: Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes (Kongo, M.), InTech., str. 539-570.

Slavin, J.L. (2004) Whole grains and human health, *Nutr. Res. Rev.*, **17**, str.99–110.

Sullivan, P., Arendt, E., Gallagher, E. (2012) The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods. *Trends Food Sci Tech.* **11**, 1-11.

Tieking, M., Gänzle, M. G. (2005) Exopolysaccharides from cereal associated lactobacilli, *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 79–84.

Torrieri, E., Pepe, O., Ventorino, V., Masi, P., Cavella, S.,(2014) Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *Food Sci. Technol.* **56**,508-516.

Truswell, A.S. (2002) Cereal grains and coronary heart disease, *Eur. J. Clin. Nut*r., **56**, 1–14.

Ullrich, E.S. (2011) Barley: production, improvement and uses, Blackwell Publishing Ltd, str. 3-5.

Vrana Špoljarić, I., Maričić, N., Novotni, D., Ajredini, S., Voučko, B., Ćurić, D. (2015) Characteristics of barley sourdough during frozen storage // 8th International Congress Flour-Bread ’15 and 10th Croatian Congress of Cereal Technologists Brašno-Kruh '15: Book of Abstracts (Ur. Koceva Komlenić, D.) Osijek: Grafika d.o.o. str 35 (poster)

Wolter, A., Hagre, A., Zannini, E., Czerny, M., Ardendt, E.K. (2013) Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads. *Int. J. Food. Microbiol*, **172,** 83-91.