

Utjecaj brašna žutog graška i uvjeta kiseljenja tijesta na udjel šećera i kiselina u fazama proizvodnje bezglutenskog kruha

Mačešić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:984680>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 27. rujan 2017.

Kristina Mačešić

631/PI

**UTJECAJ BRAŠNA ŽUTOG
GRAŠKA I UVJETA KISELJENJA
TIJESTA NA UDJEL ŠEĆERA I
KISELINA U FAZAMA
PROIZVODNJE
BEZGLUTENSKOG KRUHA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Krpan, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Saše Drakula, mag. ing.

Zahvaljujem se doc.dr.sc. Marini Krpan na savjetima i razumijevanju tijekom pisanja diplomskog rada, na stručnom vodstvu i pruženoj prilici.

Zahvaljujem se mag.ing. Saši Drakula na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada kao i tijekom pisanja istog.

Zahvaljujem se svim kolegicama u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na ljubaznosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se kolegici Maji Malnar na savjetima i podršci tijekom pisanja rada. Mojim roditeljima, braći i prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ BRAŠNA ŽUTOG GRAŠKA I UVJETA KISELJENJA TIJESTA NA UDJEL ŠEĆERA I KISELINA U FAZAMA PROIZVODNJE BEZGLUTENSKOG KRUHA

Kristina Mačesić, 631/PI

Sažetak: Bezglutenski kruh ima loša reološka i senzorska svojstva koja se nastoje poboljšati dodatkom kiselog tijesta i brašna žutog graška. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj dodatka brašna žutog graška i primjene različitih bakterija mliječne kiseline (BMK) za pripremu kiselog tijesta na udjel šećera, organskih kiselina i ukupnu kiselost u svim fazama proizvodnje bezglutenskog kruha. Koncentracija glukoze, fruktoze, saharoze, mliječne i octene kiseline određena je u uzorcima kiselog tijesta, krušnog tijesta prije i poslije krušne fermentacije te kruha i kore kruha HPLC metodom, a ukupna kiselost titracijom s NaOH u uzorcima kiselog tijesta i kruha. Dodatkom brašna graška se, kod većine uzoraka, tijekom svih faza proizvodnje kruha koncentracija fruktoze, saharoze i organskih kiselina povećava, a glukoze smanjuje. Primjena različitih BMK značajno utječe na promjenu koncentracije analiziranih šećera i kiselina. Brašno žutog graška utječe na smanjenje fermentabilnog koeficijenta i povećanje ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha.

Ključne riječi: bezglutenski kruh, brašno žutog graška, kiselo tijesto, organske kiseline, šećeri

Rad sadrži: 47 stranica, 29 slika, 7 tablica, 69 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. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Mirjana Hruškar
2. Doc.dr.sc. Marina Krpan
3. Doc.dr.sc. Dubravka Novotni
4. Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček

Datum obrane: 27. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

EFFECT OF PEA FLOUR ADDITION AND FERMENTATION CONDITIONS ON THE FERMENTABLE SUGARS AND ORGANIC ACIDS CONTENT DURING GLUTEN-FREE BREADMAKING PROCESS

Kristina Mačeschić, 631/PI

Abstract: Gluten-free bread has poor rheological and sensory properties that can be improved with addition of sourdough and yellow pea flour. The aim of this study was to determine the effect of pea flour addition and addition of sourdough prepared with different lactic acid bacteria (LAB) on the fermentable sugars, organic acids content and total titrable acidity (TTA) during all stages of gluten-free breadmaking process. Concentration of fructose, glucose, sucrose, lactic, and acetic acid was determined in sourdough, bread dough before and after fermentation, bread and bread crust samples by HPLC method, while TTA was determined by titration with NaOH in sourdough and bread samples. Pea flour addition, in most of analyzed samples during all stages of breadmaking, increases concentration of fructose, sucrose and organic acids, while reduces concentration of glucose. The application of different LAB significantly affects sugar and acid content of analysed samples. Pea flour addition lowers fermentation quotient and increases TTA of sourdough and bread.

Keywords: gluten-free bread, organic acids, sourdough, sugars, yellow pea flour

Thesis contains: 47 pages, 29 figures, 7 tables, 69 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. Marina Krpan, Assistant professor

Technical support and assistance: Saša Drakula, BSc

Reviewers:

1. PhD. Mirjana Hruškar, Full professor
2. PhD. Marina Krpan, Assistant professor
3. PhD. Dubravka Novotni, Assistant professor
4. PhD. Sanja Vidaček, Associate professor

Thesis defended: 27 September 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Bezglutenski kruh	2
2.2. Utjecaj dodatka brašna graška na kvalitetu kruha	5
2.3. Kiselo tijesto	6
2.3.1 Metabolizam BMK i kvasaca tijekom procesa kiseljenja tijesta	8
2.4. Metode određivanja šećera i kiselina u kiselom tijestu i kruhu.....	10
2.4.1. HPLC analiza	11
2.5. Ukupna kiselost	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Uzorci	14
3.2. Određivanje šećera i kiselina	15
3.2.1. Kvalifikacija i kvantifikacija šećera i kiselina	18
3.3. Određivanje ukupne kiselosti	21
3.4. Obrada podataka	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. Udjel šećera i kiselina.....	23
4.1.1. Udjel šećera u kiselom tijestu	23
4.1.2. Udjel šećera u krušnom tijestu prije fermentacije.....	25
4.1.3. Udjel šećera u krušnom tijestu na kraju fermentacije	27
4.1.4. Udjel šećera u kruhu (sredina i kora kruha).....	30
4.1.5. Udjel šećera u kori kruha	32
4.1.6. Udjel mliječne i octene kiseline u kiselom tijestu	34
4.2. pH i ukupna kiselost	37
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Bezglutenski kruh pripravlja se od sirovina koje ne sadrže protein gluten. Takav kruh pripada skupini proizvoda za posebne prehrambene potrebe i namijenjen je osobama oboljelim od celijakije (Pravilnik, 2004). Iako je njegova konzumacija prvenstveno namijenjena oboljelim osobama, zbog prehrambenog trenda sve više ljudi konzumira bezglutenske proizvode. S obzirom da ne sadrži protein gluten koji je odgovoran za tvorbu glutenske mreže unutar tijesta, bezglutenski kruh nema dobra senzorska svojstva. U nastojanju da se ta svojstva poboljšaju, znanstvenici istražuju recepture i dodatke kruhu kako bi bio prihvatljiviji od strane potrošača. Neki od dodataka kruhu mogu poboljšati njegova tehnološka i nutritivna svojstva. Kiselo tijesto se postavlja kao jedno od rješenja, a provedena istraživanja pokazuju dobre rezultate (Moroni i sur., 2009).

Kiselo tijesto je mješavina brašna i vode koja fermentira uz prisutnost bakterija mliječne kiseline (BMK) (De Vuyst i Neysens, 2005). Osim BMK, fermentaciju provode i kvasci, a produkti fermentacije utječu na karakteristična svojstva kruha. Dodatkom kiselog tijesta u krušni zamjes dobiva se proizvod boljeg okusa i mirisa, prehrambenih svojstava, teksture i produženog roka trajnosti (Corsetti i Settanni, 2007; Moroni i sur., 2009). Udjel šećera i organskih kiselina mijenja se tijekom faza proizvodnje kruha. Njihov udjel u krušnom tijestu bitan je za aromu i trajnost kruha (Belitz i sur., 2013; Mrvčić i sur., 2011). Primjena kiselog tijesta u proizvodnji pekarskih proizvoda mogla bi biti u budućnosti dobra alternativa aditivima koji se često dodaju u pripremi.

Brašno od žitarica može se zamijeniti u određenom udjelu s brašnom mahunarki i na taj se način mogu poboljšati nutritivna svojstva pekarskih proizvoda (Hsu i sur., 1980). Žuti grašak (lat. *Pisum sativum L.*) bogat je proteinima, vlaknima, mineralnim tvarima i vitaminima. Dodatkom brašna graška dobiva se kruh s povećanim udjelom vlakana, manjom i sporijom hidrolizom škroba te sa smanjenim glikemijskim indeksom. Proizvedeni kruh ima zadovoljavajuća senzorska i viskoelastična svojstva (Angioloni i Collar, 2012; Agboola i sur., 2010).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj dodatka brašna žutog graška i primjene različitih vrsta bakterija mliječne kiseline za pripremu kiselog tijesta na udjel šećera, kao prekursora aromatskih spojeva, te kiselina i ukupne kiselosti u svim fazama proizvodnje bezglutenskog kruha.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BEZGLUTENSKI KRUH

Pšenični kruh je jedan od najčešće konzumiranih prehrambenih proizvoda većine zemalja Europe i SAD-a. Glavni je izvor ugljikohidrata, proteina, vitamina B, mineralnih tvari i prehrambenih vlakana (Dewettinck i sur., 2008). Proteini pšeničnog brašna glijadin i glutenin povezivanjem disulfidnim mostovima čine kompleksnu mrežu proteina glutena (Koehler i Wieser, 2013). Proteini glutena doprinose hidrataciji i zadržavanju plina u krušnom tijestu (Wieser, 2007). Smatra se da glijadin doprinosi viskoznosti, a glutenin elastičnosti i snazi krušnog tijesta (Xu i sur, 2007; Don i sur., 2003). Miješanjem vode i brašna dobiva se viskoelastično tijesto koje zadržava plinove nastale tijekom fermentacije. Kruh proizveden iz takvog tijesta ima dobre senzorske karakteristike. Kod odabira brašna za proizvodnju kruha posebno treba obratiti pažnju na udjel glijadina i glutenina. Kako bi se dobilo tijesto i kruh poželjnih svojstava, najbolji omjer glijadina i glutenina je 2:1 (Koehler i Wieser, 2013).

Određena skupina ljudi boluje od imunološki posredovane enteropatije uzrokovane konzumacijom glutena. Šire poznat naziv za ovu genetski uzrokovanu autoimunu bolest je celijakija. Istraživanja pokazuju da 1 % svjetske populacije boluje od celijakije (Catassi i Fasano, 2008). Konzumacijom glutena kod oboljelih osoba dolazi do upale tankog crijeva, a ako to stanje traje duže vrijeme može doći do razvoja po život opasnih bolesti. Jedna od posljedica celijakije je oštećenje crijevnih resica. Posljedica takvog oštećenja je onemogućavanje apsorpcije hranjivih tvari iz hrane u krvotok što dovodi do neuhranjenosti oboljelih osoba (Panjkota Krbavčić, 2008). Bolest se uočava već kod dojenčadi od nekoliko mjeseci, a liječenje traje cijeli život. Trenutno ne postoji farmaceutski lijek kojim bi se bolest liječila. Jedina mogućnost liječenja je potpuno izbacivanje glutena iz prehrane (Vriezinga i sur., 2014; Moroni i sur., 2009).

Bezglutenski proizvodi spadaju u hranu za posebne prehrambene potrebe i namijenjeni su osobama oboljelim od celijakije. Proizvodi se od žitarica i njihovih mješavina koje prirodno ne sadrže gluten, kao što su kukuruz, riža, heljda, proso, krumpir i druge i smije sadržavati najviše 20 mg glutena po kg suhe tvari. Hrana bez glutena može se proizvoditi i iz žitarica kojima je gluten odstranjen određenim tehnološkim postupkom (pšenica, raž, ječam, zob i pšenoraž). U takvim proizvodima sadržaj glutena ne smije biti veći od 200 mg kg⁻¹ (Pravilnik, 2004). Uklanjanje glutena iz kruha rezultira nekim negativnim pojavama poput tekućeg tijesta koje nakon pečenja daje kruh lomljive teksture, neprihvatljive boje, loše

kvalitete sredine i kore kruha te manje izraženog okusa i mirisa (Gallagher i sur., 2004). Bezglutenski kruh danas dostupan na tržištu sadržava manji udjel vitamina B, željeza, prehrambenih vlakana i folata (Thompson, 2000; Yazynina i sur., 2008). Osobe koje boluju od celijakije moraju konzumirati takve proizvode iako su loših senzorskih svojstava, a u svrhu njihovog poboljšanja znanstvenici provode brojna istraživanja. Dodatkom različitih prehrambenih aditiva i hranjivih sastojaka u recepture, tehnolozi su tijekom posljednjih dvadesetak godina poboljšali tehnološka i nutritivna svojstva bezglutenskog kruha (Moroni i sur., 2009).

A) Enzimi

Jedna od mogućnosti za poboljšanje kvalitete bezglutenskog kruha je dodatak enzima. U proizvodnji pekarskih proizvoda koriste se enzimi amilaze, proteaze, hemicelulaze, lipaze, oksidaze i transglutaminaze (Molina-Rosell, 2014). Transglutaminaza modificira proteine brašna i poboljšava njihova funkcionalna svojstva (Larre i sur., 2000). Transglutaminaza povezuje proteine brašna riže i time poboljšava viskoelastična svojstva tijesta (Gujral i sur., 2004).

B) Prehrambena vlakna

Pekarski proizvodi bez glutena obogaćeni vlaknima imaju bolju teksturu, sposobnost želiranja, zgušnjavanja i emulgiranja. Sabanis i suradnici (2009) su utvrdili da vlakna kukuruza i zobu imaju pozitivan utjecaj na nutritivna i senzorska svojstva bezglutenskog kruha. Osim žitarica, udjel vlakana se može povećati dodatkom voća i povrća kao što su jabuka, brusnica, mrkva i cikla. Osim prehrambenih vlakana, voće i povrće sadržava mineralne tvari, vitamine, antioksidanse, kiseline i druge spojeve koji dodatno doprinose kvaliteti kruha (Stojceska i sur., 2010).

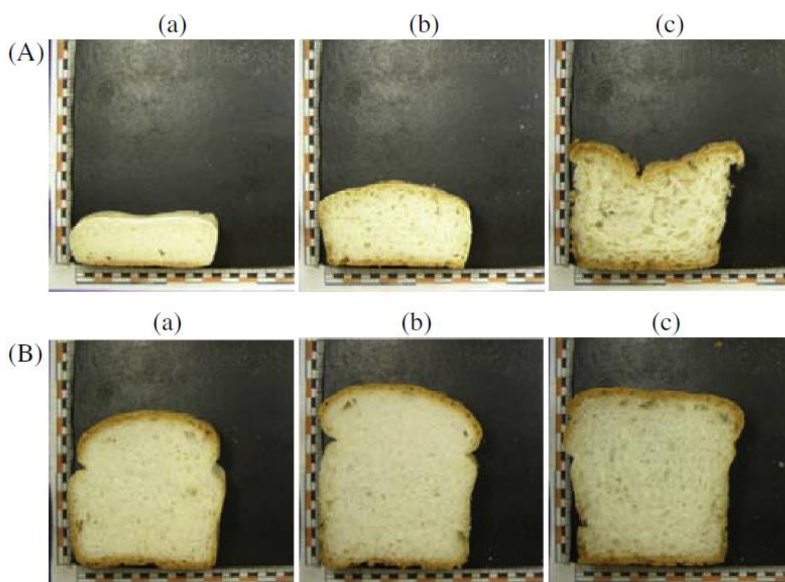
C) Proteini

Dodatak sastojaka koji su izvor proteina je jedan od načina kako nadomjestiti protein gluten. Najčešće korišteni mliječni sastojci u bezglutenskom kruhu su kazeinati, obrano mlijeko u prahu, mlijeko u prahu i proteini sirutke (Gallagher i sur., 2003a). Proteini iz mlijeka imaju sposobnost stvaranja mreže unutar krušnog tijesta. Volumen kruha se povećava, a proteini imaju ujedno funkcionalna i nutritivna svojstva (Gallagher i sur., 2003b). Proteini mogu biti i biljnog podrijetla kao što su mahunarke grašak, grah, soja, slanutak, leća i druge (Bojnanská i sur., 2012; Rizzello i sur., 2014). Brašno mahunarke kao što je grašak, sadrži

visok udjel proteina (21,46 %) u usporedbi s brašnom pšenice sadrži oko 11,70 % proteina. Dodatak brašna graška povećava apsorpciju vode i vrijeme razvoja tijesta, dok se stabilnost tijesta smanjuje. Senzorske analize pokazuju da nema značajne razlike između keksa proizvedenih s 10 % brašna graška u odnosu na kontrolne uzorke, dok visoka koncentracija brašna graška nepovoljno utječe na miris, okus, boju i čvrstoću keksa (Kohajdová i sur., 2013; Guillon i Champ, 2002).

D) Hidrokoloidi

Hidrokoloidi su jedni od najvažnijih aditiva u proizvodnji bezglutenskog kruha, jer u određenoj mjeri oponašaju funkciju glutena. Dodatak hidrokoloida poboljšava viskoelastična svojstva krušnog tijesta, povećava kapacitet zadržavanja vode, utječe na tvrdoću kore kruha i produljuje trajnost pekarskih proizvoda (Molina-Rosell, 2014). Najčešće korišteni hidrokoloidi su ksantan, metil-celuloza, pektin, agaroz i β -glukan (Lazaridou i sur., 2007). Voda povezuje suhe sastojke, hidratizira proteine i ugljikohidrate. Količina vode treba biti optimalna kako bi se postigao pozitivan učinak na volumen kruha i teksturu kore. Na slici 1 prikazan je utjecaj dodatka vode i veličine čestica brašna na volumen kruha uz dodatak hidrokoloida hidroksipropilmetil-celuloze.



Slika 1. Presjek bezglutenskog od glatkog (veličina čestica $<132 \mu\text{m}$) (A) i grubog rižinog brašna (veličina čestica $132\text{-}200 \mu\text{m}$) (B); sadržaj vode 70 % (a), 90 % (b) i 110 % (c) uz dodatak hidrokoloida (De la Hera i sur., 2014)

Unatoč dobrim rezultatima dobivenim pri proizvodnji bezglutenskog kruha uz dodatak aditiva, postoji nekoliko nedostataka. Neki od dodataka poput soje, jaja i drugih su alergeni te mogu izazvati ozbiljne probleme kod osoba alergičnih na te sirovine. Pekarski proizvodi s dodatkom aditiva ne zadovoljavaju prirodan način proizvodnje, što izaziva nezadovoljstvo kod potrošača. Cijena bezglutenskog kruha znatno je viša u odnosu na uobičajeni kruh, a dodatkom aditiva cijena još više raste. Dodatak brašna mahunarki i kiselog tijesta neka su od potencijalnih rješenja za poboljšanje kvalitete bezglutenskog kruha (Curiel i sur., 2015; Mrvčić i sur., 2011).

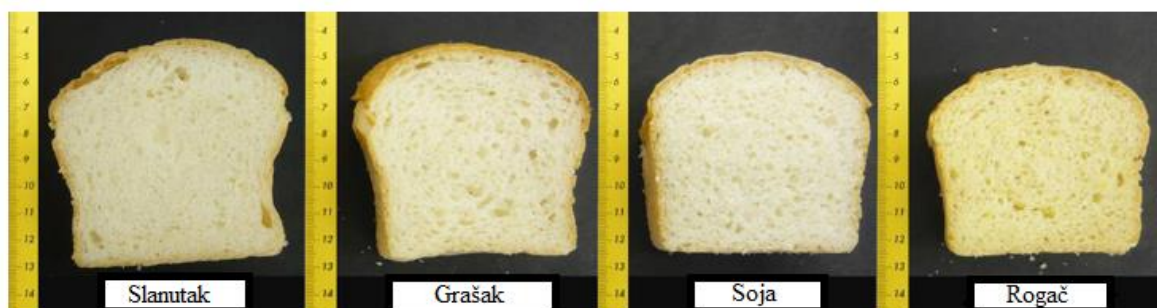
2.2. UTJECAJ DODATKA BRAŠNA GRAŠKA NA KVALITETU KRUHA

Svaki spoj i njegova koncentracija u pripremi kruha ima svojstva kojima utječe na kvalitetu gotovog proizvoda. Recepture se razlikuju prema udjelu pojedinih sirovina, a njihovim izmjenama nastoji se proizvesti što kvalitetniji proizvod (Ziobro i sur., 2013).

Grašak (lat. *Pisum sativum L.*) je bogat izvor proteina, škroba, vlakana, vitamina i mineralnih tvari. Za prehranu se koristi brašno cijele sjemenke ili izolati proteina, vlakana, škroba ili kombinacije istih. Prehrambeni proizvodi s dodatkom žutog graška imaju bolja funkcionalna svojstva (Agboola i sur., 2010). Curiel i suradnici (2015) određivali su kemijski sastav brašna mahunarki. Među svim ispitanim mahunarkama, brašno graška sadržavalo je najveći udjel pepela (4,6 %), prehrambenih vlakana (35,3 %) i visok udjel proteina (19,4 %), što je znatno veći udjel proteina u odnosu na žitarice.

Dodatkom brašna mahunarki poboljšavaju se nutritivna svojstva pekarskih proizvoda. Dolazi do povećanja udjela proteina, mineralnih tvari i vitamina bitnih za pravilnu prehranu ljudi (Bojnanská i sur., 2012). Mohammed i sur. (2012) djelomično su zamijenili pšenično brašno s brašnom slanutka. Rezultati su pokazali da zamjenom 10 % do 20 % dolazi do poboljšanih svojstava krušnog tijesta (povećana stabilnost tijesta i otpornost na rastezanje). Dodatkom brašna mahunarki (slanutka, leće i graha) i fermentacijom kiselog tijesta povećava se koncentracija funkcionalnih spojeva (npr. slobodne esencijalne aminokiseline, fenoli i prehrambena vlakna), a smanjuje se indeks hidrolize škroba (Rizzello i sur., 2014). Škrob mahunarki sadržava veću količinu amiloze, što doprinosi manjoj biološkoj raspoloživosti u odnosu na škrob žitarica, i ima posljedično niži glikemijski indeks. Sve navedeno ukazuje da dodatak brašna mahunarki ima pozitivan učinak na zdravlje (Guillon i Champ, 2002;

Angioloni i Collar, 2012). Miñarro i suradnici (2012) proučavali su utjecaj dodatka proteina mahunarki na svojstva bezglutenskog kruha. Kruh s dodatkom izolata graška pokazao je dobra senzorska i fizikalno-kemijska svojstva. Na slici 3 prikazan je presjek kruha proizvedenog dodatkom brašna slanutka, rogača, soje i izolata graška.



Slika 3. Presjek kruha proizvedenog s dodatkom brašna slanutka, rogača, soje i izolata graška (Miñarro i sur., 2012)

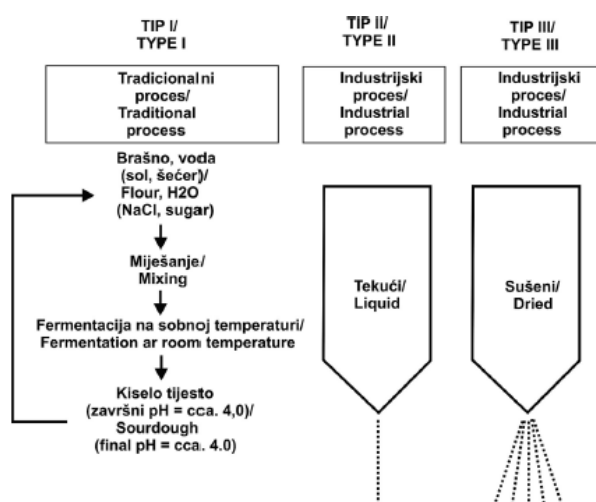
Brašno graška pogodno za fermentaciju pri čemu se može koristiti samostalno ili kao dodatak žitaricama u pripremi bezglutenskog kruha. Fermentacijom brašna graška koncentracija slobodnih kiselina, topljivih vlakana i ukupnih fenola povećava se, kao i aktivnost antioksidansa i fitaze (Curiel i sur., 2015).

Dodatkom izolata proteina graška poboljšavaju se nutritivna svojstva u bezglutenskom kruhu (Mariotti i sur., 2009). Osim utjecaja na nutritivna svojstva, proteini graška smanjuju tvrdoću kruha i produljuju njegovu trajnost. Isto tako utječu i na reološka svojstva tijesta i strukturu kruha pa je potrebno optimizirati udjel svih sastojaka u zamjesu (Ziobro i sur., 2013). Bouasla i suradnici (2017) ispitali su utjecaj dodatka brašna žutog graška u smjesu tjestenine od riže. Tvrdoća tjestenine bila je manja, žuta boja izraženija, ljepljivost veća, a senzorska svojstva i kvaliteta tjestenine prihvatljiva.

2.3. KISELO TIJESTO

Kiselo tijesto je mješavina brašna i vode koja fermentira uz prisutnost bakterija mliječne kiseline (BMK). Kiselo tijesto je međuproizvod i sadrži metabolički aktivne kvasce i BMK. BMK mogu biti prirodno prisutne u brašnu ili dodane u obliku starter kulture (De Vuyst i Neysens, 2005) pa se tako razlikuju prirodna kisela tijesta i definirana kisela tijesta (Grba i Stehlik-Tomas, 2010). Spontana fermentacija žitarica potječe iz vremena drevnog

Egipta kada se upotrebljavala za proizvodnju kruha i piva. U to vrijeme fermentacija se odvijala uz pomoć prirodno prisutnih mikroorganizama (kvasaca i BMK) (Poutanen i sur., 2009). Današnja industrijska proizvodnja kruha zahtjeva standardnu kvalitetu krajnjih pekarskih proizvoda te se iz tog razloga koriste starter kulture definiranog sastava i karakteristika mikroorganizama. U kiselom tijestu je omjer BMK i kvasaca oko 100 : 1, pri čemu su BMK dominantna kultura i time utječu na karakteristike proizvedenog kruha (De Vuyst i Vancanneyt, 2007). Mikrobiološkim istraživanjima otkriveno je više od 50 vrsta BMK i više od 25 vrsta kvasaca od kojih su *Saccharomyces* i *Candida* najzastupljeniji (Gobbetti i sur., 2008). Najčešće korištene BMK su vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella* i *Leuconostoc*. Na slici 2 prikazana su tri različita postupka proizvodnje kiselog tijesta.



Slika 2. Tri postupka proizvodnje kiselog tijesta (prema Bocker i sur., 1995)

Tip I je tradicionalni postupak proizvodnje kiselog tijesta i karakterizira ga konstantno održavanje mikroorganizama u aktivnom stanju. Kiselo tijesto tipa II najčešće se koristi za zakiseljavanje i nalazi se u tekućem stanju. Fermentacija kiselog tijesta tipa II traje 2 do 5 dana pri temperaturama višim od 30 °C kako bi se ubrzao proces. Konačni pH kiselog tijesta je do 3,5. Za kiselo tijesto tipa III koriste se BMK koje su otporne na sušenje. Takvo tijesto je u obliku praha, a koristi se za zakiseljavanje i utječe na formiranje arome kruha tijekom pečenja (Mrvčić i sur., 2011; Hammes i Gänzle, 1998). Tablica 1 prikazuje utjecaj dodatka kiselog tijesta u krušni zamjes na pojedina svojstva kruha.

Tablica 1. Utjecaj kiselog tijesta na kvalitetu pekarskih proizvoda (Gobbetti i sur., 2008; Moroni i sur., 2009; Mrvčić i sur., 2011; Novotni i sur., 2012)

Svojstva	Utjecaj kiselog tijesta
Tekstura	Povećanje volumena kruha
	Zadržavanje plina u krušnom tijestu
	Povećanje rastezljivosti i mekše krušno tijesto
Senzorska	Poboljšanje arome pekarskih proizvoda uslijed sinteze kiselina, oslobađanja aminokiselina i njihovih derivata
	Smanjenje mrvljivosti
Nutritivna	Povećana količina bioaktivnih spojeva
	Poboljšana biodostupnost mineralnih tvari
	Smanjenje glikemijskog indeksa
	Zamjena za aditive
	Povećana količina prehrambenih vlakana
Trajnost	Produženi rok trajanja
	Zaštita od plijesni i bakterija koje uzrokuju kvarenje

S obzirom na sve pozitivne učinke kiselog tijesta na kvalitetu kruha prikazane u tablici 1 i mnoga provedena istraživanja, kiselo tijesto se postavlja kao jedna od opcija za proizvodnju bezglutenskog kruha poboljšane kvalitete (Gobbetti i sur., 2008; Moroni i sur., 2009; Mrvčić i sur., 2011; Novotni i sur., 2012).

2.3.1 Metabolizam BMK i kvasaca tijekom procesa kiseljenja tijesta

Tijekom biokemijske aktivnosti kvasaca i BMK dolazi do razgradnje šećera pri čemu nastaju produkti koji utječu na karakteristike tijesta i kruha. *Saccharomyces cerevisiae* je najčešće korišteni pekarski kvasac koji fermentira šećere do etanola i CO₂. Kvasci fermentiraju glukozu, fruktozu, maltozu i saharozu, druge šećere fermentiraju znatno sporije, a polisaharide ne mogu fermentirati. Pojedini sojevi kvasaca imaju visoku toleranciju na udjel šećera u supstratu, ali i udjel etanola kao produkta fermentacije. *S. cerevisiae* sadrži invertazu koja se aktivira već kod zamjesivanja tijesta pa jednakom brzinom fermentira glukozu, fruktozu i saharozu (Grba i Stehlik-Tomas, 2010). Mikroorganizmi koriste šećere za rast i razvoj sve dok se ne postigne specifična pH vrijednost. Dobivena koncentracija kiseline nepovoljno utječe da daljnji razvoj kvasaca i BMK (Semić i Bauman, 2011).

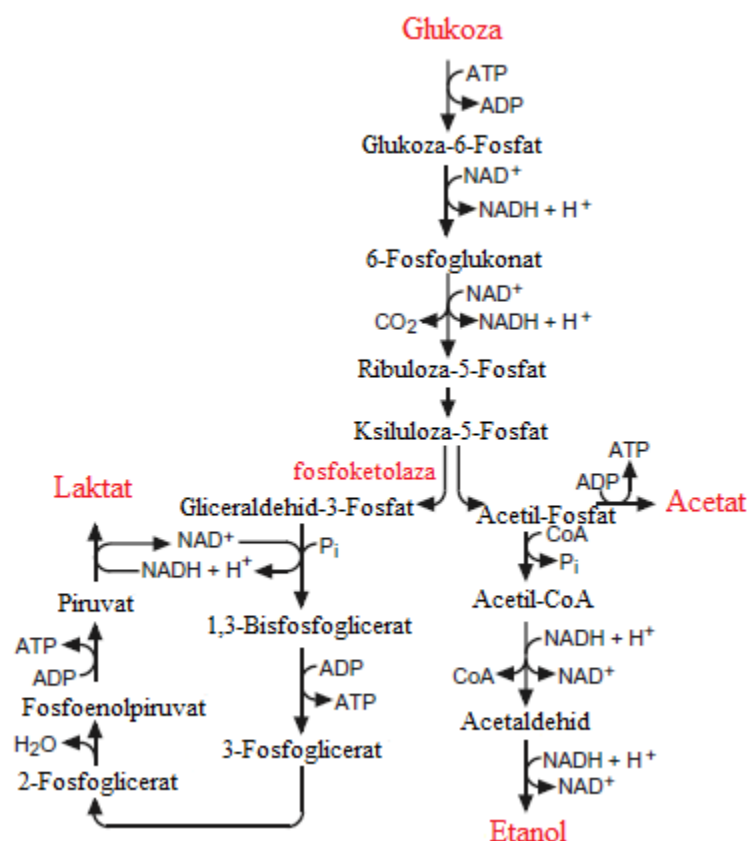
Bakterije se klasificiraju u obligatne ili fakultativne heterofermentativne i obligatne homofermentativne, ovisno o putu biokemijskih reakcija. Glavni proizvod metabolizma homofermentativnih BMK je mliječna kiselina, dok ostale produkte odgovorne za aromu

proizvode u manjim koncentracijama. Suprotno tome, heterofermentativne BMK proizvode oko 50 % mliječne kiseline, ostalo su hlapive kiseline (octena kiselina), nehlapive kiseline, karbonilni spojevi, etanol i CO₂ (Mrvčić i sur., 2008). BMK unutar roda *Lactobacillus*, najčešće su korištene kod pripreme kiselog tijesta. U tablici 2 podijeljene su vrste iz roda *Lactobacillus* s obzirom na put biokemijskih reakcija.

Tablica 2. Vrste bakterija iz roda *Lactobacillus* koje su izolirane iz kiselog tijesta ili se koriste za njegovu pripremu (Corsetti i Settanni, 2007)

Obligatni heterofermentativni mo.	Fakultativni heterofermentativni mo.	Obligatni homofermentativni mo.
<i>Lb. acidifarinae</i> <i><u>Lb. brevis</u></i> <i>Lb. buchneri</i> <i><u>Lb. fermentum</u></i> <i>Lb. fructivorans</i> <i>Lb. frumenti</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. panis</i> <i>Lb. pantis</i> <i><u>Lb. reuteri</u></i> <i>Lb. rossiae</i> <i>Lb. sanfranciscensis</i> <i>Lb. siliginis</i> <i>Lb. spicheri</i> <i>Lb. symae</i>	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. paralimentarius</i> <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. amylovorus</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueskii</i> <i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. mindensis</i> <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. amylolyticus</i>

Obligatni heterofermentativni mikroorganizmi nemaju enzim aldolazu, ali posjeduju enzim fosfoketolazu pa je put reakcija nešto drugačiji od homofermentativnih BMK. Pentoze fermentiraju preko pentoza-fosfatnog puta do mliječne i octene kiseline. Heksoze fermentiraju preko pentoza-fosfatnog i Emden-Meyerhof-Parnas (EMP ili glikolize) puta do mliječne kiseline, etanola ili octene kiseline i CO₂. Disaharide poput saharoze cijepaju specifične hidrolaze i/ili fosfohidrolaze do monosaharida koji zatim ulaze u glavne puteve razgradnje (Axelsson, 1998; Gänzle, 2015). Slika 4 prikazuje heterofermentativni put reakcija BMK.



Slika 4. Heterofermentativni put reakcija BMK (Gänzle, 2015)

Pšenično brašno sadrži 1,55 % do 1,85 % ugljikohidrata koje kvasci i BMK mogu koristiti kao supstrate, ovisno o ravnoteži između hidrolize škroba, mikrobnih enzima i mikrobne potrošnje (Martinez-Anaya, 1996). Uvjeti u tijestu (pH, temperatura, vlažnost) utječu na amilaze u brašnu i povećavaju udjel fermentabilnih šećera (Galal i sur., 1978). Preostali šećeri nakon fermentacije sudjeluju u Maillardovim reakcijama tijekom pečenja kruha pridonoseći senzorskim svojstvima kruha. Osim senzorskih svojstava, šećeri poboljšavaju teksturu i svježinu kruha (Martin i Hoseney, 1991).

2.4. METODE ODREĐIVANJA ŠEĆERA I KISELINA U KISELOM TIJESTU I KRUHU

Tijekom fermentacije kiselog tijesta, krušnog tijesta, a i tijekom pečenja kruha odvijaju se brojne biokemijske reakcije kojima se smanjuje, odnosno povećava, koncentracija određenih šećera i kiselina. Metoda koja se često koristi za određivanje metabolita u kiselom tijestu temelji se na enzimskoj reakciji, a provodi se pomoću enzimskih kitova za analizu hrane. Ponekad se primjenjuju i kromatografske tehnike kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i plinska

kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) (Martinez-Anaya i sur., 1989). Istovremeno određivanje šećera i organskih kiselina može se provesti pomoću HPLC metode s jednom HPLC kolonom i dva detektora uz izokratnu eluciju (Lefebvre i sur., 2002; Bouzas i sur., 1991).

2.4.1. HPLC analiza

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je prikladna radi mogućnosti razdvajanja spojeva koji su termolabilni, velike molarne mase ili koji su vrlo polarni. HPLC analiza temelji se na različitim fizikalno-kemijskim interakcijama između analita iz uzorka s mobilnom i stacionarnom fazom (Rouessac i Rouessac, 2007). Uređaj sadrži nekoliko komponenata, to su injektor, spremnik mobilne faze i pumpa, termostatski blok, kromatografska kolona, detektor i računalo. Slika 5 prikazuje primjer HPLC uređaja (Shimadzu, Japan).



Slika 5. HPLC uređaj SHIMADZU (vlastita fotografija)

Kako bi se što preciznije odredili analiti iz uzorka potrebno je odabrati odgovarajuću mobilnu i stacionarnu fazu, kolonu i detektor kao i uvjete analize (protok mobilne faze, vrijeme trajanja analize, injektirani volumen uzorka i temperatura kolone) (Marković i sur., 2006). Nakon injektiranja uzorak je nošen mobilnom fazom kroz kolonu gdje dolazi do razdvajanja pojedinih analita iz uzorka. Razdvojeni analiti se detektiraju prolaskom kroz detektor. Rezultat provedene analize je kromatogram. Kromatogram je dijagram koji prikazuje odzive sastojaka koji izlaze iz kromatografske kolone u ovisnosti o vremenu. Udjel

pojednog analita proporcionalan je površini pika na kromatogramu, a vrijeme potrebno da prođe kroz kolonu naziva se retencijsko vrijeme. Usporedbom retencijskog vremena i površine pika standarda (otopina čistog analita poznate koncentracije) s retencijskim vremenom i površinom pika nepoznatog analita iz uzorka može se:

- identificirati nepoznati analit,
- odrediti udjel nepoznatog analita.

Točan udjel analita u kromatografiji određuje se kalibracijom pomoću vanjskog ili unutarnjeg standarda. Kod kalibracije pomoću vanjskog standarda pripreme se otopine standarda poznatih koncentracija te se provodi analiza. Iz rezultata analize odredi se retencijsko vrijeme analita i izradi se baždarni dijagram s obzirom na površine dobivenih pikova i poznatih koncentracija otopina. Pomoću retencijskog vremena analit se identificira, a iz dobivenog baždarnog dijagrama odredi se koncentracija analita u uzorku (Rouessac i Rouessac, 2007).

Za istovremeno određivanje kiselina i šećera potrebno je koristiti jednu HPLC kolonu i dva detektora. Za određivanje šećera koristi se detektor koji mjeri indeks loma (engl. *Refractive Index Detector*, RID), a za detekciju octene i mliječne kiseline koristi se detektor s fotodiodnim nizom (engl. *Photodiode Array Detector*, PDA) (Bouzas i sur., 1991). Detektori indeksa loma mogu biti korišteni samo pri izokratnoj eluciji te se iz tog razloga koristi jedna mobilna faza (Rouessac i Rouessac, 2007). Bouzas i suradnici (1991) i Lefebvre i suradnici (2002) su proveli istraživanje primjenom ove metode te na vrlo jednostavan i brz način odredili metaboličku aktivnost mikroorganizama.

Fermentabilni koeficijent (engl. *Fermentation Quotient*, FQ) označava molarni odnos između mliječne i octene kiseline nastale tijekom fermentacije kiselog tijesta. Ovaj parametar ovisi o primijenjenim BMK (homofermentativne ili heterofermentativne). Na fermentabilni koeficijent utječu endogeni i egzogeni čimbenici (npr. dostupnost fermentabilnih šećera, koncentracija kisika, vrijeme i temperatura fermentacije, omjer vode i brašna u tijestu, prisutnost mineralnih tvari i drugi čimbenici) (Corsetti, 2013). Fermentabilni koeficijent od 1,5 do 4 smatra se optimalnim s obzirom na senzorska svojstva kruha s dodatkom kiselog tijesta (Spicher, 1983). Omjer mliječne i octene kiseline utječe na aromu, ali i na strukturu kruha (Corsetti i Settanni, 2007).

2.5. UKUPNA KISELOST

Konačni pH kiselog tijesta utječe na kiselost krušnog tijesta i kruha, a približne vrijednosti pH su 3,5 do 4,3. U krušni zamjes uobičajeno se dodaje oko 20 % kiselog tijesta pa su vrijednosti pH krušnog tijesta na kraju fermentacije od 4,7 do 5,4 (Collar i sur., 1994). Ukupna kiselost (engl. *Total Titratable Acidity*, TTA) je mjera udjela ukupnih organskih kiselina sintetiziranih tijekom fermentacije kiselog tijesta. Ukupna kiselost se izražava u mL 0,1 M NaOH kojim je titrirano 10 g uzorka dok se ne postigne određena pH vrijednost, a ta vrijednost ovisi o autorima. Optimalna vrijednost ukupne kiselosti kiselog tijesta ovisi o tipu kruha koji se proizvodi (Brandt, 2007; Rizzello i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZORCI

U ovom istraživanju analizirani su uzorci kiselog tijesta, krušnog tijesta prije i nakon krušne fermentacije, kruha (sredine i kore) i kore kruha. Uzorci su pripremljeni u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo 2016. godine. Za pripremu uzoraka korištene su dvije recepture, sa i bez dodatka brašna graška u iznosu od 25 % ukupne mase brašna. Kiselo tijesto pripremano je s dodatkom različitih bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus brevis* DSM 20054 i *Lactobacillus fermentum* DSM 20052). Fermentacija kiselog tijesta trajala je 16 h. U krušni zamjes dodano je 20 % kiselog tijesta.

Za pripremu kiselog tijesta korišteno je:

- integralno rižino brašno, Advent
- integralno proseno brašno, Werz
- brašno žutog graška, Fuszerhaz
- vodovodna voda
- bakterije mliječne kiseline

Za pripremu kruha korišteno je:

- integralno rižino brašno, Advent
- kukuruzni škrob, Maisita, Agrana
- integralno proseno brašno, Werz
- brašno žutog graška, Fuszerhaz
- kukuruzni ekstrudat, Naše klasje
- biljna mast, Zvijezda
- CMC, Wellence Gluten Free 47129, The Dow Chemical Company
- HPMC, Methocell K4M Food Grade, The Dow Chemical Company
- sol, morska sol, Solana Pag
- prašak za pecivo, Dolcela, Podravka
- emulgator MONO 40, Juchem
- šećer, konzumni bijeli, Viro d.d.
- kvasac, instant suhi pekarski kvasac, 95 % suhe tvari, Kvasac d.o.o

- bjelanjak u prahu, Elcon, Prehrambeni proizvodi d.o.o
- vodovodna voda

Određivan je udjel šećera i kiselina s obzirom na dodatak brašna žutog graška i uvjeta fermentacije. Šećeri i kiseline određivani su u uzorcima kiselog tijesta (KT), na početku i na kraju fermentacije krušnog tijesta (T_p i T_k), u kruhu (kora i sredina) (KRUH) i u kori kruha (KORA). Po završetku pripreme, uzorci kiselog i krušnog tijesta su razliveni na ravnu površinu u tankom sloju i zamrznuti tekućim dušikom. Uzorci kruha (sredina i kora) i kore kruha usitnjeni su, zatim zamrznuti tekućim dušikom i homogenizirani. Uzorci su čuvani u zamrzivaču pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. Postupak pripreme uzoraka ponovljen je dva puta. U tablici 3 se nalazi popis svih pripremljenih i analiziranih uzoraka.

Tablica 3. Popis pripremljenih i analiziranih uzoraka

	<i>Lactobacillus reuteri</i> (LR)	<i>Lactobacillus brevis</i> (LB)	<i>Lactobacillus fermentum</i> (LF)	Bez kisele fermentacije i dodatka BMK (0)
S dodatkom brašna graška (+G)	LR+G	LB+G	LF+G	0+G
Bez dodatka brašna graška (-G)	LR-G	LB-G	LF-G	0-G

3.2. ODREĐIVANJE ŠEĆERA I KISELINA

Udjel šećera i kiselina određivan je u uzorcima svježeg kiselog tijesta, krušnog tijesta, kruha (kora i sredina) i kori kruha. Određivanje šećera i kiselina provedeno je modificiranom metodom korištenom u istraživanju Lefebvre i suradnika (2002).

Kemikalije

- Destilirana voda
- Carrez I otopina, $0,085\text{ mol L}^{-1}$ kalij-heksacijanoferat (II) trihidrata ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 99 %, Kemika
- Carrez II otopina, $0,25\text{ mol L}^{-1}$ cink sulfat-heptahidrata ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99,5 %, Kemika
- Ledena octena kiselina (CH_3COOH), 99,5 %, MACRON

- Saharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$), 99,5 %, SIGMA
- L-(+)-mliječna kiselina ($CH_3CHOHCOOH$), ≥ 98 %, SIGMA
- D-(-)-fruktoza ($C_6H_{12}O_6$), $\geq 99,0$ %, SIGMA
- D-(+)-glukoza, bezvodna ($C_6H_{12}O_6$), $\geq 99,5$ %, GRAM MOL
- Sumporna kiselina (H_2SO_4), 96 %, $1,84 \text{ g mL}^{-1}$, ALKALOID AD-Skopje

Uređaji i oprema

- Centrifuga, ROTINA 35, HETTICH ZENTRIFUGEN
- Magnetska miješalica RT5, IKA
- Pipetmani ($500\text{-}5000 \text{ }\mu\text{L}$, $1000 \text{ }\mu\text{L}$ i $10\text{-}100 \text{ }\mu\text{L}$), Eppendorf
- Analitička vaga, KERN ALS 220-4N
- Ultrazvučna kupelj, VWR
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatograph*, HPLC) s komponentama:
 - pumpa, LC-10AD VP, Shimadzu
 - degazer, DGU-14A, Shimadzu
 - termosta, CTO-10 AS VP, Shimadzu
 - detektor indeksa loma (engl. *Refractive Index Detector*, RID), RID-10A, Shimadzu
 - detektor s fotodiodnim nizom (engl. *Photodiode Array Detector*, PDA), SPD-M10A VP, Shimadzu
 - kontroler, SCL-10A VP, Shimadzu
- plastične čaše (100 mL)
- odmjerne tikvice (50 mL)
- plastične epruvete za centrifugu
- plastične epruvete ($1,5 \text{ mL}$)
- najlonski filteri promjera 25 mm , veličina pora $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, Labex Ltd

Postupak pripreme uzoraka

Odvagano je $10 \pm 0,0001$ g uzorka. Uzorci kiselog tijesta i krušnog tijesta vagani su u plastičnu čašu nakon čega je dodano 5 mL destilirane vode kako bi se otopili i kvantitativno prenijeli preko lijevka u tikvicu od 50 mL. Uzorci kruha i kore kruha vagani su na papir nakon čega su kvantitativno preneseni u tikvicu od 50 mL. Nakon prijenosa uzorka, u tikvicu je dodan magnet i 30 mL destilirane vode. Tikvica je začepljena i provedena je homogenizacija uzorka kroz 30 minuta na magnetskoj miješalici pri brzini 3. Nakon homogenizacije magnet je uklonjen, ispran destiliranom vodom u tikvicu i tikvica je dopunjena destiliranom vodom do oznake. Uzorak je promućkan i prenesen u epruvetu za centrifugu. Centrifugiranje je provedeno tijekom 5 minuta na 10000 RPM-a. Zatim je 5 mL supernatanta preneseno u novu epruvetu te je dodan 1 mL otopine Carrez I i 1 mL otopine Carrez II, nakon čega je uzorak centrifugiran tijekom 5 min na 5000 RPM-a. Nakon centrifugiranja je supernatant profiltriran preko najlonskog filtera i prenesen u prethodno označene plastične epruvete od 1,5 mL. Tako pripremljen uzorak bio je spreman za analizu.

HPLC analiza

Razdvajanje i određivanje ciljanih spojeva u analiziranim uzorcima provedeno je HPLC metodom. Određivanje šećera i kiselina provedeno je istovremeno, uz korištenje jedne kolone. Za svaki uzorak provedena su dva paralelna mjerenja. U tablici 4 prikazani su uvjeti kromatografske analize. Za detekciju mliječne i octene kiseline korišten je PDA detektor, a za šećere saharozu, glukozu i fruktozu RID detektor.

Tablica 4. Uvjeti kromatografske analize

Kolona	MetaCarb 67 H (300 * 6,5 mm)
Mobilna faza	$0,0005 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$
Eluiranje	Izokratno
Vrijeme trajanja analize	25 minuta
Injektirani volumen uzorka	20 μL
Protok mobilne faze	$0,5 \text{ mL min}^{-1}$
Temperatura kolone	40 °C

3.2.1. Kvalifikacija i kvantifikacija šećera i kiselina

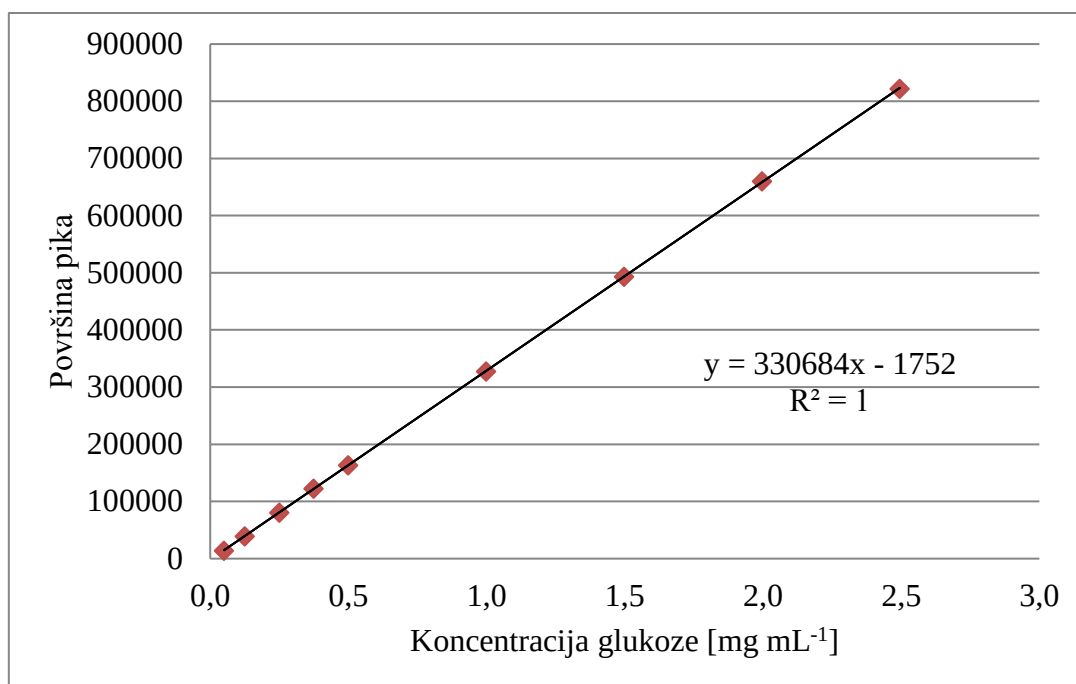
Kvalifikacija šećera i kiselina provedena je na temelju usporedbe retencijskih vremena standarda ciljanih analita i retencijskih vremena razdvojenih analita iz uzorka. Kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda. Pripremljeni su različiti koncentracijski rasponi otopina standarda. Baždarni dijagram glukoze i fruktoze izrađen je pomoću devet koncentracijskih razina, a saharoza pomoću šest. Baždarni dijagram octene kiseline izrađen je na osam koncentracijskih razina dok je kod mliječne kiseline pomoću pet koncentracijskih razina. U tablici 5 prikazane su rasponi koncentracija standarda upotrijebljeni za izradu baždarnog dijagrama. Za svaki standard provedena su tri paralelna mjerenja. Baždarni pravci izrađeni su pomoću dobivenih površina pikova ciljanih spojeva i poznatih koncentracija otopina standarda. Koncentracije ciljanih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca. Na slikama 6 do 10 prikazani su baždarni dijagrami analiziranih šećera i organskih kiselina. Iz dobivenih koncentracija mliječne i octene kiseline izračunat je fermentabilni koeficijent (FQ) prema formuli 1:

$$FQ = [n \text{ (mliječna kiselina)}] * [n \text{ (octena kiselina)}]^{-1} \quad (1)$$

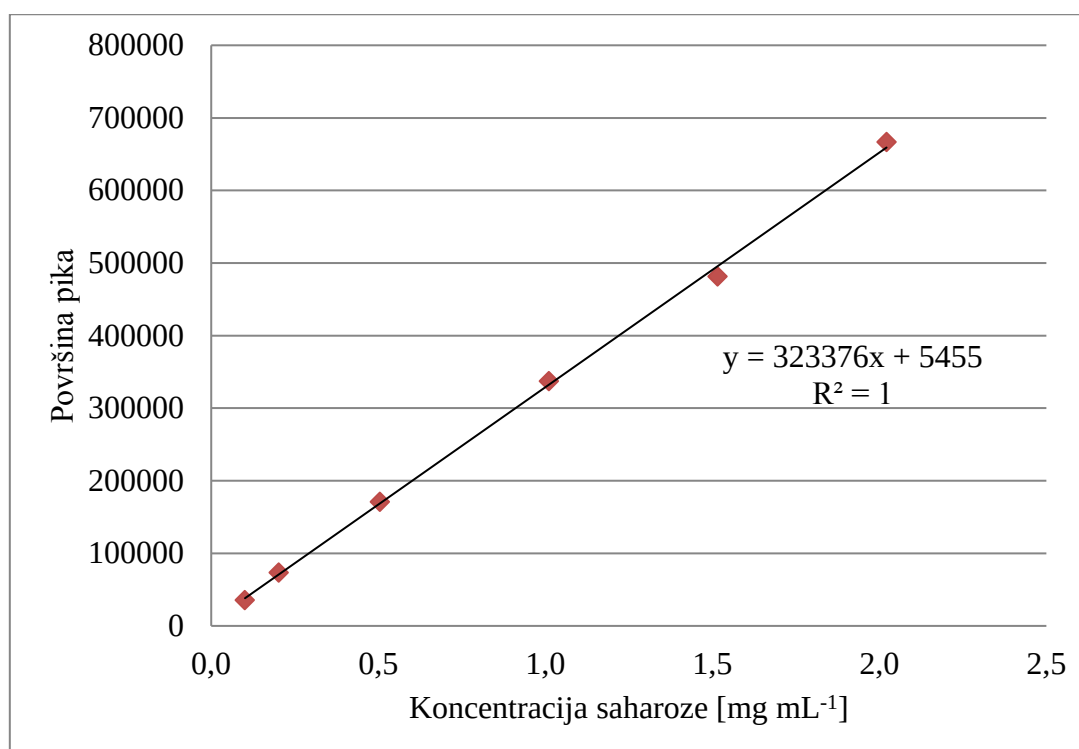
n - množina u mol

Tablica 5. Rasponi koncentracija otopina standarda

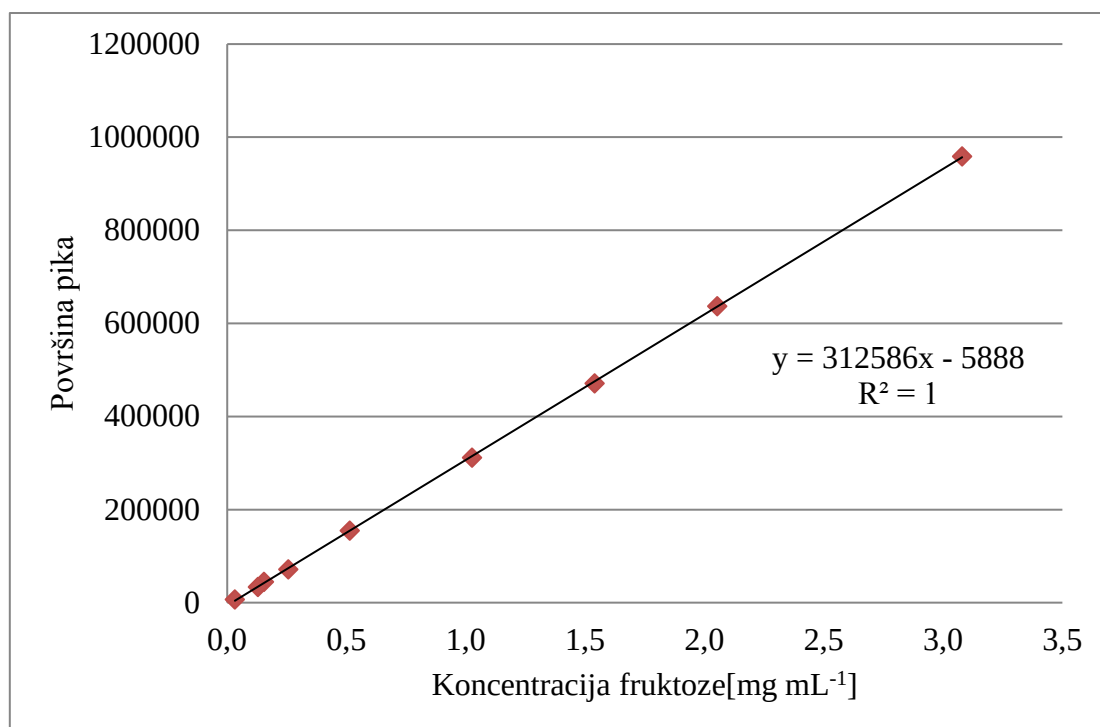
Analit	Koncentracija [mg mL ⁻¹]
Saharoza	0,10 – 2,02
Glukoza	0,12 – 2,50
Fruktoza	0,03 – 1,54
Mliječna kiselina	0,20 – 1,98
Octena kiselina	0,01 – 0,52



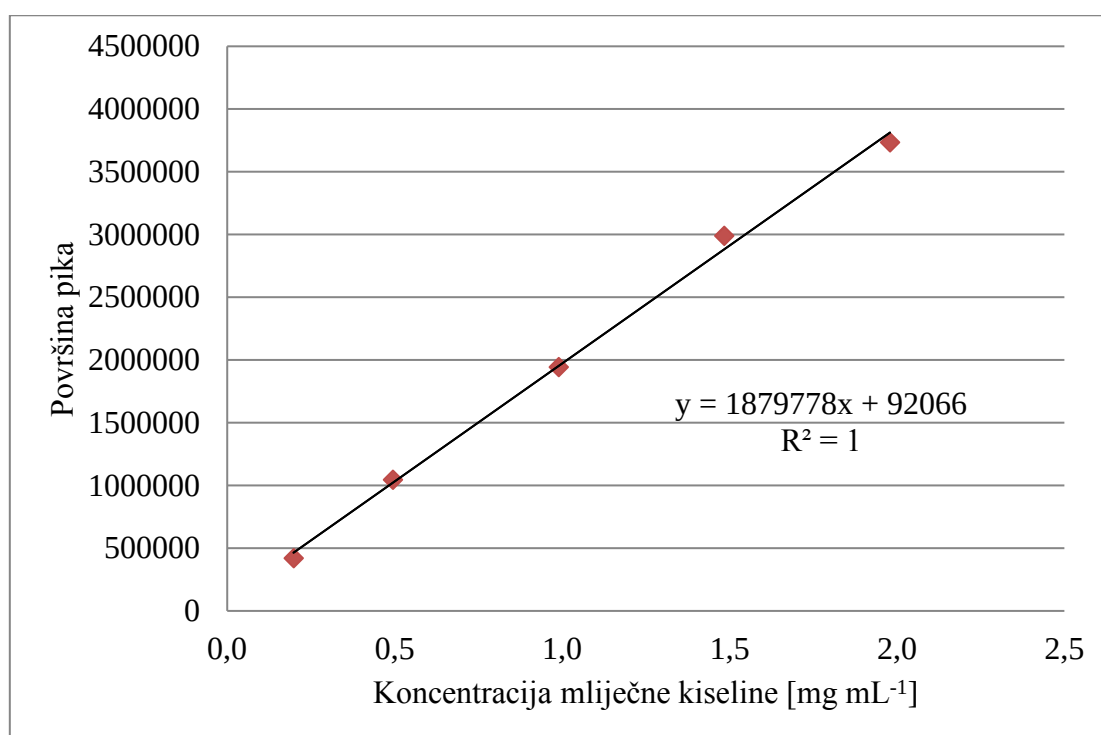
Slika 6. Baždarni dijagram određivanja glukoze HPLC metodom



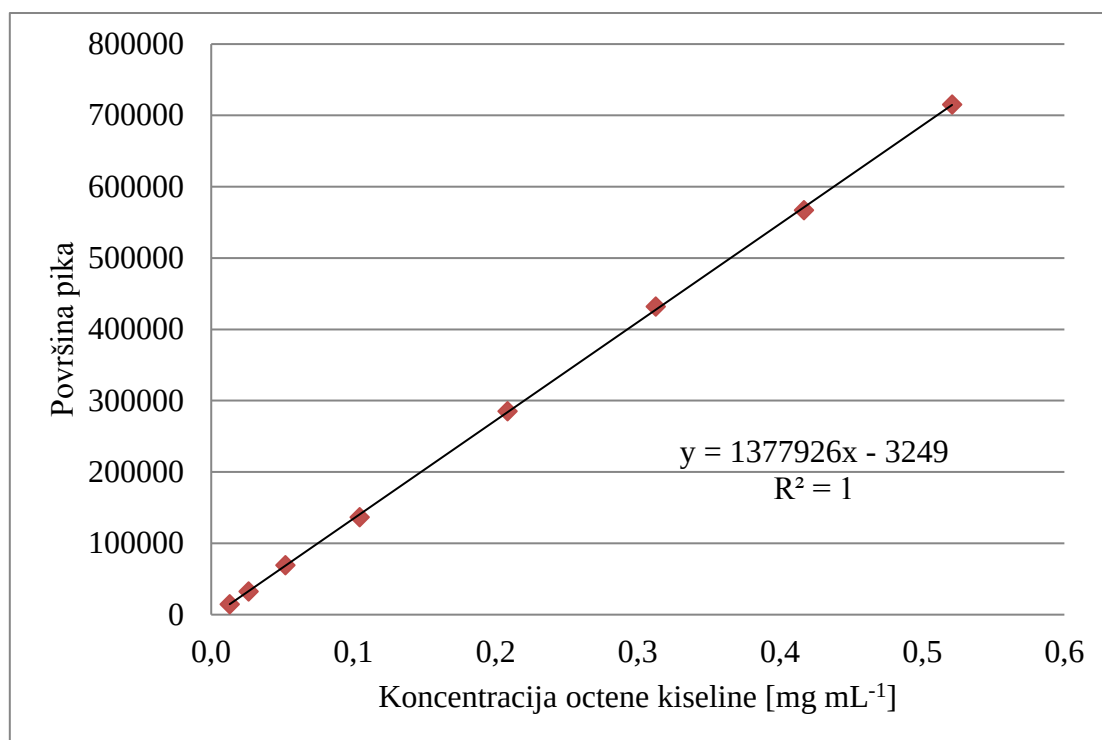
Slika 7. Baždarni dijagram određivanja saharoze HPLC metodom



Slika 8. Baždarni dijagram određivanja fruktoze HPLC metodom



Slika 9. Baždarni dijagram određivanja mliječne kiseline HPLC metodom



Slika 10. Baždarni dijagram određivanja octene kiseline HPLC metodom

3.3. ODREĐIVANJE UKUPNE KISELOSTI

Ukupna kiselost određena je u uzorcima svježeg kiselog tijesta i kruha koji je skladišten u zamrznutom stanju pri -18 °C do analize. Određivanje ukupne kiselosti uzoraka kiselog tijesta i kruha provedeno je metodom korištenom u istraživanju Lefebvre i suradnika (2002), uz modifikacije.

Kemikalije

- Natrijev hidroksid (NaOH), 0,1 mol L⁻¹, Lach-Ner
- Destilirana voda

Uređaji i oprema

- Magnetska miješalica RT5, IKA
- Automatska bireta, HIRSCHMANN-Solarus
- Magnetska miješalica s termoregulacijom C-MAG HS 7, IKA
- pH metar, Jenway 3510

- Analitička vaga, KERN ALS 220-4N
- plastične čaše (200 mL)
- menzura (100 mL)

Postupak određivanja

Odvagano je $10 \pm 0,0001$ g uzorka svježeg kiselog tijesta ili smrznutog kruha na analitičkoj vagi u plastičnu čašu od 200 mL. Dodano je 90 mL destilirane vode i stavljen magnet te je plastična čaša poklopljena. Uzorci su homogenizirani na magnetskoj miješalici 15 minuta na brzini 3. Nakon homogenizacije izmjereni su početni pH i temperatura uzorka. Zatim je pomoću automatske birete uzorak titriran s $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH do pH 6,6, 8,3 i 8,5, uz konstantnu homogenizaciju. Nakon postignutog pH zapisan je volumen utrošene lužine. Mjerenje je za svaki uzorak ponovljeno dva puta.

3.4. OBRADA PODATAKA

Svi podaci obrađeni su u programu MS Excel 2007. Izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija utrošenog volumena lužine za određivanje ukupne kiselosti i dobivenih koncentracija analiziranih spojeva.

4. REZULTATI I RASPRAVA

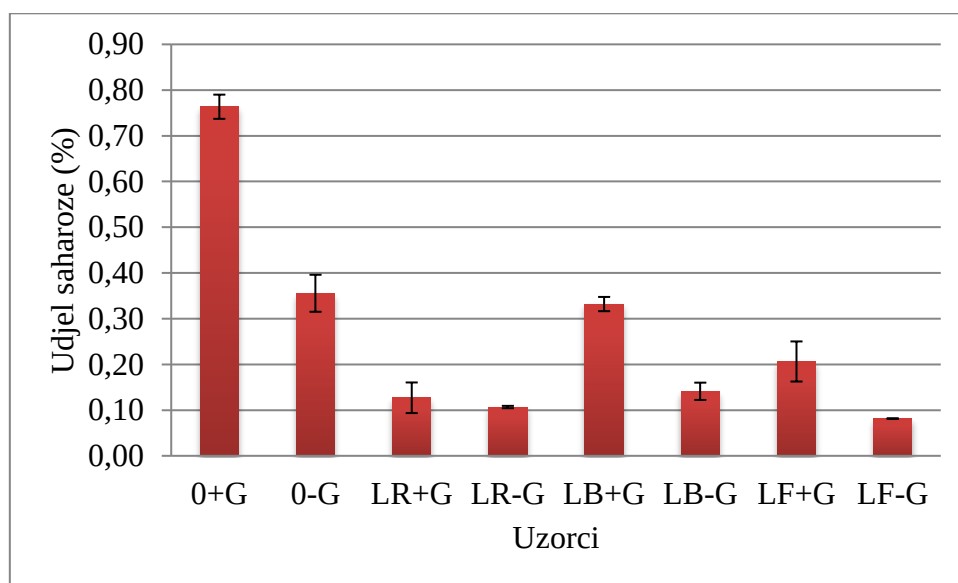
U ovom istraživanju određivan je udjel šećera, kao prekursora aromatskih spojeva i kiselina u svim fazama proizvodnje kruha. Primjenom različitih BMK bez ili uz dodatak brašna graška u bezglutenski kruh uočeni su različiti udjeli pojedinih šećera i kiselina u uzorcima. Provedene su dvije paralelne fermentacije, a uzorci su analizirani u paralelama. Udjel šećera i kiselina u uzorcima kiselog tijesta, krušnog tijesta na početku fermentacije, krušnog tijesta na kraju fermentacije, kruha (kora i sredina) i kore kruha određen je pomoću HPLC metode, a ukupna kiselost kiselog tijesta i kruha titracijom s 0,1 mol L⁻¹ NaOH.

4.1. UDJEL ŠEĆERA I KISELINA

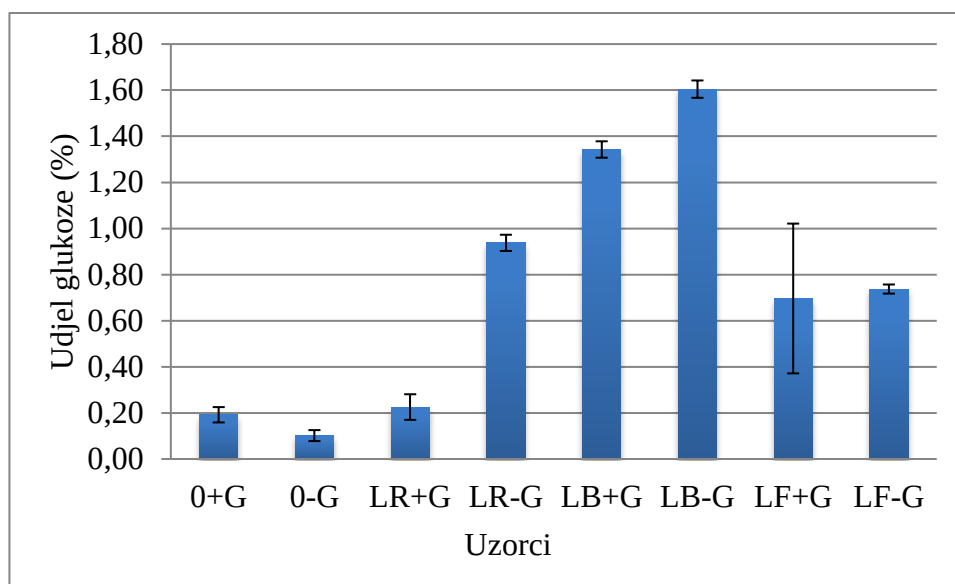
Fizikalna i senzorska svojstva kruha rezultat su brojnih kemijskih promjena tijekom svih faza proizvodnje. Tijekom pripreme krušnog zamjesa dolazi do hidrolize škroba i oligosaharida osiguravajući mikroorganizmima šećere za fermentaciju. Pri pečenju kruha šećeri sudjeluju u reakcijama karamelizacije i Maillardovim reakcijama (Hidalgo i Brandolini, 2011). Udjel šećera određivan je u uzorcima kiselog tijesta, krušnog tijesta na početku fermentacije, krušnog tijesta na kraju fermentacije, kruha (kora i sredina) i kore kruha.

4.1.1. Udjel šećera u kiselom tijestu

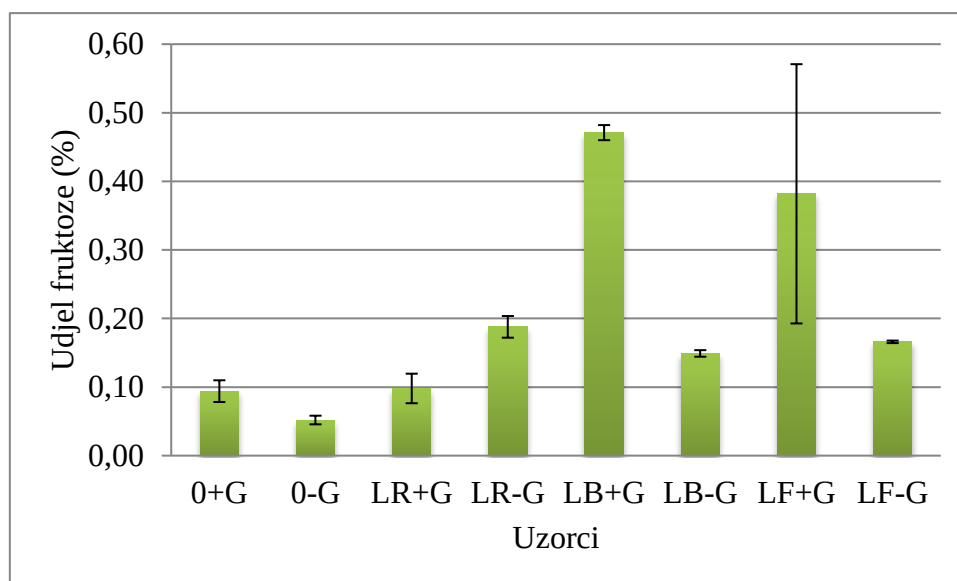
Udjeli šećera u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK prikazani su na slikama 11 do 13.



Slika 11. Udjel saharoze u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 12. Udjel glukoze u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 13. Udjel fruktoze u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK

Uzorak 0+G imao je najveći udjel saharoze (0,76 %) dok je u ostalim uzorcima taj postotak bio znatno manji (ispod 0,36 %) (slika 11). Najveći udjel glukoze je određen u uzorcima fermentiranim pomoću bakterije *L. brevis* (1,34 % za uzorak s dodatkom brašna graška i 1,60 % u uzorku bez dodatka brašna graška), a najmanji udjel glukoze određen je u uzorcima bez kisele fermentacije (0,19 % za uzorak 0+G i 0,10 % za uzorak 0-G) (slika 12). Udjel fruktoze u kiselom tijestu slično kao i glukoze, bio je najmanji u uzorcima bez kisele fermentacije (0,09 % za uzorak 0+G i 0,05 % za uzorak 0-G). Najveći udjel fruktoze određen

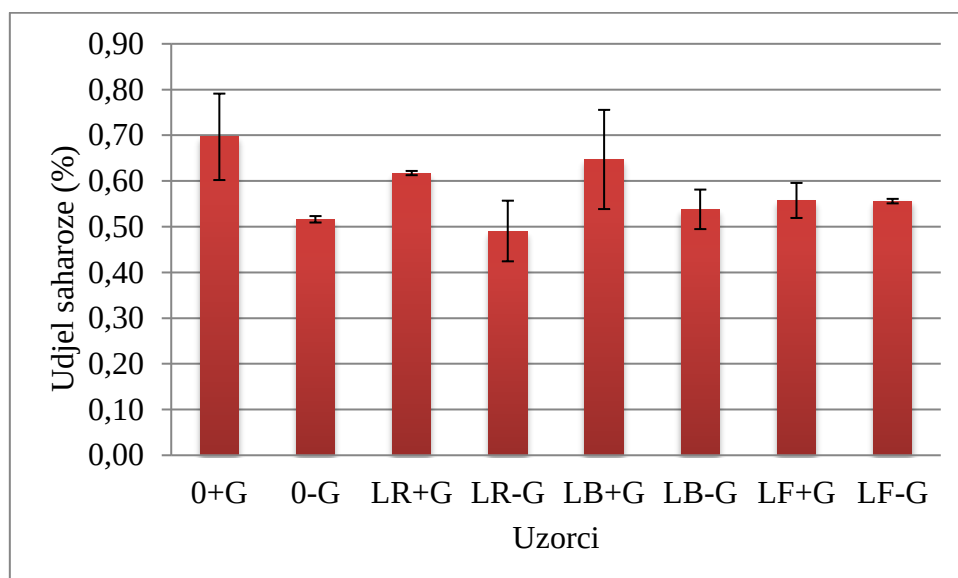
je u uzorcima LB+G (0,47 %) i LF+G (0,38 %) (slika 13). U ovom istraživanju fermentacija je trajala 16 h.

Robert i suradnici (2006) proučavali su metabolizam dva soja *L. plantarum*, kroz sve faze proizvodnje pšeničnog kruha. Uzorci su fermentirani tijekom 25 h. Udjel šećera u uzorcima određen je nakon 20 sati fermentacije. Saharoza nije određivana u kiselom tijestu. Udjel glukoze bio je 0,12 % do 0,28 %, a fruktoze 0,04 % do 0,12 %. Uzorku LR+G određen je udjel glukoze 0,23 % (slika 12), a fruktoze 0,10 % (slika 13). Preostalim uzorcima fermentiranim pomoću BMK određen je veći udjel glukoze i fruktoze u odnosu na udjele određene u istraživanju autora Robert i suradnika (2006).

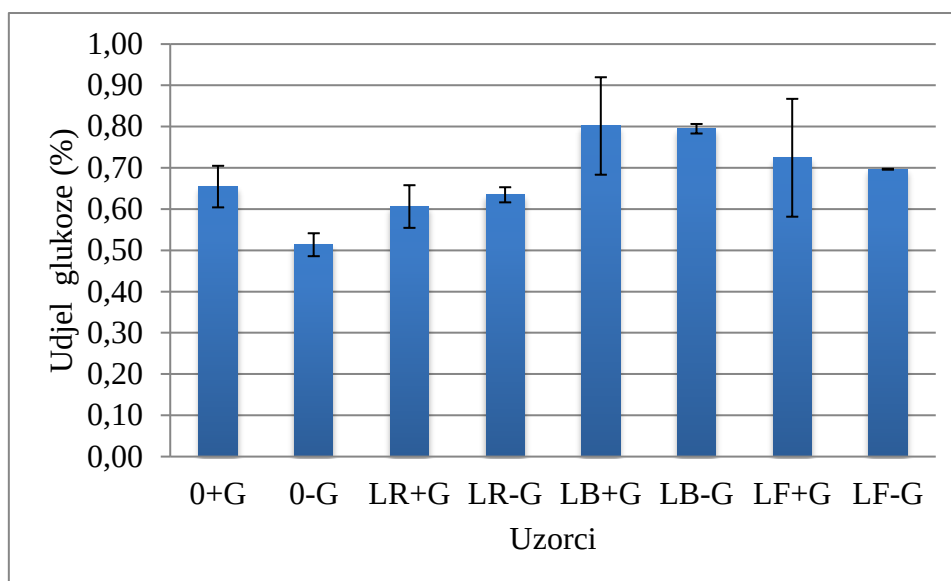
Axel i suradnici (2016) odredili su udjel glukoze i fruktoze u kiselom tijestu fermentiranom pomoću *L. reuteri* i dva soja *L. brevis*. Brašno kvinoje fermentirano je pomoću BMK tijekom 48 h. Uzorcima fermentiranim pomoću *L. reuteri* određen je udjel glukoze 0,98 %, a fruktoze 1,3 %. Fermentacijom pomoću *L. brevis* udjel glukoze bio je 1,54 % do 2,59 %, a fruktoze 1,01 % do 1,12 %. Saharoza nije detektirana u istraživanju Axel i suradnika (2016).

4.1.2. Udjel šećera u krušnom tijestu prije fermentacije

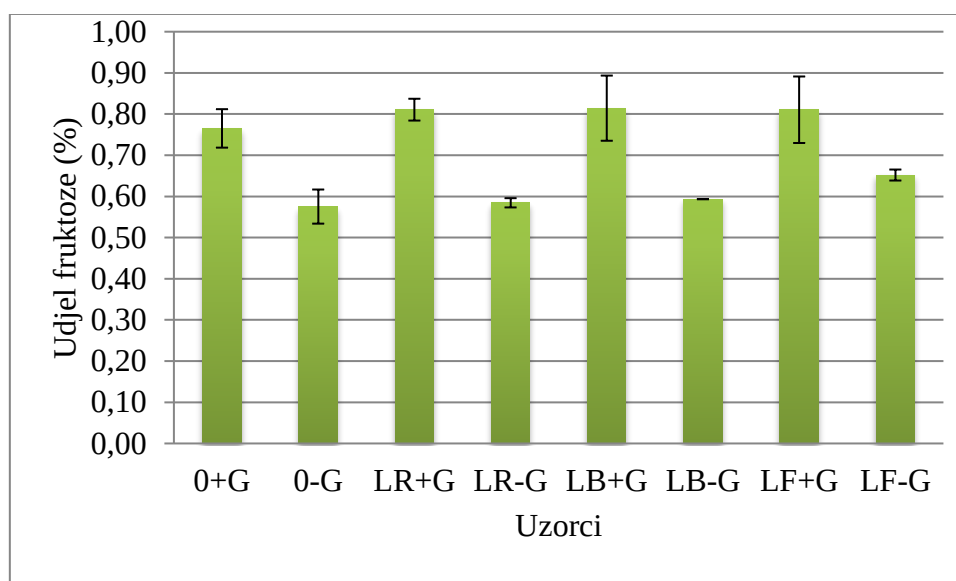
Udjel šećera u krušnom tijestu prije fermentacije ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK prikazan je na slikama 14 do 16.



Slika 14. Udjel saharoze na početku fermentacije krušnog tijesta ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 15. Udjel glukoze na početku fermentacije krušnog tijesta ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 16. Udjel fruktoze na početku fermentacije krušnog tijesta ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK

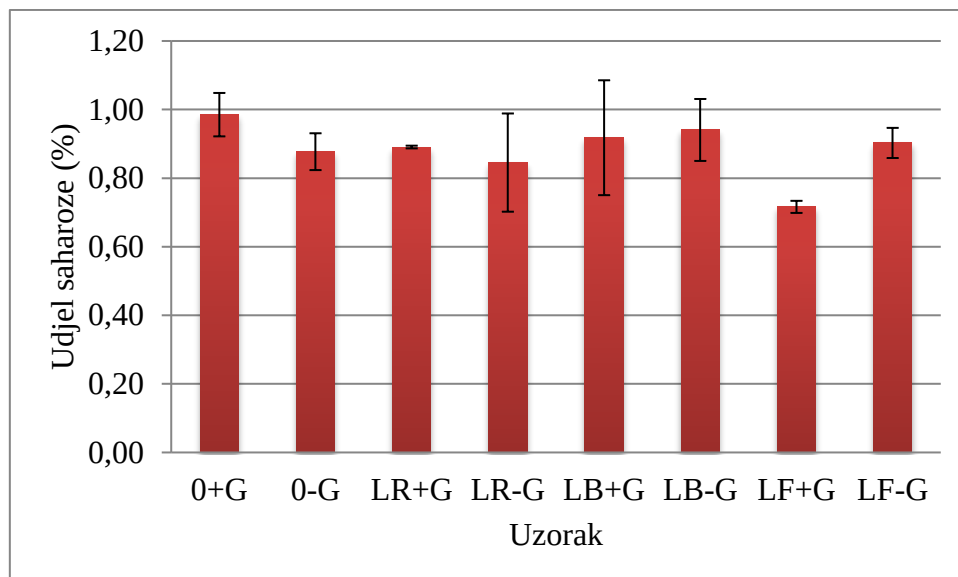
Fermentirano bezglutensko kiselo tijesto dodano je u krušni zamjes (20 %). Prije početka krušne fermentacije određen je udjel šećera. Najveći udjel glukoze određen je u uzorcima LB+G (0,80 %) i LB-G (0,79 %), a najmanji udjel glukoze u uzorku 0-G (0,51 %) (slika 15). Uzorci bez kisele fermentacije i uzorci fermentirani pomoću *L. reuteri* i *L. brevis* s dodatkom brašna graška imali su za 0,11 % do 0,18 % veći udjel saharoze u odnosu na uzorke

bez dodatka brašna graška. Najveći udjel saharoze detektiran je u uzorku 0+G (0,70 %), dok su uzorci LF+G i LF-G imali isti udjel saharoze (0,56 %) (slika 14). Udjel fruktoze u uzorcima s dodatkom brašna graška bio je u rasponu od 0,77 % do 0,81 %, a za uzorke bez dodatka brašna graška u rasponu od 0,58 % do 0,65 % (slika 16). Udjeli šećera u kiselom tijestu bili su znatno niži u odnosu na udjele određenih šećera u krušnom tijestu na početku fermentacije.

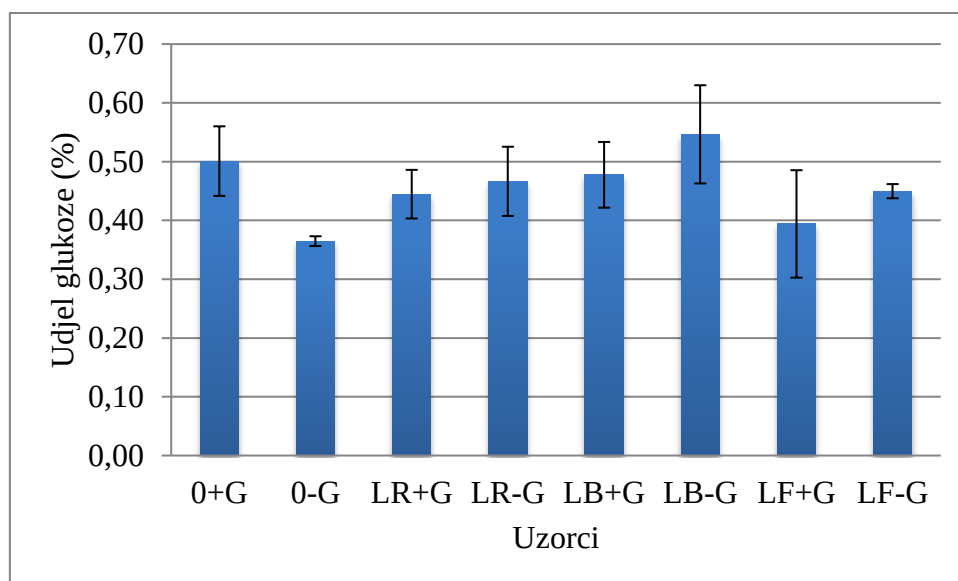
Ovisno o primijenjenom soju *L. plantarum*, u istraživanju Roberta i suradnika (2006), glukoza je određena u rasponu od 0,29 % do 0,35 %, a fruktoza u rasponu od 0,34 % do 0,35 %. U krušnom zamjesu na početku fermentacije odredili su veću koncentraciju šećera u odnosu na kiselo tijesto, što je sukladno s rezultatima ovog istraživanja. Hidalgo i Brandolini (2011) određivali su šećere u svim fazama proizvodnje pšeničnog kruha. Za pripremu kruha koristili su kvasac i različite vrste pšeničnog brašna (krušne i tvrde pšenice). U krušnom tijestu saharoza nije detektirana. Fruktoza je određena u rasponu od 3,53 % do 3,00 %, a glukoza u rasponu od 2,63 % do 1,93 %, ovisno o vrsti upotrijebljenog pšeničnog brašna.

4.1.3. Udjel šećera u krušnom tijestu na kraju fermentacije

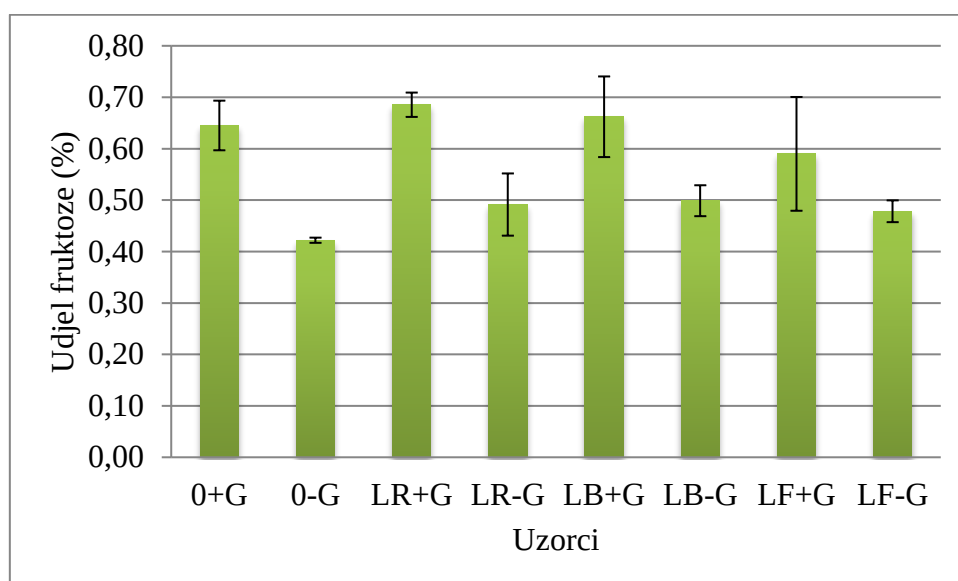
Udjel šećera u krušnom tijestu na kraju fermentacije ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK prikazan je na slikama 17 do 19.



Slika 17. Udjel saharoze na kraju fermentacije krušnog tijesta ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 18. Udjel glukoze na kraju fermentacije krušnog tijesta ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 19. Udjel fruktoze na kraju fermentacije krušnog tijesta ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK

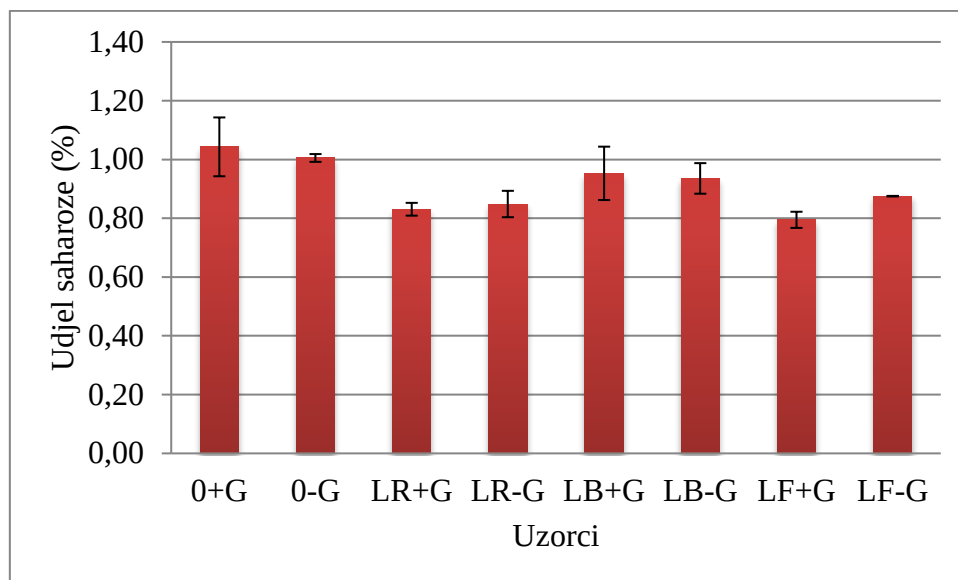
Nakon krušne fermentacije udjel glukoze i fruktoze bio je manji, a udjel saharoze veći u odnosu na početak krušne fermentacije. Udjel glukoze u uzorcima bez dodatka brašna graška fermentiranih pomoću BMK bio je veći za 0,02 % do 0,07 % u odnosu na uzorke s dodatkom brašna graška. U uzorku 0+G udjel glukoze bio je za 0,14 % veći od uzorka 0-G (slika 18). Uzorci krušnog tijesta na kraju fermentacije 0+G (0,99 %) i LR+G (0,89 %) sadržavali su veći udjel saharoze u odnosu na uzorke 0-G (0,88 %) i LR-G (0,85 %), dok je

kod uzoraka fermentiranih pomoću *L. brevis* i *L. fermentum* nalazio veći udjel saharoze u uzorcima bez dodatka brašna graška (0,94 i 0,90 %) (slika 17). Udjel fruktoze određen je u rasponu 0,59 % do 0,69 % u uzorcima s dodatkom brašna graška i 0,42 % do 0,50 % u uzorcima bez dodatka brašna graška (slika 19).

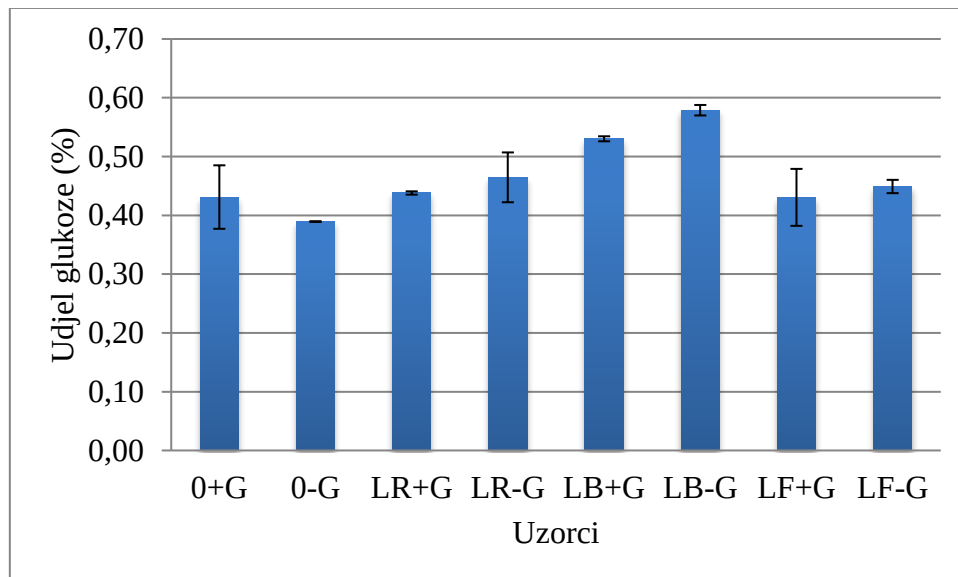
U krušni zamjes osim kiselog tijesta dodan je i kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*). Već nakon 10 minuta od zamjesa krušnog tijesta Robert i suradnici (2006) navode da je hidrolizom saharoze u krušnom tijestu, koncentracija glukoze i fruktoze bila veća 2 do 4 puta u odnosu na saharozu. Saharoza je hidrolizirana na glukozu i fruktozu katalitičkim djelovanjem kvašćeve invertaze. U provedenim istraživanjima uočeno je da kvasci preferiraju monosaharide kao supstrate, dok se disaharidi nakupljaju u tijestu (Hidalgo i Brandolini, 2011). Robert i suradnici (2006) odredili su 0,1 % glukoze u uzorcima fermentiranim pomoću *L. plantarum*, dok je u kontrolnom uzoraku određeno 0,5 % glukoze. Fermentacijom krušnog tijesta pomoću bakterije *L. plantarum* udjel fruktoze bio je niži (0,18 % do 0,21 %) u odnosu na krušno tijesto prije fermentacije. Povećanju udjela fruktoze može pridonijela je hidroliza fruktozana iz brašna. Također, primjenom obligatno homofermentativne, fakultativno ili obligatno heterofermentativne bakterije mliječne kiseline definira se i potrošnja šećera (Robert i sur., 2006; Martinez-Anaya, 1996). Hidalgo i Brandolini (2011) odredili su znatno manji udjel glukoze (0,03 % do 0,60 %) i fruktoze (0,11 % do 1,63 %) na kraju krušne fermentacije u odnosu na tijesto prije fermentacije.

4.1.4. Udjel šećera u kruhu (sredina i kora kruha)

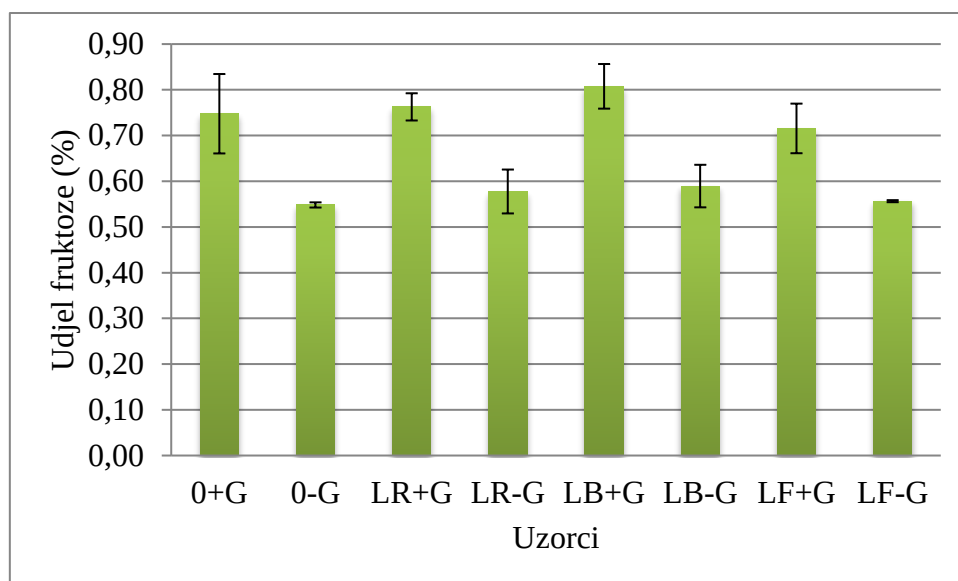
Udjel šećera u kruhu (sredina i kora kruha) ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK prikazan je na slikama 20 do 22.



Slika 20. Udjel saharoze u kruhu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 21. Udjel glukoze u kruhu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 22. Udjel fruktoze u kruhu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK

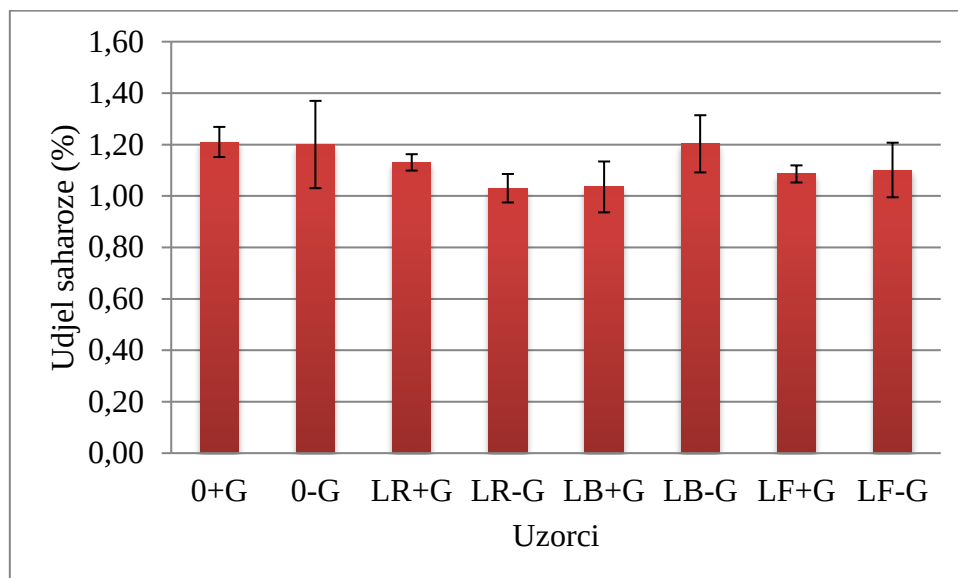
Pečenje kruha je zadnji postupak u procesu proizvodnje kruha tijekom kojeg se odvijaju brojne fizikalne, kemijske i biološke promijene. Udjel određivanih šećera u uzorcima kruha bio je veći u odnosu na krušno tijesto na kraju fermentacije. Glukoza je određena u najmanjem udjelu u uzorcima 0+G (0,46 %) i 0-G (0,43 %). Najveći udjel glukoze određen je u uzorcima fermentiranim pomoću *L. brevis* (0,53 do 0,58 %) dok je u uzorcima fermentiranim pomoću *L. reuteri* i *L. fermentum* udjel glukoze bio 0,43 % do 0,46 % (slika 21). Udjel saharoze u uzorcima bez kisele fermentacije i fermentiranih pomoću *L. brevis* s dodatkom brašna graška (0,95 % do 1,04 %) imali su veći udjel u odnosu na uzorke bez dodatka brašna graška (0,94 % do 1,01 %). Uzorci fermentirani pomoću *L. reuteri* i *L. fermentum* s dodatkom brašna graška (0,79 % do 0,83 %) imali su manji udjel saharoze u odnosu na uzorke bez dodatka brašna graška (0,85 % do 0,88 %) (slika 20). Udjel fruktoze je određen u uzorcima s dodatkom brašna graška u rasponu 0,72 % do 0,81 %, dok je u uzorcima bez dodatka brašna graška određena u manjem udjelu (0,55 % do 0,59 %) (slika 22).

Koncentracija glukoze u kruhu izmjerena u istraživanju Roberta i suradnika (2006) bila je 0,01 % do 0,03 %, a u kontrolnom uzorku glukoza uopće nije detektirana. U odnosu na krušno tijesto određena je 10 puta manja koncentracija glukoze. Koncentracija glukoze je manja uslijed reakcija posmeđivanja tijekom pečenja kruha. Udjel fruktoze (0,15 % do 0,18 %) u navedenom istraživanju ostao je gotovo nepromijenjen u odnosu na koncentraciju u krušnom tijestu. Formiranje kore i posmeđivanje tijekom pečenja kruha prvenstveno utječe na formiranje boje i arome kruha. Posmeđivanje je rezultat Maillardovih reakcija i

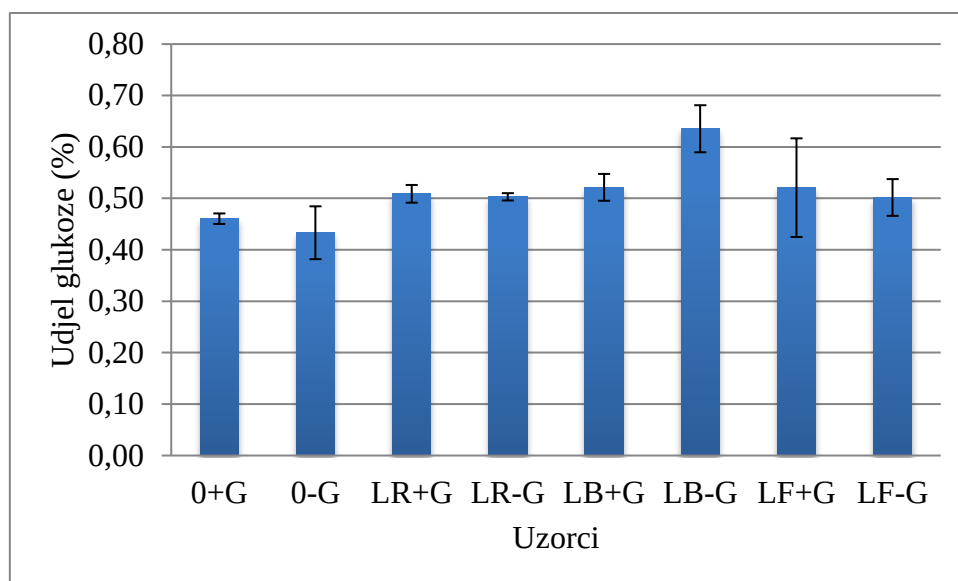
karamelizacije šećera. Slobodne aminokiseline stupaju u reakcije s reducirajućim šećerima (glukoza i fruktoza) (Belitz i sur., 2009). Nakon enzimskih aktivnosti u brašnu i djelovanja mikroorganizama kao i neenzimskih reakcija posmeđivanja tijekom pečenja kruha (Maillardove reakcije i reakcije karamelizacije) u kruhu zaostane određena koncentracija šećera. U istraživanju autora Hidalgo i Brandolini (2011) udjel fruktoze i saharoze u uzorcima kruha bio je veći u odnosu na krušno tijesto na kraju fermentacije, a udjel glukoze je manji. Hidalgo i Brandolini (2011) odredili su 0,48 % do 2,16 % fruktoze, 0,02 % do 0,25 % glukoze i 0,03 % do 0,08 % saharoze (ovisno o primijenjenoj vrsti pšeničnog brašna).

4.1.5. Udjel šećera u kori kruha

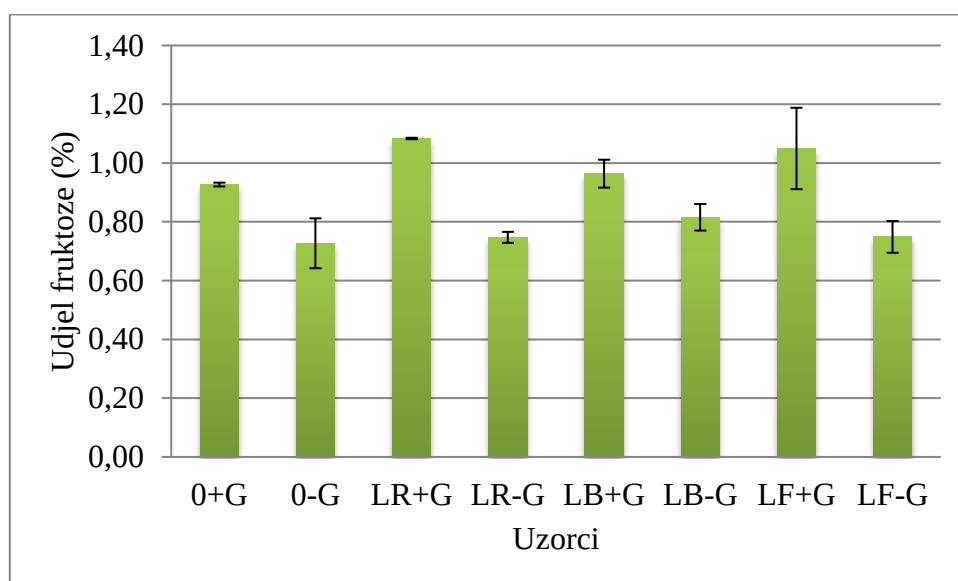
Udjel šećera u kori kruha ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK, prikazan je na slikama 23 do 25.



Slika 23. Udjel saharoze u kori kruha ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 24. Udjel glukoze u kori kruha ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 25. Udjel fruktoze u kori kruha ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK

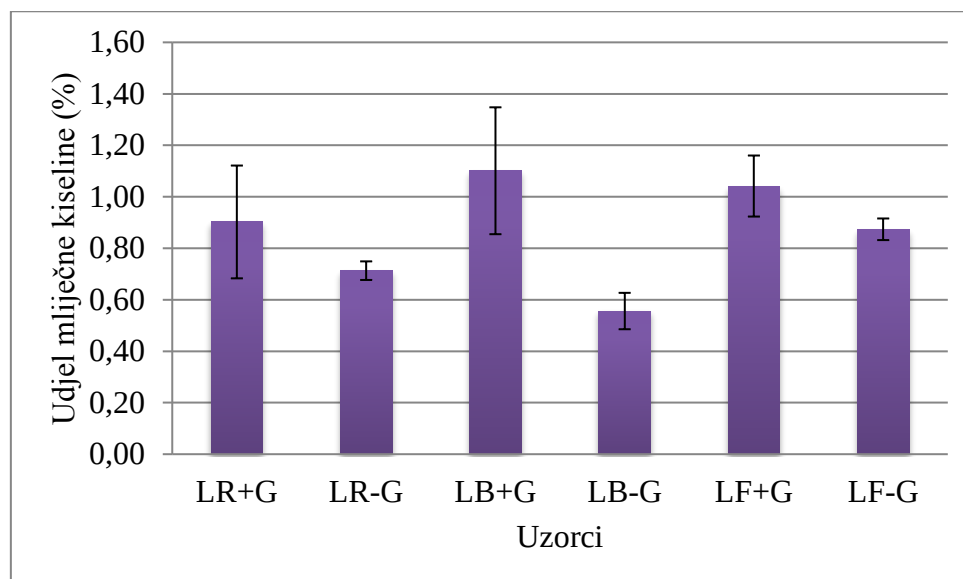
Analizirani uzorci kore kruha imali su za 0,03 % do 0,09 % veći udjel glukoze i za 0,08 % do 0,33 % veći udjel saharoze i fruktoze u odnosu na uzorke kruha. Udjel fruktoze u uzorcima kore kruha, kao i u ostalim fazama proizvodnje kruha, bio je veći u uzorcima s dodatkom brašna graška (0,93 % do 1,08 %) (slika 25). U uzorcima bez dodatka brašna graška fruktoza je određena u rasponu 0,73 % do 0,82 % (slika 25). Uzorci 0+G (1,21 %) i LR+G (1,13 %) imali su veći udjel saharoze (slika 23) u odnosu na uzorke 0-G (1,20 %) i LR-G (1,03 %). S druge strane uzorci bez dodatka brašna graška fermentirani pomoću *L. brevis* i

L. fermentum imali su veći udjel saharoze (1,10 % do 1,20 %) (slika 23) u odnosu na uzorke s dodatkom brašna graška (1,04 % do 1,09 %) (slika 23). Udjel glukoze (slika 24) u uzorcima 0+G (0,46 %) i 0-G (0,43 %) bio je manji u odnosu na uzorke fermentirane pomoću BMK, koji su imali udjel jednak ili veći od 0,50 %. Najveći udjel glukoze određen je u uzorku LB-G (0,64 %). Uzorak LB-G bio je jedini uzorak kore kruha bez dodatka brašna graška u kojem je određen veći udjel glukoze u odnosu na uzorke s dodatkom brašna graška.

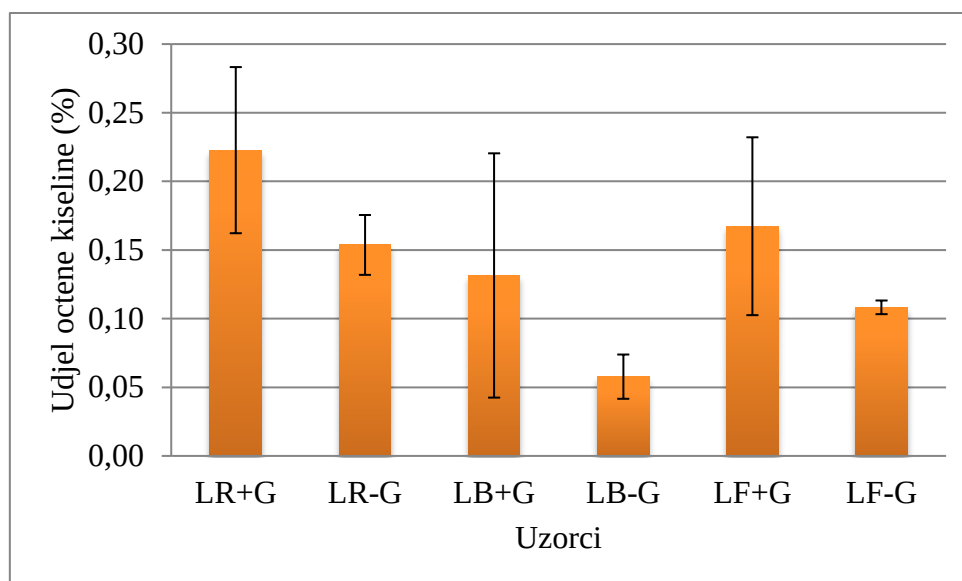
Hidalgo i Brandolini odredili su udjel fruktoze 0,24 % do 1,26 % i udjel glukoze 0,02 % do 0,21 %. Fruktoza i glukoza određene u uzorcima kore kruha nalazile su se u manjem udjelu u odnosu na uzorke krušnog tijesta i kruha. Udjel saharoze (0,03 % do 0,28 %) u navedenom istraživanju bio je veći u odnosu na krušno tijesto i kruh (sredina). Manji udjel reducirajućih monosaharida glukoze i fruktoze određen je zbog djelovanja Maillardovih reakcija.

4.1.6. Udjel mliječne i octene kiseline u kiselom tijestu

Udjel organskih kiselina u uzorcima kiselog tijesta i kruha ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK prikazan je na slikama 26 i 27.



Slika 26. Udjel mliječne kiseline u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK



Slika 27. Udjel octene kiseline u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim sirovinama i BMK

Udjel mliječne i octene kiseline određen je u uzorcima kiselog tijesta, jer je upravo u tim uzorcima najveća koncentracija organskih kiselina. Koncentracija mliječne i octene kiseline u uzorcima bez kisele fermentacije (0-G i 0+G) nije određivana. Uzorci kiselog tijesta kojima je dodano brašno graška sadržavali su veći udjel mliječne kiseline (0,90 % do 1,10 %, slika 26) u odnosu na uzorke bez dodatka brašna graška 0,56 % do 0,87 % (slika 26). Uzorci kiselog tijesta fermentirani pomoću *L. brevis* i *L. fermentum* s dodatkom brašna graška imali su udjel octene kiseline 0,13 % do 0,17 %, do su uzorci bez dodatka brašna graška fermentirani pomoću istih BMK imali udjel octene kiseline 0,06 % do 0,11 % (slika 27). Udjel octene kiseline u uzorku LR+G (0,22 %) također je bio veći od uzorka LR-G (0,15 %) (slika 27). Dodatak brašna graška utjecao je na veći udjel organskih kiselina u uzorcima kiselog tijesta. Heterofermentativne bakterije korištene za fermentaciju kiselog tijesta u ovom istraživanju utjecale su na razliku u udjelima obje kiseline. Prema slikama 26 i 27 vidljivo je da je BMK *L. reuteri* proizvela veći udjel octene kiseline, a manji udjel mliječne kiseline, u uzorcima kiselog tijesta s dodatkom i bez dodatka brašna graška u odnosu na druge ispitane BMK. *L. brevis* i *L. fermentum* proizveli su veći udjel mliječne kiseline i manji udjel octene kiseline, u uzorcima kiselog tijesta s dodatkom i bez dodatka brašna graška.

Robert i suradnici (2006) odredili su udjel mliječne kiseline 0,55 % do 0,57 % u uzorcima kiselog tijesta fermentiranih pomoću dva soja *L. plantarum*. Udjel octene kiseline bio je detektiran sa svega 0,03 %. Udjeli mliječne i octene kiseline u istraživanju Roberta i suradnika (2006) u korelaciji su s udjelima u uzorku LB-G. Novotni i suradnici (2011)

odredili su udjel mliječne i octene kiseline u uzorcima kiselog tijesta fermentiranog različitim BMK. Za pripremu kiselog tijesta koristili su brašno cjelovitog zrna pšenice, fermentacija se provela do postignutog pH 4. Korišteni su *L. plantarum*, *L. brevis* s dodatkom kvasca *S. cerevisiae*, *L. fermentum* s dodatkom fitaze i bez fitaze. Udjel mliječne kiseline bio je u rasponu 0,88 % do 0,96 % određen u uzorcima fermentiranim pomoću *L. plantarum* i *L. fermentum*, a 0,67 % u uzorku fermentiranom pomoću *L. brevis*. Octena kiselina je detektirana s udjelom 0,01 % u uzorku fermentiranom pomoću *L. plantarum*, a u uzorcima fermentiranim pomoću *L. brevis* i *L. fermentum* u udjelu od 0,14 % do 0,19 %. U istraživanju Novotni i suradnika (2011) nije dodano brašno graška u pripremi kiselog tijesta pa dobiveni udjeli mliječne i octene kiseline u uzorcima kiselog tijesta fermentiranog pomoću *L. fermentum* odgovaraju udjelima određenih kiselina u uzorku LF-G. Udjel kiselina u uzorku LB-G (0,56 % mliječne kiseline i 0,06 % octene kiseline) (slike 26 i 27) manji je u odnosu na udjel kiselina u uzorku fermentiranom pomoću *L. brevis* u istraživanju Novotni i suradnika (2011). Novotni i sur. (2012) fermentaciju bezglutenskog kiselog tijesta provedena je pomoću komercijalne starter kulture *L. fermentum*. Udjel određene mliječne kiseline bio je 0,17 %, a udjel octene kiseline 0,02 %. Dobiveni udjeli kiselina manji su u odnosu na udjele kiselina u ovom istraživanju. Za pripremu kiselog tijesta u ovom istraživanju korišteno je integralno brašno žitarica koje služi kao izvor mineralnih tvari za BMK te su udjeli mliječne i octene kiseline bili veći od udjela tih kiselina u istraživanju autora Novotni i sur. (2012).

Nakon izračunatih koncentracija mliječne i octene kiseline iz jednadžbi pravaca baždarnih dijagramu uzorcima kiselog tijesta izračunat je fermentabilni koeficijent (FQ), a vrijednosti su prikazane u tablici 6.

Tablica 6. Fermentabilni koeficijent (FQ) analiziranih uzoraka kiselog tijesta

Uzorak	FQ
LR+G	2,70
LR-G	3,09
LB+G	5,58
LB-G	6,42
LF+G	4,15
LF-G	8,07

BMK primijenjene za fermentaciju u ovom istraživanju bile su obligatno heterofermentativne bakterije *L. brevis*, *L. fermentum* i *L. reuteri*. Svaka od primijenjenih

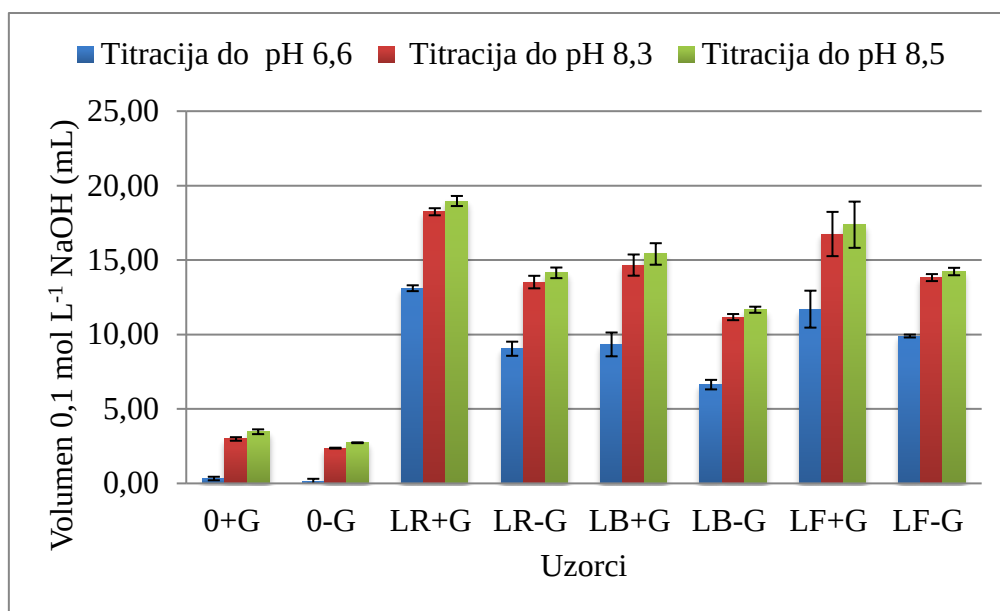
BMK utjecala je na različit udjel mliječne i octene kiseline u uzorcima (slika 26 i 27) pa je FQ bio različit s obzirom na primijenjenu BMK. Najmanji FQ određen je u uzorcima LR+G (2,70) i LR-G (3,09), a najviši u uzorcima LB-G (6,42) i LF-G (8,07). Uzorcima s dodatkom brašna graška fermentiranih pomoću *L. reuteri* i *L. brevis* određen je manji FQ za 0,39 do 0,84 uspoređujući s uzorcima fermentiranih pomoću istih BMK bez dodatka brašna graška. Kod uzorka LF+G određen je gotovo duplo manji FQ od uzorka LF-G. Rizzello i suradnici (2016) odredili su FQ od 13,7 u uzorku bezglutenskog kiselog tijesta fermentiranog pomoću *L. plantarum* i *L. rossiae*. Kiselim tijestu proizvedenom fermentacijom brašna graška pomoću *L. plantarum* i *L. brevis* određen je FQ 33,0 (Curiel i sur., 2015). Dobivene vrijednosti FQ u ovom istraživanju bile su znatno niže od rezultata navedenih radova.

4.2. pH I UKUPNA KISELOST

Ukupna kiselost u ovom radu izražena je kao volumen (mL) 0,1 mol L⁻¹ NaOH potrošen za titraciju 10 g uzorka kiselog tijesta. Uzorci su titrirani do pH 6,6, pH 8,3 i pH 8,5. Ukupna kiselost je određivana u uzorcima kiselog tijesta i kruha. Prije titracije uzoraka određen je početni pH uzoraka kiselog tijesta i kruha. Izmjerene vrijednosti prikazane su u tablici 7. Ukupna kiselost kiselog tijesta i kruha prikazana je na slikama 28 i 29.

Tablica 7. pH uzoraka kiselog tijesta i kruha

Uzorak	KT	KRUH
0+G	6,42	7,09
0-G	6,50	7,28
LR+G	3,99	6,50
LR-G	3,97	6,71
LB+G	4,24	6,63
LB-G	4,18	6,89
LF+G	4,11	6,59
LF-G	3,86	6,74

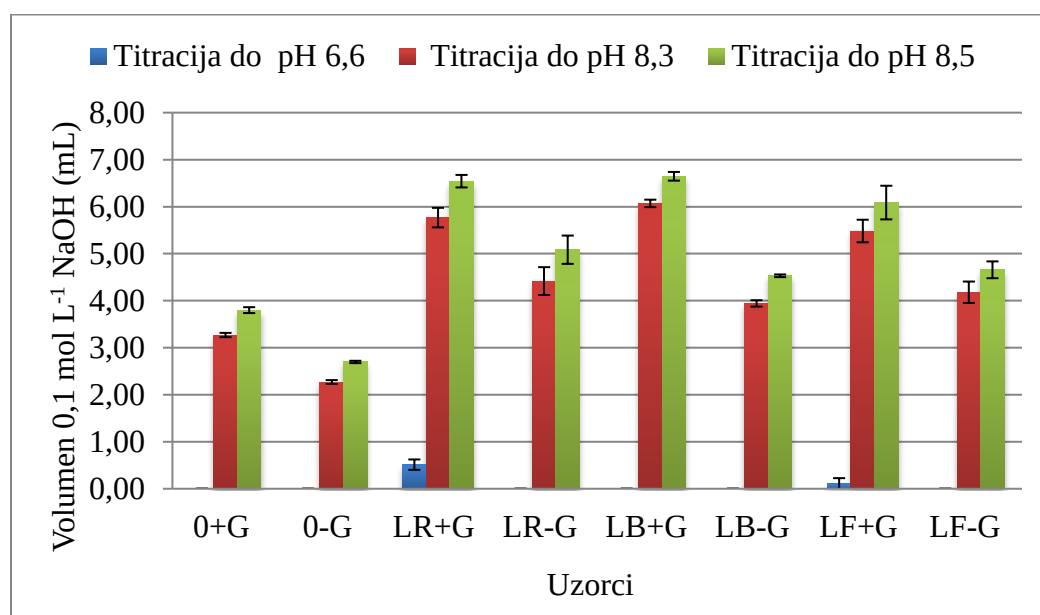


Slika 28. Ukupna kiselost kiselog tijesta

Formiranje organskih kiselina tijekom fermentacije rezultat je metabolizma primijenjenih BMK, ali i dostupnosti fermentabilnih šećera u brašnu (Moore i sur., 2008). pH uzoraka bez kisele fermentacije je iznosio 6,42 za uzorak 0+G KT i 6,50 za uzorak 0-G KT. S obzirom na određene vrijednosti pH uzoraka bez kisele fermentacije (0+G KT i 0-G KT) očekivano je određena znatno niža ukupna kiselost (3,47 i 2,73 mL) u odnosu na uzorke kiselog tijesta. Fermentacijom ugljikohidrata povećava se populacija BMK i udjel organskih kiselina pa je pH uzoraka kiselog tijesta manji. Izmjerene su vrijednosti pH 3,88 do 4,24 za uzorke kiselog tijesta. Slika 28 prikazuje da su uzorci kiselog tijesta fermentiranih pomoću BMK s dodatkom brašna graška imali veću ukupnu kiselost (15,41 do 18,97 mL NaOH) u odnosu na one bez dodatka brašna graška (11,66 do 14,23 mL NaOH). Udjel mliječne i octene kiseline bio je veći u uzorcima s dodatkom brašna graška, kao što je opisano ranije u istraživanju. Većim udjelom kiselina manji je pH u uzorcima, a time je potreban veći volumen lužine za titraciju uzoraka pa je ukupna kiselost veća.

U istraživanju Woltera i suradnika (2014) pH kiselog tijesta bilo je 5,9 do 6,3 za uzorke bez fermentacije BMK, a za uzorke fermentirane bakterijom *L. plantarum* 3,6 do 4,4. Titracijom uzoraka do pH 8,5 odredili su ukupnu kiselost 1,3 do 3,2 mL NaOH za uzorke bez fermentacije i 4,8 do 35,3 mL NaOH za uzorke kiselog tijesta. Wolter i suradnici (2014) fermentaciju su proveli tijekom 24 sata, a pripremljeno je šest uzoraka kiselog tijesta. Upotrijebljena su brašna heljde, zob, pšenice, sirka, kvinoje i tef, a za svaki uzorak je korištena jedna vrsta brašna. Moore i suradnici (2008) proučavali su bezglutenski kruh s

dodatkom brašna soje. U pripremi kiselog tijesta korišteno je brašno riže, soje i heljda. Fermentacija je provedena pomoću bakterija *L. plantarum* i *L. sanfranciscensis* u trajanju od 48 h. U krušni zamjes je dodan i kvasac. Nakon 48 h fermentacije izmjeren je pH 3,81 za uzorak fermentiran pomoću bakterije *L. plantarum* i 4,08 za uzorak fermentiran pomoću bakterije *L. sanfranciscensis*. Ukupna kiselost bila je 18,88 mL NaOH za uzorak fermentiran pomoću *L. plantarum* i 12,88 mL NaOH za uzorak fermentiran pomoću *L. sanfranciscensis* (titrirano do pH 8,5). Prema izmjerenim pH vrijednostima i ukupnoj kiselosti rezultati prikazuju da *L. plantarum* proizvodi više organskih kiselina od *L. sanfranciscensis*. Curiel i suradnici (2015) proveli su fermentaciju brašna graška *L. plantarum* i *L. brevis*. Fermentacija je provedena tijekom 48 h. Izmjerena pH vrijednost uzorka kiselog tijesta iznosila je 4,3, a ukupna kiselost bila je 20,6 mL 0,1 M NaOH (titrirano do pH 8,3). pH vrijednost uzoraka kiselog tijesta fermentiranih pomoću BMK u ovom istraživanju odgovaraju vrijednosti dobivenoj u istraživanju Roberta i suradnika (2006). Izmjerili su pH uzoraka 3,82 do 4,08 ovisno o primijenjenoj BMK. Titracijom uzoraka do pH 8,5 ukupna kiselost bila je svega 7,00 do 7,3 mL NaOH, što je znatno manji volumen (15,41 do 18,97 mL) u odnosu na ovo istraživanje.



Slika 29. Ukupna kiselost kruha

Pečenje je zadnja faza u postupku pripreme kruha. Tijekom pečenja pH kruha povećava se zbog gubitka hlapljivih organskih kiselina kao što je octena kiselina (Semić i Bauman, 2011). Većina analiziranih uzoraka kruha imala je pH iznad 6,6 (tablica 7). Samo dva uzorka su titrirana do pH 6,6. Za uzorak LR+G KT ukupna kiselost bila je 0,51 mL

NaOH i 0,11 mL NaOH za uzorak LF+G KT. Ukupna kiselost za uzorke fermentirane BMK s dodatkom brašna graška iznosila je od 6,09 do 6,65 mL a za uzorke bez dodatka brašna graška od 4,53 do 5,09 mL (titrirano do pH 8,5). Ukupna kiselost uzoraka bez kisele fermentacije iznosila je 3,80 mL za uzorak 0+G i 2,70 mL za uzorak 0-G. Uzorci s dodatkom brašna graška imali su veću ukupnu kiselost u odnosu na one bez dodatka brašna graška kao i kod ukupne kiselosti kiselog tijesta. pH uzoraka pšeničnog kruha u istraživanju Roberta i suradnika (2006) bile su 4,11 do 4,35 ovisno o primijenjenoj BMK. Za očekivati su bile znatno veća ukupna kiselosti zbog niskog pH uzoraka, ali je određena ukupna kiselost od svega 4,9 do 5,3 mL, ovisno o primijenjenoj BMK. U istraživanju Moore i suradnika (2008), pH uzoraka bezglutenskog kruha bio je 5,22 za *L. plantarum* i 5,27 za *L. sanfranciscensis*, a ukupna kiselost 5,61 i 5,31 mL.

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj dodatka brašna žutog graška i primjene različitih vrsta bakterija mliječne kiseline za pripremu kiselog tijesta na udjel šećera kao prekursora aromatskih spojeva, udjel kiselina i ukupnu kiselosti u svim fazama proizvodnje bezglutenskog kruha. Na temelju provedenih eksperimenata i obrađenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Udjel šećera u uzorcima kiselog tijesta, krušnog tijesta na početku i na kraju fermentacije, u kruhu i kori kruha ovisi o primijenjenoj BMK. Uzorci kiselog tijesta, krušnog tijesta na početku i na kraju fermentacije, u kruhu i kori kruha fermentirani pomoću BMK imali su veći udjel glukoze i fruktoze, dok je udjel saharoze bio veći u svim analiziranim uzorcima bez kisele fermentacije.
2. Udjel saharoze i fruktoze najmanji je u uzorcima kiselog tijesta, dok se u ostalim fazama proizvodnje kruha njihov udjel povećava. Udjel glukoze najmanji je na kraju krušne fermentacije.
3. Dodatak brašna graška utjecao je na veći udjel saharoze, glukoze i fruktoze u većini uzoraka tijekom svih faza proizvodnje kruha. Izuzetak je udjel glukoze u uzorcima kiseljenim pomoću BMK, odnosno s dodatkom kiselog tijesta.
4. Određeni udjel mliječne kiseline veći je 4 do 9 puta od udjela octene kiseline. Primjena različitih BMK utječe na udjel kiselina u kiselom tijestu. *L. brevis* i *L. fermentum* proizvode više mliječne kiseline, a *L. reuteri* više octene kiseline. Udjel mliječne kiseline veći je u uzorcima kiselog tijesta s dodatkom brašna graška za 0,17 do 0,54 %, a octene kiseline za 0,05 % do 0,07 % u odnosu na uzorke kiselog tijesta bez dodatka brašna graška.
5. Fermentabilni koeficijent veći je za 0,39 do 3,92 u uzorcima kiselog tijesta bez dodatka brašna graška.
6. Dodatak brašna graška utječe na povećanje ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha fermentiranih pomoću BMK. Primjena različitih BMK utječe na razliku ukupne kiselosti kiselog tijesta, ali ne i na ukupnu kiselost kruha.

6. LITERATURA

Agboola, S. O., Mofolasayo, O. A., Watts, B. M., Aluko, R. E. (2010) Functional properties of yellow field pea (*Pisum sativum L.*) seed flours and the in vitro bioactive properties of their polyphenols. *Food Res. Int.* **43**, 582-588.

Angioloni, A., Collar, C. (2012) High legume-wheat matrices: an alternative to promote bread nutritional value meeting dough viscoelastic restrictions. *Eur. Food Res.* **234**, 273-284.

Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E. K. (2016) Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *Int. J. Food Microbiol.* **239**, 86-94.

Axelsson, L. (1998) Lactic acid bacteria, Classification and physiology. U: Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects, (Salminen, S., von Wright, A., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 1-72.

Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009) Food Chemistry, 4. izd., Springer, Heidelberg, str. 726-731.

Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W. P. (1995) Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide, Mehl Brot* **49**, 370-374.

Bojnanská, T., Francáková, H., Líšková, M., Tokár, M. (2012) Legumes – the alternative new materials for bread production. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **1**, 876-886.

Bouasla, A., Wójtowicz, A., Zidoune, M. N. (2017) Gluten-free precooked rice pasta enriched with legumes flours: Physical properties, texture, sensory attributes and microstructure. *Food Sci. Technol.-Leb.* **75**, 569-577.

Bouzas, J., Kantt, C. A., Bodyfelt, F., Torres, J. A. (1991) Simultaneous Determination of Sugars and Organic Acids in Cheddar Cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Food Sci.* **56**, 276-278.

Brandt, M. J. (2007) Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiol.* **24**, 161-164.

Catassi, C., Fasano, A. (2008) Celiac disease. U: Gluten-free cereal products and beverages, (Arendt, E. K., Dal Bello, F., ured.), Elsevier Science & Technology, SAD, str. 1-22.

- Collar, C., Benedito de Barber, C., Martínez-Anaya, M. A. (1994) Microbial sourdoughs influence acidification properties and bread-making potential of wheat dough. *J. Food Sci.* **59**, 629-633.
- Corsetti, A. (2013) Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Applications. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, M., ured.), Springer, New York, str. 85-105.
- Corsetti, A., Settanni, L. (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* **40**, 539-558.
- Curiel, J. A., Coda, R., Centomani, I., Summo, C., Gobbetti, M., Rizzello, C. G. (2015) Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: the potential of sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **196**, 51-61.
- De la Hera, E., Rosell, C. M., Gomez, M. (2014) Effect of water content and flour particle size on gluten-free bread quality and digestibility. *Food Chem.* **151**, 526-531.
- De Vuyst, L., Neysens, P. (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 43-56.
- De Vuyst, L., Vancanneyt, M. (2007) Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **24**, 120-127.
- Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kühne, B., Van de Walle, D., Courtens, T. M., Gellynck, X. (2008) Nutritional value of bread: Influence on processing, food interaction and consumer perception. *J. Cereal Sci.* **48**, 243-257.
- Don, C., Lichtendonk, W. J., Pijter, J. J., Hamer, R. J. (2003) Glutenin macropolymer: a gel formed by glutenin particles. *J. Cereal Sci.* **37**, 1-7.
- Galal, A. M., Johnson, J. A., Varriano-Marston, E. (1978) Lactic and volatile (C2-C5) organic acids of San Francisco sourdough French bread. *Cereal Chem.* **55**, 461-468.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., Arendt, E. K. (2003a) Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *J. Food Eng.* **56**, 153-161.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., Arendt, E. K. (2004) Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Food Sci. Technol.* **15**, 143-152.
- Gallagher, E., Kunkel, A., Gormley, T. R., Arendt, E. K. (2003b) The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-

term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *Eur. Food Res. Technol.* **218**, 44-48.

Gänzle, M. G. (2015) Lactic metabolism revisited, Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* **2**, 106-117.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G. (2008) Sourdough/lactic acid bacteria. U: Gluten-free cereal products and beverages, (Arendt, E. K., Dal Bello, F., ured.), Elsevier Science & Technology, SAD, str. 267-282.

Grba, S., Stehlik-Tomas, V. (2010) Primjena kvasaca u pekarstvu. U: Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, (Grba, S. ured.), Plejada, Zagreb, str. 301-329.

Guillon, F., Champ, M. M. J. (2002) Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Brit. J. Nutr.* **88**, 293-306.

Gujral, H. S., Rosell, C. M. (2004) Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *J. Cereal Sci.* **39**, 225-230.

Hammes, W. P., Gänzle, M. G. (1998) Sourdough breads and related products. U: Microbiology of Fermented Foods, (Woods, B. J. B., ured.), Blackie Academic/Professional, London, str. 199-216.

Hidalgo, A., Brandolini, A. (2011) Evaluation of heat damage, sugars, amylases and colour in breads from einkorn, durum and bread wheat flours. *J. Cereal Sci.* **54**, 90-97.

Hsu, D., Leung, H. K., Finney, P. L., Morad, M. M. (1980) Effect of germination on nutritive value and baking properties of dry peas, lentils and faba beans. *J. Food Sci.* **45**, 87-92.

Koehler, P., Wieser, H. (2013) Chemistry of Cereal Grains. U: Handbook on Sourdough Biotechnology, (Gobbetti, M., Gänzle, E.), Springer Science & Business Media, New York, str. 18-31.

Kohajdová, Z., Karovičová, J., Magala, M. (2013) Rheological and qualitative characteristics of pea flour incorporated cracker biscuits. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **5**, 11-17.

Larre, C., Denery, P. S., Popineau, Y., Deshayes, G., Desserme, C., Lefebvre, J. (2000) Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chem.* **77**, 32-38.

- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C. G. (2007) Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *J. Food Eng.* **79**, 1033-1047.
- Lefebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., Fontagne-Faucher, C. (2002) Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process. *Food Sci. Technol.-Leb.* **35**, 407-414.
- Mariotti, M., Lucisano, M., Pagani, M. A., Ng, P. K. W. (2009) The role of corn starch, amaranth flour, pea isolate, and *Psyllium flour* on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. *Food Res. Int.* **42**, 963-975.
- Marković, K., Hruškar, K., Vahčić, N. (2006) Likopen u rajčici – svojstva, stabilnost i važnost u prehrani, Hinus, Zagreb, str. 42.
- Martin, M. L., Hoseney, R. C. (1991) A mechanism of bread firming II. Role of starch hydrolyzing enzymes. *Cereal Chem.* **68**, 503-507.
- Martinez-Anaya, M. A. (1996) Enzymes and bread flavour. *J. Agr. Food Chem.* **44**, 2469-2480.
- Martinez-Anaya, M. A., Pitarch, B., Bayarri, P., Benedito De Barber, C. (1989) Microflora of the sourdough of wheat flour bread. Changes in sugars and organic acid production during fermentation of wheat doughs made with pure strains of microorganisms. *Rev. Agroquim. Tecnol.* **29**, 63-76.
- Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B., Capellas, M. (2012) Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. *J. Cereal Sci.* **56**, 476-481.
- Mohammed, I., Ahmed, A. R., Senge, B. (2012) Dough rheology and bread quality of wheat-chickpea flour blends. *Ind. Crops Prod.* **36**, 196-202.
- Molina-Rosell, C. (2014) Cereal-Derived Gluten-Free Foods. U: Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity, (Rodrigo, L., Pena, A. S., ured.), OmniaScience, Barcelona, str. 447-461.
- Moore, M. M., Dal Bello, F., Arent, E. K. (2008) Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 1309-1316.

Moroni, A. V., Dal Bello, F., Arendt, E. K. (2009) Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiol.* **26**, 676-684.

Mrvčić, J., Mikelec, K., Stanzer, D., Križanović, S., Bačun-Družina, V., Stehlik-Tomas, V. (2011) Sourdough – Traditional Methods for Improving Quality of Bakery Products. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **6**, 89-99

Mrvčić, J., Stanzer, D., Božić, D., Stehlik-Tomas, V. (2008) Sirutka – sirovina za proizvodnju starter kultura za pekarstvo. *Mljekarstvo* **58**, 117-130.

Novotni, D., Čukelj, N., Smerdel, B., Bituh, M., Dujmić, F., Ćurić, D. (2012) Glycemic index and firming kinetics of partially baked frozen gluten-free bread with sourdough. *J. Cereal Sci.* **55**, 120-125.

Novotni, D., Ćurić, D., Bituh, M., Colić Barić, I., Škevin, D., Čukelj, N. (2011) Glycemic index and phenolics of partially-baked frozen bread with sourdough. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **62**, 26-33.

Panjkota Krbavčić, I. (2008) Prehrana kod celijakije. *Medicus* **17**, 87-92.

Poutanen, K., Flander, L., Katina, K. (2009) Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiol.* **26**, 693-699.

Pravilnik o hrani za posebne prehrambene potrebe (2004) Narodne novine **81**, Zagreb.

Rizzello, C. G., Calasso, M., Campanella, D., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2014) Use of sourdough fermentation and mixture of wheat, chickpea, lentil and bean flours for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread. *Int. J. Food Microbiol.* **180**, 78-87.

Rizzello, C. G., Lorusso, A., Montemurro, M., Gobbetti, M. (2016) Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiol.* **56**, 1-13.

Robert, H., Gabriel, V., Lefebvre, D., Rabier, P., Vayssier, Y., Fontagné-Faucher, C. (2006) Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *Food Sci. Technol.-Leb.* **39**, 256-265.

Rouessac, F., Rouessac, A. (2007) Chemical Analysis - Modern Instrumentation Methods and Techniques, 2. izd., John Wiley & Sons, England, str. 63-93.

Sabanis, D., Lebesi, D., Tzia, C. (2009) Effect of dietary fibre enrichment on selected properties of gluten-free bread. *Food Sci. Technol.-Leb.* **42**, 1380-1389.

Semić, A., Bauman, I. (2011) Characteristics of bread dough soured by sourdough starters. *Radovi Poljoprivredno-prehrambenog Fakulteta Univerziteta u Sarajevu.* **56**, 133-154.

Spicher, G. (1983) Baked goods. U: *Biotechnology, Food and Feed Production With Microorganisms*, (Rehm, H. J., Reed, G., ured.), Verlag Chemie, Weinheim, str. 1-115.

Stojceska, V., Ainsworth, P., Plunkett, A., İbanoğlu, Ş. (2010) The advantage of using extrusion processing for increasing dietary fibre level in gluten-free products. *Food Chem.* **121**, 156-164.

Thompson, T. (2000) Folate, iron, and dietary fibre contents of the gluten-free diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **100**, 1389-1396.

Vriezinga, S. L., Auricchio, R., Bravi, E., Castillejo, G., Chmielewska, A., Crespo Escobar, P., Kolaček, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I. R., Mummert, E., Polanco, I., Putter, H., Ribes-Koninckx, C., Shamir, Szajewska, H., Werkstetter, Greco, L., Gyimesi, J., Hartman, C., Hogen Esch, C., M.D., Hopman, E., Ivarsson, A., Koltai, T., Koning, F., Martinez-Ojinaga, Marvelde, Pavic, A., Romanos, J., Stoopman, E., Villanacci, V., Wijmenga, C., Troncone, R., M., Mearin, L. (2014) Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1304-1315.

Wieser, H. (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **24**, 115-119.

Wolter, A., Hager, A. S., Zannini, E., Czerny, M., Arendt, E. K. (2014) Impact of sourdough fermented with *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 on baking and sensory properties of gluten-free breads. *Eur. Food Res. Technol.* **239**, 1-12.

Xu, J., Bietz, J. A., Carriere, C. J. (2007) Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. *Food Chem.* **101**, 1025-1030.

Yazynina, E., Johansson, M., Jägerstad, M., Jastrebova, J. (2008) Low folate content in gluten-free cereal products and their main ingredients. *Food Chem.* **111**, 236-242.

Ziobro, R., Witczak, T., Juszczak, L., Korus, J. (2013) Supplementation of gluten-free bread with non-gluten proteins. Effect on dough rheological properties and bread characteristic. *Food Hydrocolloid.* **32**, 213-220.