

# Utjecaj dodatka prekursora na spojeve arome bezglutenskog kruha

---

Radoš, 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:159:539748>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Kristina Radoš  
759/PI

**UTJECAJ DODATKA  
PREKURSORA NA SPOJEVE  
AROME BEZGLUTENSKOG  
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, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Saše Drakula, mag ing.

*Zahvaljujem se svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog rada.*

*Mojoj mentorici, doc. dr. sc. Dubravki Novotni, zahvaljujem na susretljivosti i pristupačnosti te uloženom trudu i vremenu tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Asistentici Saši Drakula, mag. ing. zahvaljujem za svu pruženu pomoć, preneseno znanje, strpljivost i razumijevanje kako tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada tako i tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Na kraju, zahvaljujem se svojim roditeljima na apsolutnoj podršci i razumijevanju tijekom svih pet godina studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ DODATKA PREKURSORA NA SPOJEVE AROME BEZGLUTENSKOG KRUHA

*Kristina Radoš, 759/PI*

**Sažetak:** S obzirom na sve veći broj oboljelih od celijakije ili drugih oblika intolerancije na gluten, posvećuje se sve više pozornosti razvoju pekarskih proizvoda bez glutena. Bezglutenski proizvodi na tržištu su prisutni duže vrijeme, međutim većina komercijalnih proizvoda ima tehnološke i senzorske nedostatke ali i siromašan nutritivni sastav.

Upravo zato, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka različitih prekursora (aminokiselina, enzima i šećera) na spojeve arome bezglutenskog kruha obogaćenog brašnom žutog graška sa ili bez dodatka kiselog tijesta. U ovom radu određena je koncentracija hlapljivih spojeva nositelja arome u uzorcima kruha i kore. Hlapljivi spojevi arome su ekstrahirani pomoću mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (HS-SPME) te su zatim analizirani pomoću plinske kromatografije-masene spektrometrije (GS-MS). Identificirano je 17 hlapljivih spojeva odgovornih za aromu kore i kruha i određene su njihove koncentracije u svim analiziranim uzorcima. S obzirom na koncentracije analiziranih spojeva utvrđeno je da dodatak kombinacije kiselog tijesta, arginina, enzima, prolina i fruktoze najpovoljnije utječe na poboljšanje arome bezglutenskog kruha.

**Ključne riječi:** *aromatski spojevi, bezglutenski kruh, prekursori, brašno žutog graška, kiselo tijesto*

**Rad sadrži:** 51 stranica, 40 slika, 6 tablica, 56 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:** *Saša Drakula, mag. ing., stručni suradnik*

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. Dubravka Novotni
2. Doc.dr.sc. Nikolina Čukelj
3. Doc.dr.sc. Marina Krpan
4. Izv.prof.dr.sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

**Datum obrane:** 19. srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Cereal Chemistry and Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF PRECURSORS ADDITION ON AROMA PROFILE OF GLUTEN-FREE BREAD

*Kristina Radoš, 759/PI*

**Abstract:** Due to the increasing number of celiac disease or other forms of gluten intolerance, more attention has been paid to the development of gluten-free bakery products. Gluten-free products are present on the market for a long time, however, most of these commercial products are deficient in terms of technological and sensory quality but also have low nutritional value.

Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of the addition of different precursors (amino acids, enzymes and carbohydrates) on the aroma profile of gluten-free bread, enriched with yellow peas flour with or without the addition of sourdough. In this paper, the concentration of volatile aroma compounds in the samples of bread and crust was determined. The volatile aroma compounds were previously extracted by solid phase microextraction (HS-SPME) and then analysed by gas chromatographic mass spectrometry (GS-MS). 17 volatile compounds responsible for the aroma were identified and their concentration was determined in all analysed samples. Considering the concentrations of the analysed compounds, it has been found that the combined addition of sourdough, arginine, enzyme, proline, and fructose most advantageously improves gluten free bread aroma profile.

**Keywords:** *aroma compounds, gluten-free bread, precursors, yellow pea flour, sourdough*

**Thesis contains:** 51 pages, 40 figures, 6 tables, 57 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:** *Saša Drakula, BSc, Research assistant*

**Reviewers:**

1. PhD. Dubravka Novotni, Assistant professor
2. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor
3. PhD. Marina Krpan, Assistant professor
4. PhD. Jasna Mrvčić, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 19 July 2017.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1.EPIDEMIOLOGIJA I KARAKTERISTIKE CELIJAKIJE.....	2
2.1.1. Liječenje celijakije prehranom.....	2
2.2.BEZGLUTENSKI KRUH I NJEGOVA SVOJSTVA.....	3
2.2.1.Svojstva bezglutenskog kruha.....	3
2.2.2.Primjena kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskog kruha.....	5
2.3.BRAŠNO ŽUTOG GRAŠKA KAO SIROVINA ZA KRUH BEZ GLUTENA.....	5
2.4. AROMATSKI PROFIL KRUHA.....	6
2.4.1.Senzorska svojstva svježeg kruha.....	6
2.4.2. Napredak u razumijevanju kemijskih reakcija odgovornih za kvalitetu kruha.....	8
2.5. PRIMJENA MIKROEKSTRAKCIJE NA ČVRSTOJ FAZI U ANALIZI HRANE.....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Uređaji i oprema.....	11
3.1.2. Kemikalije, sirovine i standardi.....	12
3.1.3. Uzorci.....	13
3.2. METODE RADA.....	14
3.2.1.Recepture kruha.....	14
3.2.2. Propagacija bakterija mliječne kiseline za pripremu kiselog tijesta.....	16
3.2.3.Postupak pripreme kiselog tijesta.....	16
3.2.4. Postupak pripreme krušnog tijesta.....	16
3.2.5. Fermentacija, pečenje i smrzavanje uzoraka.....	17
3.2.6. Određivanje ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha.....	17
3.2.7. Određivanje udjela aromatskih spojeva.....	17
3.2.7.1. SPME ekstrakcija.....	17
3.2.7.2. GC-MS analiza uzoraka.....	18
3.2.7.3. Određivanje koncentracije aromatskih spojeva u uzorcima.....	18
3.2.8. Analiza i obrada podataka.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	20
4.1. Brzina zakiseljavanja i ukupna kiselost kiselog tijesta.....	20
4.2. Rezultati određivanja kiselosti kruha.....	21



4.3. Rezultati određivanja koncentracija karakterističnih spojeva arome.....	23
4.4. Rezultati statističke analiza glavnih komponentata (PCA metoda).....	39
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

# 1. UVOD

Obzirom da je kruh jedna od osnovnih vrsta hrane u ljudskoj prehrani, teško je zamisliti prehranu bez kruha. Kruh proizveden od pšeničnog brašna je najzastupljeniji i omiljen među potrošačima. Međutim, postoje pojedinci, osobe oboljele od celijakije, koji su osjetljivi na gluten iz pšenice i srodnih žitarica. Zbog sve češćeg oboljevanja od ove bolesti, čiji je jedini lijek izbjegavanje proizvoda koji sadrže gluten, ali i trendova u prehrani, pekarski proizvodi bez glutena sve više dobivaju na važnosti. S obzirom da je gluten važan sastojak brašna pšenice i odgovoran je za viskoelastična svojstva tijesta te nastanak poželjne teksture, okusa i mirisa kruha, veliki izazov predstavlja proizvodnja bezglutenskog kruha koji će imati približno sličnu aromu i teksturu kao pšenični kruh.

Miris, kao jedna od najvažnijih karakteristika bilo kojeg prehrambenog proizvoda, jako utječe na poželjnost njegove konzumacije kod potrošača. Većina bezglutenskih pekarskih proizvoda prisutnih na tržištu ima loše senzorske osobine. S obzirom da su za aromu odgovorni hlapljivi spojevi kruha, i to prvenstveno kore, potrebno je istražiti iste s ciljem poboljšanja aromatskog profila bezglutenskog kruha.

Osim toga, bezglutenski kruh uglavnom ima malu nutritivnu vrijednost pa bi nove recepture trebale biti usmjerene k stvaranju bezglutenskih kruhova povećane prehrambene vrijednosti. Razvoj obogaćenih bezglutenskih pekarskih proizvoda sve je više usmjeren k uporabi sastojaka mahunarki.

Upravo zato, u ovom radu istražen je utjecaj dodatka različitih spojeva (aminokiselina, enzima i ugljikohidrata) na aromatski profil bezglutenskog kruha sa i bez dodatka kiselog tijesta pripremljenog s brašnom žutog graška. Dodani spojevi djeluju kao prekursori spojeva odgovornih za karakterističnu aromu kore i kruha. U ovom istraživanju određena je koncentracija aromatskih spojeva nakon dodatka različitih potencijalnih prekursora i enzima, odvojeno ili kombinirano. Brašno žutog brašna je dodano radi nutritivnog obogaćivanja kruha, ali i poboljšanja senzorskih svojstava.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 EPIDEMIOLOGIJA I KARAKTERISTIKE CELIJAKIJE

Celijakija je autoimuna bolest tankoga crijeva koju karakterizira nepodnošenje glutena. Simptomi su bolovi u trbuhu, kronični ili rekurentni (ponavljajući) proljev, gubitak težine, zastoj u rastu, kronična anemija, osteoporoza, kronični umor, depresija i neplodnost. U usnoj šupljini se celijakija može manifestirati oštećenjem zubne cakline, *amelogenesis imperfectom*, rekurentnim aftoznim ulceracijama, atrofičnim glositisom i moguće oralnim lihen planusom. Manifestacije celijakije u usnoj šupljini prvi može primijetiti stomatolog i na taj način pridonijeti ranom otkrivanju bolesti te uputiti bolesnika na daljnju obradu i liječenje (Boras i sur., 2013). Celijakija je bolest poremećenog imunosnog odgovora potaknutog glutenom koja se javlja u genetički predisponiranih osoba. Genska podloga celijakije vezana za lokus humanih leukocitnih antigena kao dominantnog genetičkog elementa detaljno je razjašnjena. No postoji i velik broj gena izvan ove regije koji pridonose etiopatogenezi bolesti, a samo su dijelom zajednički pojedinim bolesnicima, što upućuje na genetičku heterogenost bolesti. Uz to je opaženo da su mnogi od tih rizičnih lokusa u celijakiji zajednički s lokusima za druge autoimune bolesti. Značajan doprinos novim spoznajama daju nedavne cjelogenomske asocijacijske studije, ali tek treba istražiti velik dio još i sad nepoznate heritabilnosti u celijakiji (Čizmarević i sur., 2015).

Celijakija ili glutenska enteropatija doživotna je nepodnošljivost glutena čija se prevalencija u općoj populaciji procjenjuje na oko 1 %. Visoka prevalencija posljedica je sve veće svjesnosti i poznavanja ove bolesti, prepoznavanja oboljelih s nespecifičnim simptomima, tj. netipičnim oblicima bolesti te dostupnosti suvremenih dijagnostičkih testova i probira među rizičnim skupinama. Postavljanje dijagnoze celijakije u bolesnika s netipičnom celijakijom nije jednostavno. Zbog toga je potrebno kombinirati više seroloških testova s histološkim nalazom biopsije sluznice tankog crijeva. Suvremeni serološki testovi visoko su specifični i osjetljivi, ali je biopsija sluznice tankog crijeva još uvijek “zlatni standard” u postavljanju dijagnoze. U daljnjem praćenju većine oboljelih serološki su testovi dostatni za kontrolu izloženosti glutenu. Jedino liječenje jest doživotno provođenje bezglutenske prehrane (Barbarić, 2009).

#### 2.1.1. Liječenje celijakije prehranom

Danas je jedini znanstveno dokazano učinkoviti tretman za oboljele od celijakije stroga i doživotna bezglutenska prehrana. Potpuno uklanjanje glutena iz prehrane oboljelih od celijakije

rezultira simptomatskom, serološkom i histološkom remisijom kod većine pacijenata (Fassano i Catassi, 2001; Pietzak, 2005; Wiliamson i Marsh, 2002).

Gluten se najčešće spominje kao patološki supstrat za razvoj celijakije, no glavne skupine bjelančevina u zrnu pšenice uključuju glijadine i glutenine. Upravno glijadini predstavljaju problem za osobe oboljele od celijakije, odnosno intolerancija na gluten odnosi se na intoleranciju na glijadine. Bjelančevine sličnog djelovanja u ječmu i raži nazivaju se sekalini i hordeini. Pšenica, ječam i raž su vrlo bliskog podrijetla i razvoja u skupini žitarica i njihove analogne bjelančevine sadrže visok udio prolina i glutamina, što ih čini otpornima na potpunu proteolitičku razgradnju u probavnom sustavu (Molberg i sur., 2003).

Nakon postavljanja dijagnoze celijakije, započinje se s bezglutenskom prehranom. Iz prehrane se isključuje hrana koja sadrži pšenicu, ječam i raž. Osim namirnica koje prirodno ne sadrže navedene žitarice, ostalu hranu je potrebno testirati na prisustvo glutena. Ispitana, sigurna hrana je označena međunarodnim znakom prekriženog klasa. Hrana koja ne sadrži gluten može imati do 20 ppm glutena, a ona kojoj je gluten odstranjen tijekom proizvodnje do 200 ppm glutena (Barbarić, 2008).

Prognoza bolesti je izvrsna uz pravilno, doživotno provođenje bezglutenske prehrane u kojoj su iz prehrane isključene žitarice koje sadržavaju gluten – pšenica i njezine razne varijacije (durum, semolina, pir, kamut, bulgur), raž, ječam, tritikale (Gujral i sur., 2012; Tack i sur., 2010; Richman, 2012). Po pitanju zobi stav autora je različit te nema opće prihvaćenog stava o unosu zobi. Većina dostupnog zobenog brašna kontaminira se glutenom tijekom proizvodnje. Posljednjih desetak godina zob se uključuje u bezglutensku prehranu, iako se i dalje o tome dvoji s obzirom na čestu kontaminaciju ostalim žitaricama.

## **2.2 BEZGLUTENSKI KRUH I NJEGOVA KVALITETA**

### **2.2.1. Svojstva bezglutenskog kruha**

Kruh je od pamtivijeka neizostavni dio ljudske prehrane i kulture. Svaki korak u njegovoj proizvodnji, od pažljivog izbora sirovina do pripreme i obrade tijesta te procesa pečenja, predstavlja dio umjetnosti koja u konačnici osigurava neograničeno bogatstvo boje, okusa i arome kruha (Mrvčić i sur., 2011). Uslijed promjene zdravstvenih zahtjeva potrošača, došlo je do promjene pristupa u proizvodnji hrane za posebne prehrambene potrebe, pa tako i bezglutenskog kruha (Poinot i sur., 2009). Gluten je protein čije prisutnost u tijestu doprinosi njegovim bitnim svojstvima, utječući na njegovu elastičnost, reološka svojstva, mogućnost

promjene oblika, povećanje obujma, kao i samu konzistenciju. Gluten je izrazito hidrofilan, što znači da prilikom miješanja s vodom, on istu veže te bubri, stvarajući tzv. glutensku mrežu sa svojstvima rastezljivosti, elastičnosti, žilavosti te mogućnosti zadržavanja plinova tijekom fermentacije (Klarić, 2010).

Postoje i žitarice koje ne sadrže gluten, no tijesto koje one daju je polutekuće te nema sposobnost zadržavanja plinova, zbog čega je kruh od takvih žitarica zbijene i mrvljive strukture, nepoželjne boje i okusa te s ostalim nedostacima u kvaliteti (Arendt i sur., 2002).

Na Slici 1. prikazana je struktura bezglutenskog kruha od rižinog brašna bez ikakvih aditiva na kojoj su uočljivi gore opisani tehnološki nedostaci.



Slika 1. Kruh od rižinog brašna bez poboljšivača (Rossel i Marco, 2008)

Iz tog razloga s prehrambeno-tehnološkog položaja, zamjena glutenskog brašna bezglutenskim nije jednostavna. Do prije 10-15 godina, većinu komercijalno dostupnih bezglutenskih kruhova karakterizirala je loša kvaliteta, mrvljivost i loša svojstva kore te loš okus i tekstura u ustima (Gallagher i sur., 2003).

Osnova za proizvodnju bezglutenskog kruha je škrob, koji je siromašan hranjivim tvarima, a dodatna loša osobina je njegovo brzo starenje (Ahlborn i sur., 2005). U cilju boljeg prihvaćanja bezglutenskog kruha, proteklih godina su se intenzivno razvijale inovativne recepture pa tako i u ovom radu. Kod proizvodnje bezglutenskog kruha, kao zamjena za pšenično brašno, najčešće se koristi kombinacija brojnih sastojaka kao što su različiti hidrokoloidei, enzimi, škrob, brašna iz žitarica koje ne sadrže gluten, kao što su proso, kukuruz, riža, sijerak ili pseudožitarice (kvinoja, amarant, heljda) te izvori proteina biljnog ili životinjskog podrijetla. Mala nutritivna

vrijednost bezglutenskog kruha može se kompenzirati korištenjem različitih vrsta vlakana, mineralnih tvari, vitamina i proteina.

### **2.2.2. Primjena kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskog kruha**

Kiselo tijesto se dobiva dugom fermentacijom smjese brašna i vode uz prisutnost prirodnih ili dodanih mikroorganizama (bakterije mliječno-kiselog vrenja, kvasci), koji se nalaze u aktiviranom stanju ili ih je moguće reaktivirati. Primjena kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskih proizvoda može imati višestruke pozitivne učinke na njihovu kvalitetu.

Kiselo tijesto direktno utječe na poboljšanje teksture, povećanje volumena, nastanak prekursora aromatskih tvari, povećanje nutritivne vrijednosti, poboljšanje očuvanja svježine i produženje trajnosti (Moroni i sur, 2009). U nekim istraživanjima dokazano je da prevelik udio kiselog tijesta može znatno smanjiti volumen i negativno utjecati ne samo na teksturu, već i na senzorska svojstva kruha (Moroni i sur., 2009). Zbog toga se ono dodaje u umjerenj količini oko 20 %. Nadalje, fermentacijom kiselog tijesta se eventualno prisutan gluten radi kontaminacije može hidrolizirati i na taj način umanjiti toksičnost proizvoda za oboljele od celijakije (Novotni, 2015).

### **2.3. BRAŠNO ŽUTOG GRAŠKA KAO SIROVINA ZA KRUH BEZ GLUTENA**

Žuti grašak (lat. *Pisum sativum*) je jednogodišnja biljka iz porodice mahunarki, a kao povrtlarska kultura pripada zrnatim mahunarkama. Nakon žitarica, mahunarke su druga najzastupljenija poljoprivredna kultura na svijetu. To su zapravo jestive sjemenke koje rastu u mahunama i obuhvaćaju širok raspon veličina, oblika i boja. Kao dobar izvor proteina, ugljikohidrata, u vodi topljivih vitamina (posebno vitamina B i C) i mineralnih tvari (kalcij, željezo), mahunarke daju veliki doprinos ljudskoj prehrani (Sreerama i sur., 2012).

Žuti grašak ima visok sadržaj proteina zahvaljujući kvržicama u korijenu u kojima se nalaze bakterije (*Bacterium radicola*) koje vežu dušik iz zraka i pretvaraju ga u vrijedne aminokiseline, a potom u proteine. Nadalje, proteini mahunarki bogati su lizinom, a siromašni aminokiselinama koje sadrže sumpor, dok je kod žitarica obrnuti slučaj. Zbog toga, kombinacija žitarica i proteina mahunarki osigurava bolji odnos esencijalnih aminokiselina koji je vrlo važan za uravnoteženu prehranu (De la Hera i sur., 2012; Kadam i sur., 2012). U istraživanju koje su proveli Kohajdová i sur. (2013), uočeno je da brašno graška, osim što sadrži visok udjel

proteina, predstavlja i dobar izvor prehrambenih vlakana i mineralnih tvari poput željeza. Važna je činjenica da brašno žutog graška ne sadrži gluten te je zbog toga pogodan za prehranu osoba koje boluju od celijakije.

Česta konzumacija mahunarki smatra se učinkovitim sredstvom za smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, nekih vrsta raka, prekomjerne tjelesne mase i pretilosti (Han i sur., 2010).

No mahunarke sadrže i neke nenutritivne prehrambene spojeve, poput rafinoze, kondenziranih tanina i alkaloida. Većina tih spojeva je termolabilna, tako da se upotrebom toplinskih tretmana mogu ukloniti njihovi negativni učinci (Mazquiz i sur., 2012).

Još jedan nedostatak brašna mahunarki i uporabe istog kao sirovine za proizvodnju kruhova jeste nepoželjna aroma (okus i miris) (engl. off flavors).

Nepoželjna aroma može biti ili prirodno prisutna u mahunarkama ili nastati tijekom žetve, procesiranja ili skladištenja, a najčešći uzrok nastanka spojeva nepoželjne arome tijekom žetve, procesiranja i skladištenja je oksidacija nezasićenih masnih kiselina (linolne i linoleinske) (Sessa i Rackis, 1977).

Skupine spojeva povezanih s nepoželjnom aromom ugrubo se dijele na hlapljive i nehlapljive spojeve. Hlapljivi spojevi odgovorni su za nepoželjnu aromu jesu aldehidi, ketoni, alkoholi i pirazini. Nepoželjna aroma koja potječe od prisustva ovih spojeva opisuje se kao okus i miris po zelenom, po grašku, zemljana aroma, aroma po sijenu i po grahu (Roland i sur., 2017).

Zbog svih navedenih pozitivnih karakteristika, poželjnog nutritivnog sastava, uz ograničenje u smislu udjela ovog brašna s obzirom na prisutnost spojeva nositelja nepoželjne arome, brašno žutog graška predstavlja novi trend u proizvodnji pekarskih proizvoda i daje mogućnost poboljšanja, do sada nutritivno siromašnih, bezglutenskih pekarskih proizvoda.

## **2.4. AROMATSKI PROFIL KRUHA**

### **2.4.1. Senzorska svojstva svježeg kruha**

Aromatski profil kruha je jedan od najvažnijih čimbenika pri odluci potrošača o konzumaciji proizvoda. On je najvećim dijelom rezultat proizvodnog procesa. Do nastanka aromatskih spojeva dolazi prilikom fermentacije tijesta kvascima ili bakterijama mliječne kiseline, djelovanja enzima, oksidacije lipida i toplinskih reakcija koje se odvijaju prilikom

pečenja, najviše Maillardovih reakcija i reakcija karamelizacije. Receptura, odnosno odabrani sastojci također mogu znatno utjecati na sveukupnu aromu kruha (Pozo-Bayón i sur., 2006).

Prateći preferencije potrošača, mnoga istraživanja su provedena u svrhu poboljšanja mirisa, okusa, teksture i trajnosti kruha (Bácnas i sur., 2003). Tako su razvijene brojne metode za identifikaciju spojeva odgovornih za okus i miris kruha (Cayot, 2007) te je zabilježeno više od 540 hlapljivih spojeva u kruhu (Ruiz i sur., 2003). Kvantitativno, najvažnije grupe spojeva odgovornih za aromu kruha su alkoholi, aldehidi, esteri, ketoni, kiseline, pirazini i pirolini, a tu su i furani, ugljikovodici i laktoni (Cayot, 2007).

Glavni doprinos razvoju spojeva okusa u tijestu su enzimska aktivnost i fermentacija. Enzimi proizvode prekursore koji su izravno ili posredno uključeni u proces stvaranja okusa (Martínez-Anaya, 1994), dok je fermentacija kvasca odgovorna za nastanak niza alkohola, kiselina i estera (Hazelwood i sur., 2008). Proizvodnja Maillardovih produkata inducirana je toplinom i sekundarnim produktima oksidacije lipida koji nastaju tijekom pečenja (Pozo-Bayón i sur., 2006). Toplinski iniciran nastanak produkata Maillardovih reakcija uglavnom se odvija u kori kruha (Capuano i sur., 2008). Tijekom skladištenja, zbog hlapljivosti uglavnom nestabilnih Maillardovih spojeva ili zbog migracije spojeva od kore do sredine, koncentracija većine nastalih produkata se smanjuje. Očekuje se povećanje koncentracije aldehida proizvedenih autoksidacijom linoleinske kiseline tijekom skladištenja, budući da se nastavak lančane reakcije oksidacije lipida očekuje nakon pečenja.

Smatra se da fenolne kiseline pridonose intenzivnom i gorkom okusu, a za topljive fenolne kiseline procjenjuju se da su ukusnije od fenolnih kiselina prisutnih u vezanom obliku (Heiniö i sur., 2008). Fenolne kiseline se prirodno pojavljuju u cijelom zrnu žitarica, gdje su koncentrirane u vanjskim slojevima zrna (Andreasen i sur., 2000). Najveći udio fenolnih kiselina postoji, međutim, u vezanom obliku (Heiniö i sur., 2008).

Okus svježeg kruha je od ključne važnosti za prihvaćenost kod potrošača i prihvaćanje proizvoda. Deskriptivna analiza obično se primjenjuje za mjerenje utjecaja mirisa i okusa hrane (Stone i Sidel, 2004). Među različitim unutarnjim svojstvima kruha, hlapljivi spojevi imaju ključnu ulogu u percepciji svježeg okusa kruha.

Međutim, percipirana aroma svježeg kruha često ovisi o vrsti kruha, sastojcima, načinu proizvodnje i svježini. Značajna istraživanja usmjerena su na opisivanje arome kruha koristeći deskriptivnu senzorsku analizu (Caul i Vaden, 1972; Chang i Chambers, 1992; Lotong, 1999; Shogren i sur., 2003).



Provedena istraživanja imala su polazište u identifikaciji ključnih mirisnih aktivnih hlapljivih spojeva odgovornih za aromu svježeg kruha (Chang i sur., 1995; Kirchhoff i Schieberle, 2001; Schieberle i Grosch, 1991; Seitz i sur., 1998; Zehentbauer i Grosch, 1998a, 1998b). Prema Schieberle i Grosch (1991), gubitak arome svježeg kruha proizlazi iz specifične hlapljivosti spojeva, gdje se koncentracija važnih hlapljivih spojeva brzo smanjuje tijekom skladištenja, dok koncentracija manje poželjnih derivata obilježenih oksidacijom lipida ostaje relativno nepromijenjena.

#### **2.4.2. Napredak u razumijevanju kemijskih reakcija odgovornih za kvalitetu kruha**

Kruh je od davnina glavni prehrambeni proizvod, poznat diljem svijeta. Aroma kruha je u velikoj mjeri proučavana i identificirano je oko 300 spojeva okusa (Pozo-Bayón i sur., 2006). Kvantitativno, najvažnije grupe spojeva odgovornih za aromu kruha su alkoholi, aldehidi, esteri, ketoni, kiseline, pirazini i pirolini, a tu su i furani, ugljikovodici i laktoni (Cayot, 2007; Pozo-Bayón i sur., 2006; Seitz i sur., 1998).

Alkoholi su skupina spojeva koji se u pšeničnom kruhu pojavljuju u najvišim koncentracijama, a najviše nastaju tijekom procesa fermentacije (Jensen i sur., 2011). Visoka koncentracija alkohola, skupine spojeva važnih za formiranje mirisa kruha, nastaje fermentacijom *Issatchenkia orientalis* u kombinaciji s *Lactobacillus brevis* ili *Lactobacillus plantarum*, dok se diacetil stvara u značajnim količinama fermentacijom s *Lactobacillus plantarum* i *Pediococcus pentosaceus* (Moroni i sur., 2009).

Fermentacija je proces pri kojem nastaju neki od najznačajnijih aromatskih spojeva (Frasse i sur., 1992). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* tijekom fermentacije prevodi 95 % fermentabilnih šećera iz brašna u etanol i ugljikov dioksid. Preostalih 5 % sudjeluje u sekundarnim reakcijama fermentacije gdje piruvat iz glikolize prelazi u više alkohole, kratkolančane masne kiseline i karbonilne spojeve. Iz tih spojeva također mogu nastati aromatski spojevi (Pozo-Bayón i sur., 2006). Produljenom fermentacijom tijesta povećava se koncentracija 3-metil butanola i 2-fenil etanola (Hansen i Hansen, 1996) koji su direktno povezani s fermentacijskom aktivnosti kvasca.

Toplinske reakcije u proizvodnji kruha uključuju karamelizaciju i neenzimsko posmeđivanje, čime se stvaraju hlapljivi spojevi značajni za aromatski profil kruha, kao što su furani, pirazini, piroli i Streckerovi aldehidi (Pozo-Bayón i sur., 2006).

Više spojeva arome može se dobiti dodatkom kiselog tijesta u kruh. Bakterije mliječne kiseline kataliziraju reakcije deaminacije, transaminacije i dekarboksilacije, čime nastaju aminokiseline koje su prekursori za nastanak aromatskih spojeva. Tako put deaminacije arginina u *Lactobacillus spp.* dovodi do povećane proizvodnje ornitina, prekursora nastanka 2-acetil pirolina, spoja odgovornog za aromu kore svježeg pečenog pšeničnog kruha (Gänzle i sur., 2007). Hansen i Hansen (1996) su proveli istraživanje s više vrsta mikroorganizama, kvasaca i bakterija mliječne kiseline i pri različitim uvjetima fermentacije kiselog tijesta. Utvrdili su da je dodatkom kiselog tijesta pšenični kruh imao više spojeva arome: 2- i 3-metil-1-butanola, 2-metil propanske kiseline, 3-metil butanske kiseline i 2-fenil etanola. Uravnotežen aromatski profil kruha s dodatkom kiselog tijesta nastaje pravilnim kombiniranjem kvasaca i bakterija mliječne kiseline prilikom procesa kiseljenja (Hansen i Schieberle, 2005).

Nadalje, 3-metilbutanal, 2,3-butandion, 4-hidroksi-2,5-dimetil-furanon, fenil acetaldehid, 2-nonenal, 2,4-dekadienal i octena kiselina značajno doprinose mirisu kore kruha (Schieberle i Grosch, 1992).

## **2.5. PRIMJENA MIKROEKSTRAKCIJE NA ČVRSTOJ FAZI U ANALIZI HRANE**

Analiza hrane važna je za procjenu prehrambene vrijednosti i kvalitete svježih i prerađenih proizvoda te za praćenje prisutnosti aditiva i toksičnih kontaminanata. Pripravljanje uzorka, kao što je ekstrakcija, koncentracija i izolacija analita, značajno utječe na pouzdanost i točnost analize hrane. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid-phase microextraction* SPME) je nova tehnika pripreme uzorka koja koristi fuzionirano silika vlakno koje je izvana obloženo odgovarajućom stacionarnom fazom. Analit se iz uzorka izravno ekstrahira na vlakno. SPME tehnika može se rutinski koristiti u kombinaciji s plinskom kromatografijom (engl. *Gas Chromatography*, GC), GC-masenom spektrometrijom (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS), tekućinskom kromatografijom visokog učinka (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ili LC-masenom spektrometrijom (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS). Nadalje, još je jedna SPME tehnika poznata kao in-tube SPME razvijena za kombinaciju s LC ili LC-MS pomoću otvorenog cjevastog kapilarnog stupca kao SPME uređaja umjesto SPME vlakana.

Metode koje koriste SPME tehnike skraćuju vrijeme pripreme uzorka, smanjuju troškove analize, izostavljaju potrebu za uklanjanjem otapala te mogu poboljšati granice detekcije.

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uređaji i oprema

##### Uređaji

- Termoblok, Pierce Reacti-Therm 18971; proizvođač: Thermo Fisher Scientific, SAD
- Plinski kromatograf, 6890N; proizvođač: Agilent, SAD
- Maseni detektor, 973 *inert*; proizvođač: Agilent, SAD
- Ručni mikser, *Prep' Line*; proizvođač: Tefal, Francuska
- Mikser; proizvođač: Electrolux, Švedska
- Pećnica, Typ EB 064-320 IS 600; proizvođač: Weisheu, Njemačka
- Fermentacijska komora, GS1 ED 60/40 0600\_A-BJDBA; proizvođač: Weisheu, Njemačka
- Vaga, PLB 2000-2; proizvođač: Kern, Njemačka
- Mlinac, *Arome*; proizvođač: First Austria, Austrija
- pH metar, 205; proizvođač: Testo, Njemačka
- pH metar, 3510; proizvođač: Jenway, UK
- Zapisivač podataka OM-CP-PH 101; proizvođač: Omega Engineering, UK
- Magnetska miješalica, Jk Werke; proizvođač: IKA, SAD
- Autoklav, 1-62-161; proizvođač: Sutjeska, Srbija
- Centrifuga, Rotina 35; proizvođač: Rotina, Njemačka

##### Oprema

- Kolona, CP-Wax 52 CB 30 m \* 0,25 mm \* 0,25  $\mu$ m; proizvođač: Agilent, SAD
- Krimp čepovi, PTFE 3 mm Macherey-Nagel
- SPME vlakno, Carboxen/DVB/PDMS, 50/30  $\mu$ m, Stableflex; proizvođač: Agilent, SAD
- Menzura, 50 mL
- Magnet, 15\*6 mm
- Staklena vijalica, 20 mL
- Plastične čaše, 100 mL i 200 mL
- Silikonski kalupi za pečenje
- Sterilne pipete, 1 i 10 mL
- Sterilne epruvete

### 3.1.2. Kemikalije, sirovine i standardi

#### Sirovine

- Brašno žutog graška; proizvođač: Fuszerhaz, EU
- Integralno rižino brašno; proizvođač: Advent, Hrvatska
- Kukuruzni ekstrudat; proizvođač: Naše klasje, Hrvatska
- Kukuruzni škrob, Maisita; proizvođač: Agrana, Austrija
- Integralno proseno brašno; proizvođač: Werz, Njemačka
- Proteini bjelanjka, bjelanjak u prahu; proizvođač: Elcon, Prehrambeni proizvodi d.o.o, Hrvatska
- CMC, Wellence Gluten Free 47129; proizvođač: The Dow Chemical Company, SAD
- HPMC, Methocell K4M Food Grade; proizvođač: The Dow Chemical Company, SAD
- Sol, morska sitna; proizvođač: Solana Pag, Hrvatska
- Šećer, konzumni bijeli; proizvođač: Viro d.d, Hrvatska
- Kvasac, suhi instant kvasac, 95 % suhe tvari; proizvođač: Kvasac d.o.o, Hrvatska
- Voda, vodovodna
- Prašak za pecivo, Dolcela; proizvođač: Podravka, Hrvatska
- Biljna mast; proizvođač: Zvijezda, Hrvatska
- Emulgator, MONO 40; proizvođač: Juchem, Njemačka

#### Kemikalije

- L+ Arginin, 98,5-100 %; proizvođač: Fisher Scientific, SAD
- L- Prolin, <99 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- D+ Glukoza, ≥99,5 %; proizvođač: Gram Mol, Hrvatska
- D+ Fruktaza, 99 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija, SAD
- Fungalna proteaza, 500 000 HUT\*g<sup>-1</sup>; proizvođač: Bio-cat, SAD
- Tekući dušik; proizvođač: Messer, Hrvatska
- *Lactobacillus brevis* DSM 20054; proizvođač: DSMZ, Njemačka
- MRS BROTH s tween-om 80; proizvođač: Biolife, Italija
- NaCl; proizvođač: Alkaloid, Makedonija

## Standardi

- 2-pentilfuran, CAS 3777-69-3, čistoća 100 %; proizvođač: Sigma Aldrich, Njemačka
- Butan-2,3-dion, CAS 431-03-8, čistoća 99 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- Benzaldehid, CAS 100-52-7, čistoća 99 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- 3-metilbutanal, CAS 590-86-3, čistoća 98 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- 3-metilbutan-1-ol, CAS 123-51-3, čistoća 100 %; proizvođač: Sigma Aldrich, Njemačka
- 1-butanol, CAS 71-63-3, čistoća 99,5 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- 2-metil butanska kiselina, CAS 116-53-0, čistoća: 98 %; proizvođač: Merck, Njemačka
- 2-feniletanol, CAS 60-12-8, čistoća: 100 %; proizvođač: Merck, Njemačka
- 1-(1H-pirol-2-il) etanon, CAS 1072-83-9, čistoća: teh; proizvođač: Maybrigde, UK
- Okt-1-en-3-ol, CAS 3391-86-4, čistoća 98 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- (2E,4E)-deka-2,4-dienal, CAS 25152-84-5, čistoća 95 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- 2,5-dimetilpirazin, CAS 123-32-0, čistoća 99 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- 1-(furan-2-il) etanon, CAS 1192-62-7, čistoća 99 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- Furan-2-ilmetanol, CAS 98-00-0, čistoća 98 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- 2-fenilacetaldehid, CAS 122-78-1, čistoća 98 %; proizvođač: Acros Organics, Belgija
- 2-etilpirazin, CAS 13925-00-3, čistoća 99 %; proizvođač: Alfa Aesar, Engleska
- Furan-2-karbaldehid, CAS 98-01-1, čistoća 99 %; proizvođač: Sigma Aldrich, Njemačka
- 2-metilpirazin, CAS 109-08-0, čistoća 99 %; proizvođač: Alfa Aesar, Engleska
- (E)-non-2-enal, CAS 18829-56-6, čistoća 100 %; proizvođač: Fluka, Švicarska
- 2,3,5-trimetilpirazin, CAS 14667-55-1, čistoća 100 %; proizvođač: Fluka, Švicarska

### 3.1.3. Uzorci

U ovom radu analizirani su uzorci kruha i kore kruha pripremljeni pomoću 10 različitih receptura. Recepture su se razlikovale s obzirom na dodatak kiselog tijesta, aminokiselina, šećera i enzima. Priprema svakog uzorka provedena je u dva ponavljanja. U Tablici 1. nalazi se opis analiziranih uzoraka.

Tablica 1. Opis analiziranih uzoraka

Uzorak	Dodatak kiselog tijesta, prekursora aromatskih spojeva i/ili enzima
<b>PRO</b>	Prolin
<b>PRO+GLU</b>	Prolin, glukoza
<b>PRO+FRU</b>	Prolin, fruktoza
<b>E</b>	Enzim proteaza
<b>KT</b>	Kiselo tijesto
<b>KT+PRO+FRU</b>	Kiselo tijesto, prolin, fruktoza
<b>KT+ARG</b>	Kiselo tijesto, arginin
<b>KT+E</b>	Kiselo tijesto, enzim proteaza
<b>KT+ARG+E</b>	Kiselo tijesto, enzim proteaza, arginin
<b>KT+E+ARG+PRO+FRU</b>	Kiselo tijesto, enzim proteaza, arginin, prolin, fruktoza

\*PRO – prolin, GLU – glukoza, FRU – fruktoza, KT – kiselo tijesto, ARG – arginin, E – enzim proteaza

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Recepture kruha

U ovom istraživanju korišteno je 10 različitih receptura za pripremu krušnog tijesta. Osnovna receptura je za sve uzorke bila jednaka, dok su se razlikovale prema dodatku kiselog tijesta, prekursora aromatskih spojeva (glukoze, fruktoze, prolina i arginina) i/ili enzima (fungalne proteaze). U Tablici 2. nalazi se popis i udio sirovina korištenih za pripremu krušnog tijesta prema osnovnoj recepturi.

Tablica 2. Popis i udio sastojaka za osnovni zamjes krušnog tijesta

Sirovina	Udio sirovina s obzirom na masu brašna (%)	Udio sirovina s obzirom na masu tijesta (%)
<b>Integralno rižino brašno</b>	40	16,7
<b>Kukuruzni škrob</b>	15	6,3

<b>Integralno proseno brašno</b>	15	6,3
<b>Brašno žutog graška</b>	25	10,5
<b>Kukuruzni ekstrudat</b>	5	2,1
<b>Biljna mast</b>	3	1,3
<b>CMC</b>	0,5	0,2
<b>HPMC</b>	1,5	0,6
<b>Sol</b>	1,8	0,8
<b>Prašak za pecivo</b>	3	1,3
<b>MONO 40</b>	0,5	0,2
<b>Šećer</b>	2	0,8
<b>Kvasac</b>	1,6	0,7
<b>Voda</b>	115	48,1
<b>Bjelanjak u prahu</b>	10	4,2

\*CMC – karboksimetil celuloza, HPMC – hidroksipropil metil celuloza, MONO 40 – monogliceridi

Osim sastojaka navedenih u Tablici 2. u smjesu za pripremu krušnog zamjesa dodano je kiselo tijesto, prekursori aromatskih spojeva i/ili enzimi, uvijek u istom udjelu. Prolin, fruktoza i glukoza uvijek su dodani u krušno tijesto, arginin je uvijek dodan u kiselo tijesto dok su enzimi dodani ili u krušno ili u kiselo tijesto. Kiselo tijesto je dodano u iznosu od 20 % na ukupnu masu tijesta, a omjer brašna i vode u njemu iznosio je 1:1,5. Popis i udio sirovina u kiselom tijestu prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Popis i udio sirovina u kiselom tijestu

<b>Sirovina</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>Integralno rižino brašno</b>	20,0
<b>Integralno proseno brašno</b>	7,5
<b>Brašno žutog graška</b>	12,5
<b>Voda</b>	60

Prolin i arginin su dodani u udjelu od 0,1 % na masu brašna, odnosno 0,042 % na ukupnu masu tijesta. Glukoza i fruktoza su dodane u udjelu od 1 % na masu brašna, odnosno 0,42 % na ukupnu masu tijesta. Enzim fungalna proteaza je dodan u udjelu od 0,25 % na ukupnu masu proteina kiselog tijesta, a u istoj količini dodan je u zamjes bez dodatka kiselog tijesta.

### 3.2.2. Propagacija bakterija mliječne kiseline za pripremu kiselog tijesta

Za kiseljenje tijesta u ovom radu korištena je bakterijska kultura *Lactobacillus brevis* uzgojena u MRS bujonu s Tween-om 80 koji je pripremljen prema uputi proizvođača i steriliziran u autoklavu (15 minuta/ 121 °C).

Manipulacija s navedenom bakterijskom kulturom provedena je u sterilnim uvjetima. Liofilizirana kultura rehidrirana je s 1 mL MRS bujona temperature 30 °C i zatim prenesena u epruvetu s 9 mL MRS bujona. Epruveta s naciepljenom kulturom je inkubirana 24 sata pri 30 °C. Nakon prve faze inkubacije, 1 mL MRS bujona s poraslom kulturom u sterilnim uvjetima prenesen je u pet epruveta s po 10 mL novog MRS bujona, nakon čega je slijedila inkubacija tijekom 24 sata pri 30 °C. Nakon druge faze inkubacije kultura iz 5 naciepljenih epruveta prenesena je u 200 mL novog MRS bujona i inkubirana 72 sata pri 30 °C. Po završetku treće faze inkubacije bujon s biomasom centrifugiran je i ispran dvaput s po 50 mL sterilne vode (4000 RPM, 10 minuta). Nakon ispiranja, biomasa je resuspendirana u sterilnoj fiziološkoj otopini (8,5 % otopina NaCl,  $m \cdot V^{-1}$ ) i čuvana u hladnjaku do korištenja.

### 3.2.3. Postupak pripreme kiselog tijesta

Sam postupak pripreme kiselog tijesta započeo je predgrijavanjem zasebnih sirovina (brašna i vode) na 37 °C 2 sata. Nakon toga, svi sastojci su izmiješani ručnim mikserom te je dodano oko  $10^6$  CFU *Lactobacillus brevis* po gramu kiselog tijesta (prethodno pripremljeni inokulum). Tijesto je fermentirano u fermentacijskoj komori 16 sati na temperaturi 37 °C. Tijekom fermentacije je praćena kinetika kiseljenja (pH i temperatura) pomoću zapisivača podataka.

### 3.2.4. Postupak pripreme krušnog tijesta

Postupak pripreme zamjesa odvijao se u nekoliko koraka od kojih je prvi bio miješanje svih suhih sastojaka u posudi miksera na brzini 1. Istovremeno u laboratorijskoj čaši u vodovodnoj vodi temperature 35 °C razmućen je kvasac i šećer te je smjesa stavljena na predfermentaciju 10 minuta u fermentacijskoj komori na 35 °C uz relativnu vlažnost 85 %. Nakon homogenizacije suhih sastojaka i po završetku predfermentacije kvasca, suhim sastojcima dodana je otopljena biljna mast, kvasac te eventualno kiselo tijesto (za uzorke koji sadrže kiselo tijesto). Smjesa je zatim miješana 3 minute na brzini 1 uz dodatak ostatka vode. Miješanje je nastavljeno na brzini 3 kroz 1,5 minuta, nakon čega je dodan prethodno umućeni bjelanjak (15 sekundi na brzini 1, 45 sekundi na brzini 4, 30 sekundi na brzini 5). Nakon dodatka



bjelanjka, smjesa je miješana 1 minutu na brzini 1, zatim promiješana lopaticom i miješana još mikserom 1 minutu na brzini 1.

### **3.2.5. Fermentacija, pečenje i smrzavanje uzoraka**

Nakon pripreme krušnog tijesta, izmjeren je pH i temperatura tijesta pomoću pH metra te je po 100 g tijesta odvagano u silikonske kalupe i fermentirano 50 minuta u fermentacijskoj komori na 35 °C uz relativnu vlažnost 85 %. Komadi tijesta stavljeni su na pečenje tijekom 15 minuta na 230 °C, uz temperaturu predgrijavanja 250 °C i naporavanje od 100 mL vodene pare. Nakon pečenja uzorci su se hladili 1 sat pri sobnoj temperaturi.

Nakon hlađenja s 3 komada kruha skinuta je kora koja je smrznuta tekućim dušikom i usitnjena u mlincu, a 1 uzorak kruha je u cijelosti narezan na kockice i smrznut tekućim dušikom te usitnjen u mlincu. Uzorci su do analize čuvani pri -18 °C.

### **3.2.6. Određivanje ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha**

Za određivanje ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha odvagano je oko 10 g svježeg kiselog tijesta ili smrznutog uzorka kruha. Menzutom je dodano 90 mL destilirane vode, posuda je poklopljena i stavljena na homogenizaciju na magnetsku miješalicu (brzina 3, bez zagrijavanja) 15 minuta. Nakon toga, očitani su početni pH i temperatura uzorka. Uzorak je titriran 0,1 M otopinom NaOH do pH 6,6, 8,3 i 8,5 te je zapisan utrošeni volumen NaOH. Mjerenje je provedeno u dvije paralele.

### **3.2.7. Određivanje udjela aromatskih spojeva**

S obzirom da je cilj ovog rada odrediti spojeve odgovorne za aromu kruha, isti su određivani analitičkom metodom primjenom GC-MS uređaja. Spojevi su prethodno ekstrahirani na SPME vlakno.

#### **3.2.7.1. SPME ekstrakcija (engl. *Solid-phase microextraction*, SPME)**

Za ekstrakciju je odvagano 0,25 g kruha ili kore u staklenu vijalicu, dodano je 4,99 mL prethodno pripremljene otopine soli (20 %, pH 3 prilagođen 0,05 M limunskom kiselinom) te 0,01 mL internog standarda (1-butanol,  $c = 0,09455 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Dodan je magnet i vijalica je začepljena. Ekstrakcija je provedena pri 60 °C uz miješanje, u trajanju od 60 minuta, uz uravnoteženje 5 minuta prije početka ekstrakcije.

### 3.2.7.2. GC-MS analiza uzoraka (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS)

Nakon provedene ekstrakcije svi uzorci kore, kruha analizirani su na GC-MS (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) uređaju. Odmah nakon ekstrakcije vlakno je injektirano u plinski kromatograf povezan s masenim detektorom. Kao mobilna faza korišten je helij uz protok  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Uvjeti rada injektora bili su sljedeći: temperatura  $260 \text{ }^\circ\text{C}$ , vrijeme desorpcije 5 min i način rada „bez razdvajanja protoka“, pri čemu su prethodno apsorbirani/adsorbirani analiti desorbirani s vlakna. Protok plina tijekom desorpcije iznosio je  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Nakon desorpcije provedeno je čišćenje vlakna u trajanju od 2 min. Temperaturni program pećnice podešen je tako da je temperatura održavana 3 minute na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , zatim je povećavana za  $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  do  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ , a nakon toga  $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  do  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  te na kraju za  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  do  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  te je na  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  zadržana 5 min. Temperatura izvora masenog detektora postavljena je na  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ , kvadrupola na  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , a temperatura prijelazne linije na  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ . Praćeni raspon omjera mase i naboja za detekciju je bio 35-350 amu, uz uvjete detekcije TIC (engl. *Total Ion Chromatogram*). Rezultati analize hlapljivih spojeva uzoraka vidljivi su na računalu spojenom na GC-MS uređaj u obliku kromatograma. Pri identifikaciji spojeva korištene su metode usporedbe spektra ciljanog spoja sa spektrom njegovog standarda i spektra u bazi podataka NIST05. GC-MS analiza je za svaki uzorak provedena u dvije paralele.

### 3.2.7.3. Određivanje koncentracije aromatskih spojeva u uzorcima

Kalibracijski pokusi provedeni su metodom dodatka standarda, kako bi utjecaj matrice bio eliminiran. Pokusi su provedeni pri istim uvjetima ekstrakcije i analize kao i uzorci. Baždarni dijagrami za sve analizirane spojeve napravljeni su u obliku ovisnosti površine analita o njegovoj koncentraciji, na 7 koncentracijskih razina, a mjerenja su provedena u 3 ponavljanja. Koncentracijski rasponi analiziranih spojeva su navedeni u Tablici 4.

Tablica 4. Koncentracijski rasponi analiziranih spojeva

Analizirani spoj	Koncentracijski raspon ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ kruha)
<b>2-etilpirazin</b>	0,084-840
<b>Okt-1-en-3-ol</b>	0,161-1615
<b>Furan-2-karbaldehid</b>	0,157-1568

<b>Benzaldehid</b>	0,008-7999
<b>(E)-non-2-enal</b>	0,325-77
<b>2-fenilacetaldehid</b>	2,522-3246
<b>Furan-2-ilmetanol</b>	0,104-25225
<b>(2E,4E)-deka-2,4-dienal</b>	0,104-1036
<b>1-1h-pirol-2il etanon</b>	1,295-12947
<b>1-(furan-2-il) etanon</b>	0,078-784
<b>2,3,5-trimetilpirazine</b>	0,079-792
<b>2,5-dimetilpirazin</b>	0,160-1600
<b>Butan-2,3-dion</b>	0,780-7801
<b>3-metilbutan-1-ol</b>	7,240-72400
<b>2-metilpirazin</b>	0,733-7326
<b>3-metilbutanal</b>	3,665-36652
<b>2-metilbutanska kiselina</b>	7,801-78008

### 3.2.8. Analiza i obrada podataka

Obrada kromatograma provedena je u programu MSD ChemStation Data Analysis. Svi dobiveni podaci su obrađeni u programu MS Excel 2007. Površine pikova analiziranih spojeva u svakom uzorku korigirane su s obzirom na površinu pika internog standarda. S obzirom da su sva mjerenja provedena minimalno dva puta za sve rezultate izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija.

Provedena je i analiza glavnih komponenata s ciljem redukcije podataka te interpretacije odnosno utvrđivanja razlika među pojedinim uzorcima s obzirom na koncentracije analiziranih spojeva. Obrada podataka provedena je u programu Statistica 12 (Statsoft, 2012).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

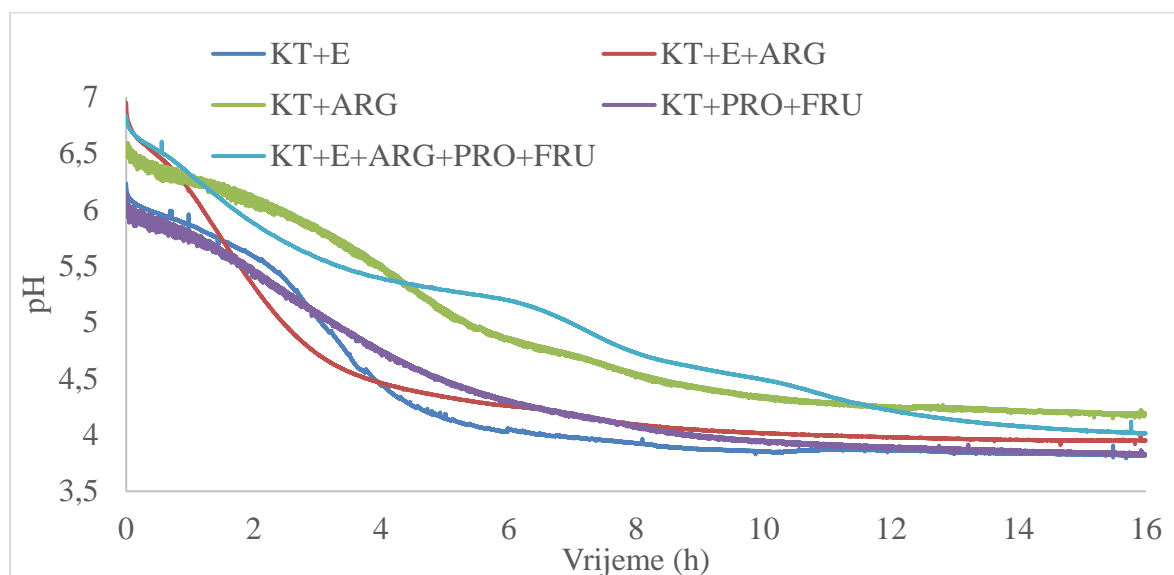
Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodatka različitih spojeva (aminokiselina, enzima i ugljikohidrata) na aromatski profil bezglutenskog kruha sa i bez dodatka kiselog tijesta pripremljenog s brašnom žutog graška, utvrditi razlike utjecaja prekursora i enzima na kinetiku zakiseljavanja kiselog tijesta te njihov utjecaj na pH vrijednost kruha i krušnog tijesta, obzirom da bi promjena pH mogla utjecati na proces fermentacije pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* koji uvelike utječe na nastanak spojeva arome u gotovom proizvodu.

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja pH vrijednosti tijekom zakiseljavanja kiselog tijesta te krušnog tijesta određivanja ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha te rezultati određivanja koncentracije karakterističnih spojeva arome za sve uzorke kore i kruha.

#### 4.1. Brzina zakiseljavanja i ukupna kiselost kiselog tijesta

S obzirom da je u 5 uzoraka kruha analiziranih tijekom ovog istraživanja dodavano kiselo tijesto, praćena je kinetika kiseljenja kiselog tijesta ovisno o dodanim prekursorima i enzimima. Na Slici 2. prikazana je srednja vrijednost promjene pH tijekom kiseljenja pojedinačnih kiselih tijesta pripremanih u dvije paralele.

Tijekom kiseljenja ovisno o dodanim prekursorima optimalna pH vrijednost (pH oko 4) postiže se za različito vrijeme kiseljenja. Za uzorak s dodatkom enzima postignuta je optimalna pH vrijednost u najkraćem vremenu, dok je za uzorak s dodatkom enzima i arginina pH i na kraju kiseljenja bio nešto iznad 4. Uzrok nešto višoj pH vrijednosti u uzorcima s dodatkom arginina može biti zbog toga što je arginin bazična aminokiselina te utječe na povećanje pH vrijednosti.



\* KT+E – kiselo tijesto s dodatkom enzima proteaze, KT+ARG – kiselo tijesto s dodatkom arginina, KT+E+ARG – kiselo tijesto s dodatkom enzima proteaze i arginina, KT+PRO+FRU – kiselo tijesto s dodatkom prolina i fruktoze, KT+E+ARG+PRO+FRU – kiselo tijesto s dodatkom enzima proteaze, arginina, prolina i fruktoze

Slika 2. Kinetika kiseljenja uzoraka kiselog tijesta

Tijekom ovog istraživanja određena je i ukupna kiselost kiselog tijesta titracijom. Određivanje kiselosti provedeno je u dvije paralele za svaki uzorak kiselog tijesta, a svako

mjerenje ponovljeno je minimalno dva puta te je izračunata srednja vrijednost za svaki pojedini uzorak kiselog tijesta. U Tablici 5 prikazani su rezultati određivanja pH vrijednosti i ukupne kiselosti pojedinog kiselog tijesta.

Tablica 5. Kiselost uzoraka kiselog tijesta

Uzorak	pH na kraju fermentacije	Ukupna kiselost (mL 0,1 M NaOH)
<b>KT</b>	4,24±0,08	16,04±0,05
<b>KT+ARG</b>	4,51±0,03	13,47±0,22
<b>KT+E</b>	4,03±0,05	17,60±0,38
<b>KT+ARG+E</b>	4,35±0,03	16,49±0,07
<b>KT+PRO+FRU</b>	4,24±0,03	16,24±0,06
<b>KT+ARG+E+PRO+FRU</b>	4,21±0,03	17,96±0,11

#### 4.2. Rezultati određivanja kiselosti kruha

U Tablici 6. nalaze se rezultati određivanja pH vrijednosti krušnog tijesta i kruha za sve analizirane uzorke. S obzirom da su za svaki uzorak provedena dva paralelna određivanja, u tablici su prikazane srednje vrijednosti mjerenja pH vrijednosti.

Tablica 6. Rezultati određivanja ukupne kiselosti uzoraka kruha

Uzorak	pH krušnog tijesta	pH kruha	Ukupna kiselost kruha (mL 0,1 M NaOH)
<b>PRO</b>	6,84±0,06	7,22±0,03	2,64±0,07
<b>PRO+GLU</b>	6,84±0,04	7,18±0,02	3,18±0,19
<b>PRO+FRU</b>	6,80±0,0	7,16±0,02	3,41±0,21
<b>KT+ARG</b>	6,52±0,11	6,77±0,02	5,01±0,16
<b>E</b>	6,82±0,01	7,19±0,06	3,23±0,03
<b>KT+E</b>	6,35±0,10	6,63±0,02	6,07±0,14
<b>KT+ARG+E</b>	6,38±0,06	6,67±0,03	5,83±0,08
<b>KT+PRO+FRU</b>	6,17±0,0	6,69±0,03	5,56±0,09
<b>KT+ARG+E+PRO+FRU</b>	6,41±0,0	6,42±0,02	8,82±0,32

<b>KT</b>	6,54±0,04	6,62±0,03	6,64±0,10
-----------	-----------	-----------	-----------

Rezultati određivanja pH vrijednosti krušnog tijesta očekivano su nešto niži za uzorke s dodatkom kiselog tijesta u odnosu na uzorke bez dodatka kiselog tijesta.

Uzorcima bez dodatka kiselog tijesta pH vrijednost se ne razlikuje značajno što pokazuje da dodatak prekursora nije utjecao značajno na promjenu pH vrijednosti krušnog tijesta.

Kod uzoraka s dodatkom kiselog tijesta najnižu pH vrijednost imao je uzorak s dodatkom prolina i fruktoze, dok je najviša pH vrijednost zabilježena kod uzorka s dodatkom arginina, što je povezano s razlikom u kinetici kiseljenja uzoraka kiselog tijesta: uzorak kiselog tijesta dodavanog u zamjes s dodatkom prolina i glukoze u najkraćem vremenu je postigao optimalnu pH vrijednost odnosno na kraju kiseljenja imao je najnižu vrijednost dok je uzorak kiselog tijesta dodavanog u zamjes s dodatkom arginina na kraju kiseljenja imao pH vrijednost nešto iznad 4.

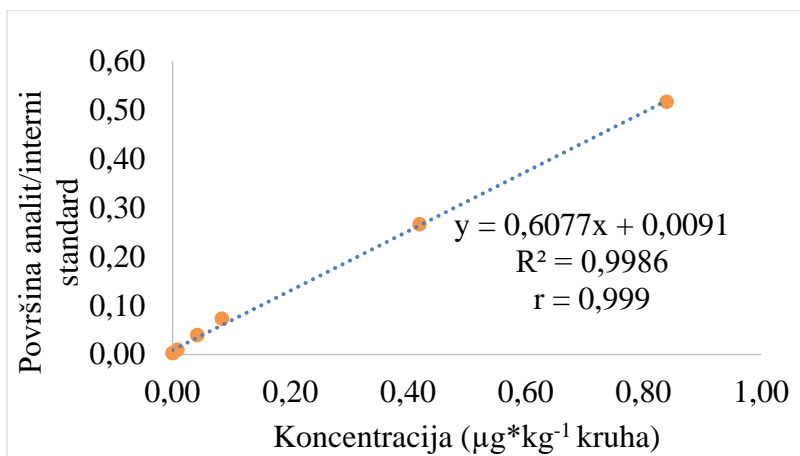
pH vrijednost kruha također je niža za uzorke s dodatkom kiselog tijesta u zamjes dok je ukupna kiselost izražena kao mL NaOH utrošenog za titraciju viša u uzorcima kruha u čiji je zamjes dodano kiselo tijesto. Raspon koncentracija krušnog tijesta u koje je dodano 20 % kiselog tijesta u ovom istraživanju je od 6,17 do 6,41 što je nešto više u odnosu na  $5,32 \pm 0,21$  koliki je bio pH krušnog tijesta od rižinog brašna s dodatkom 20 % kiselog tijesta u istraživanju Merta i sur. (2014). Razlika vjerojatno potječe od dodatka drugih sirovina (brašna žutog graška) i prekursora koji nisu dodavani u navedenom istraživanju.

#### **4.3. Rezultati određivanja koncentracije karakterističnih spojeva arome**

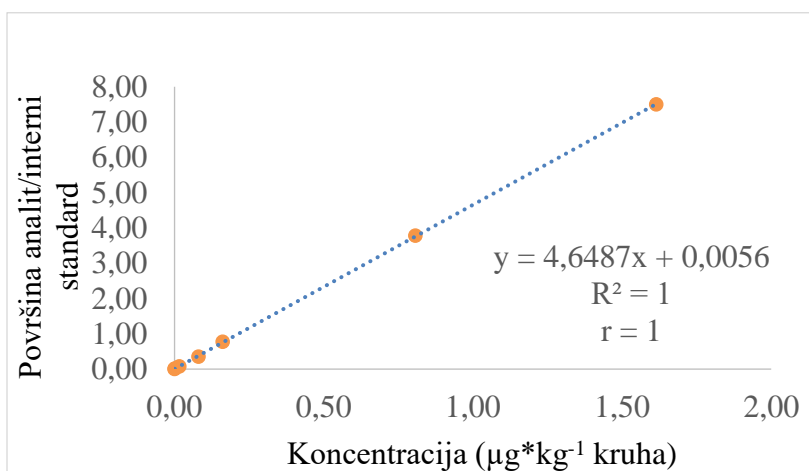
Koncentracija spojeva odgovornih za aromu kore i kruha određena je iz prethodno pripremljenih baždarnih dijagrama koji predstavljaju ovisnost omjera površine analita i internog standarda o koncentraciji analiziranog spoja.

Na slikama od 3. do 19. prikazani su baždarni dijagrami za sve analizirane aromatske spojeve.

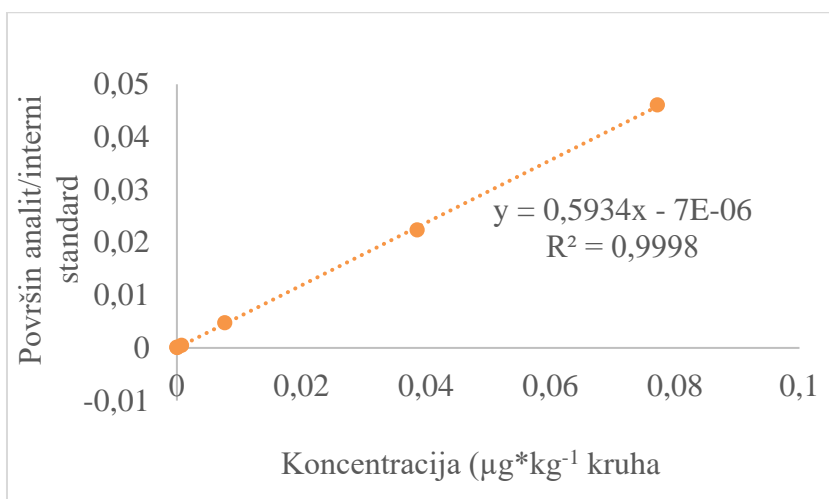
Za svaki baždarni dijagram prikazana je jednadžba regresijskog pravca, njegov nagib i odsječak na osi y. Osim toga prikazan je i koeficijent determinacije ( $R^2$ ) te koeficijent korelacije ( $r$ ).



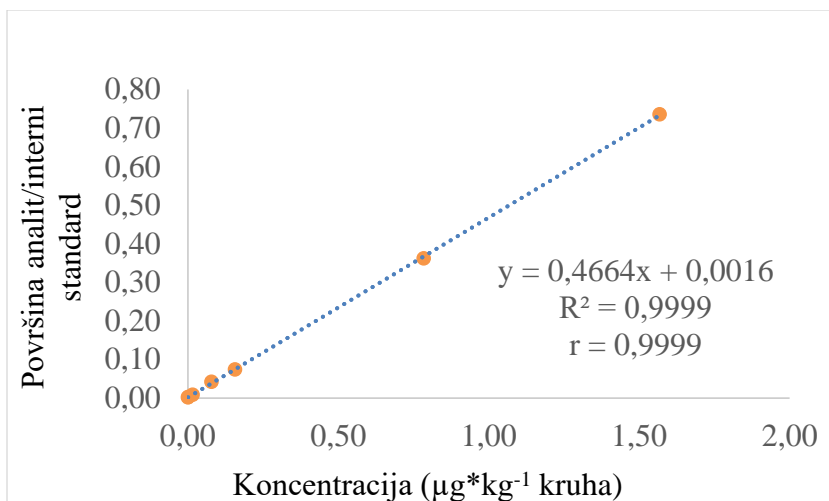
Slika 3. Baždarni dijagram za 2-etilpirazin



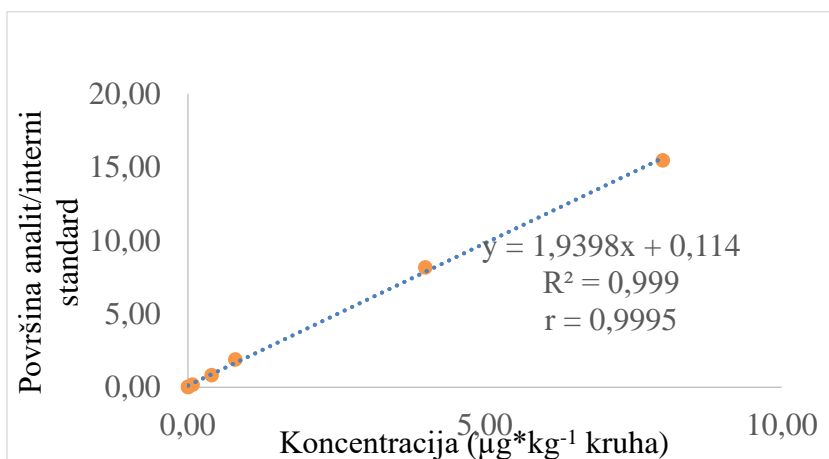
Slika 4. Baždarni dijagram za okt-1-en-3-ol



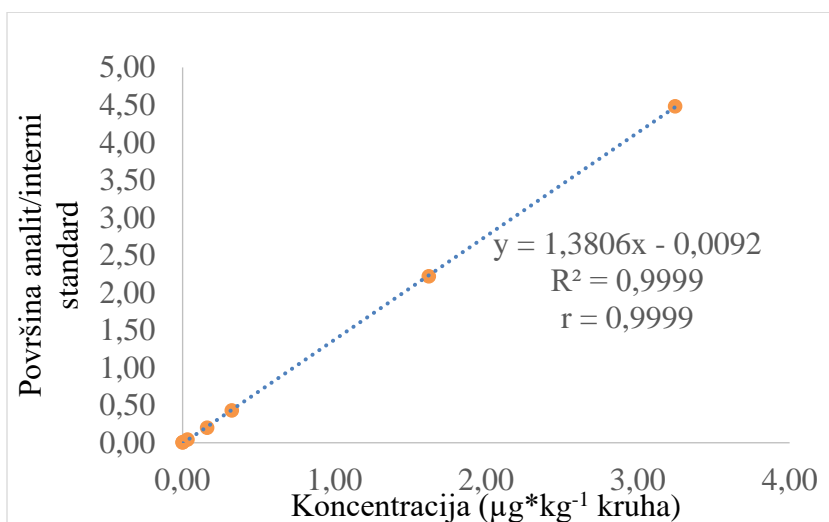
Slika 5. Baždarni dijagram za (E)-non-2-enal



Slika 6. Baždarni dijagram za furan-2-karbaldehid

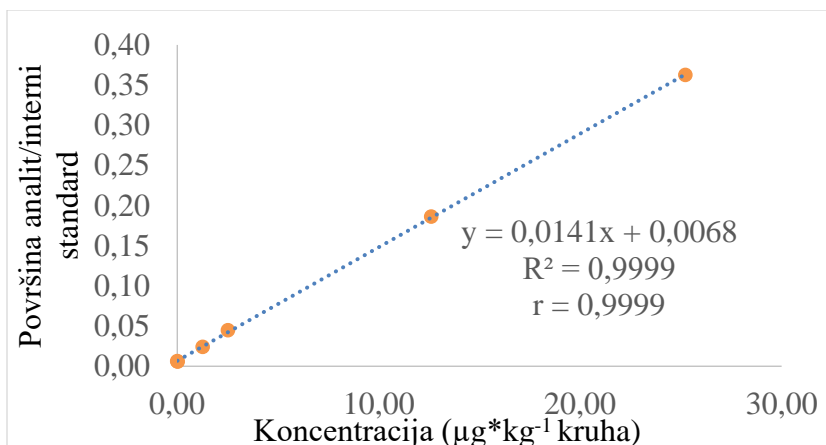


Slika 7. Baždarni dijagram za benzaldehid

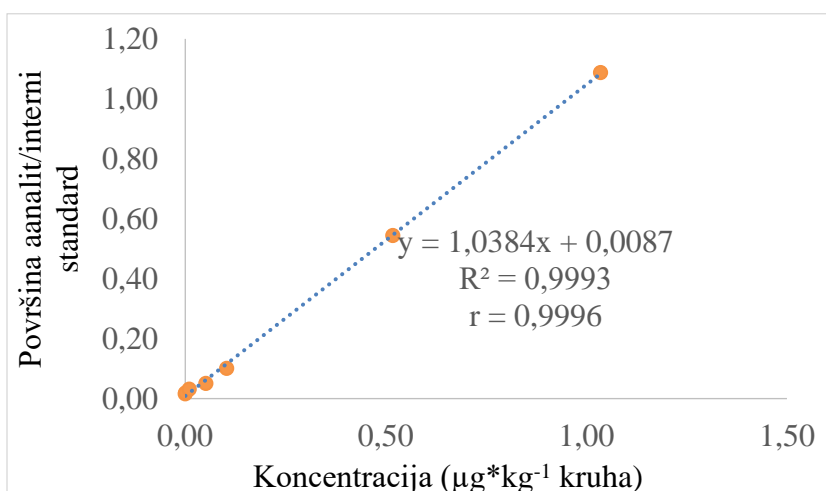


Slika 8. Baždarni dijagram za furan 2-fenilacetaldehid

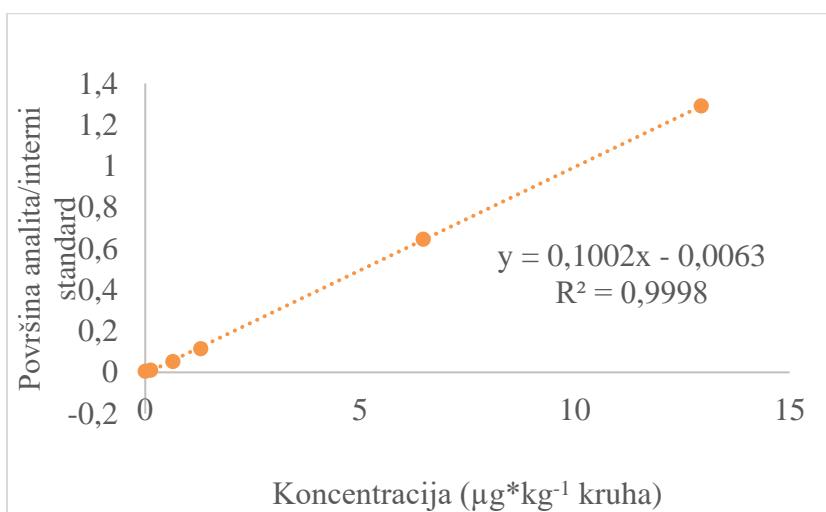




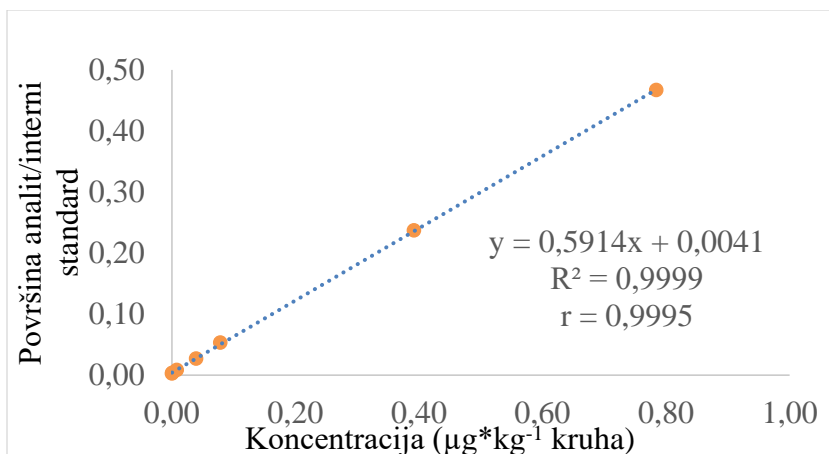
Slika 9. Baždarni dijagram za furan-2-ilmetanol



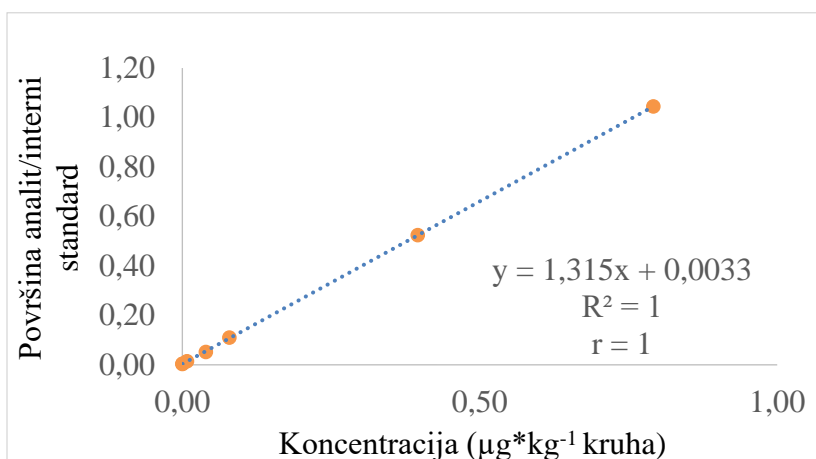
Slika 10. Baždarni dijagram za (2E,4E)-deka-2-dienal



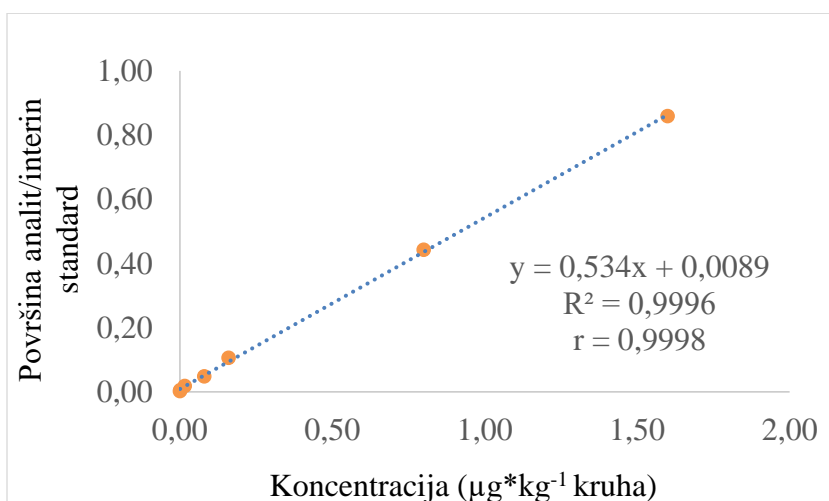
Slika 11. Baždarni dijagram za 1-(1H-pirol-2-il) etanon



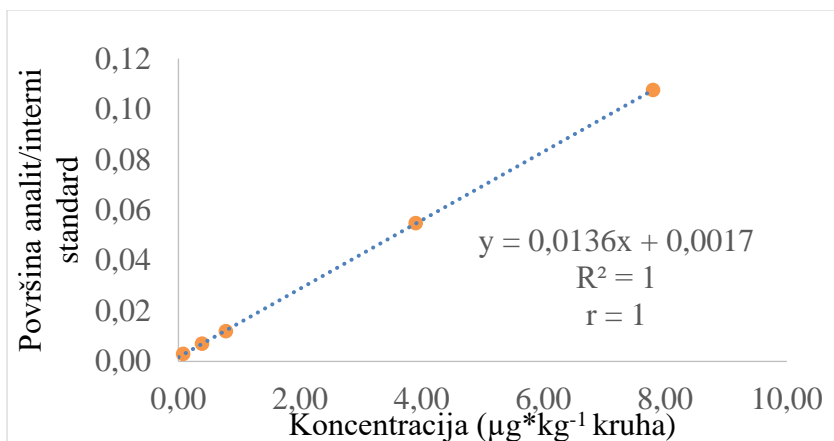
Slika 12. Baždarni dijagram za 1-(furan-2-il) etanon



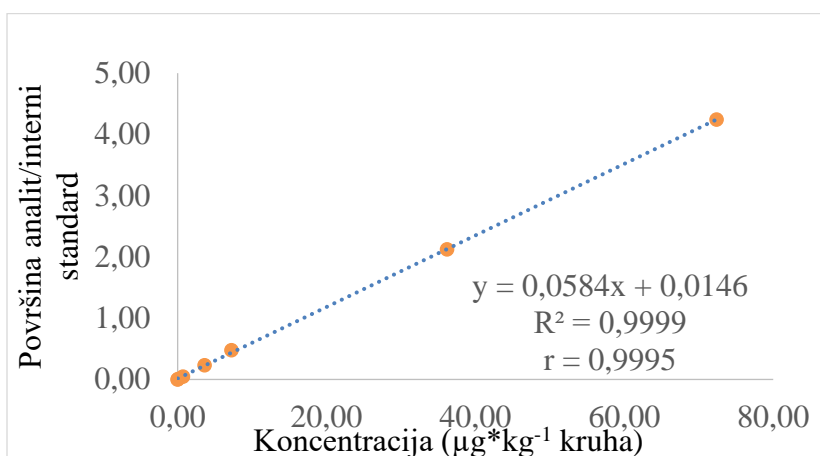
Slika 13. Baždarni dijagram za 2,3,5-trimetilpirazin



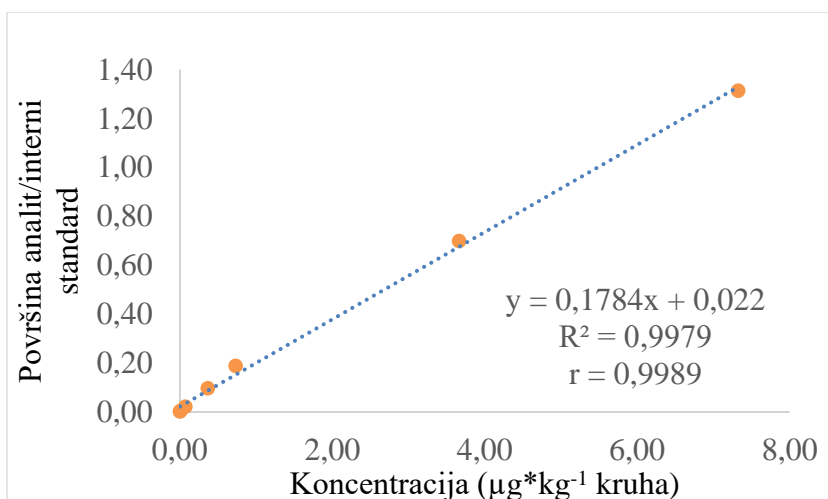
Slika 14. Baždarni dijagram za 2,5-dimetilpirazin



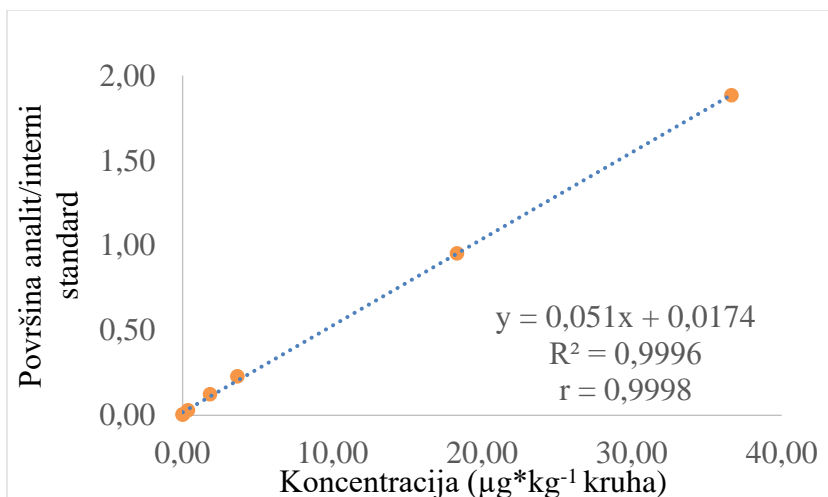
Slika 15. Baždarni dijagram za butan-2,3-dion



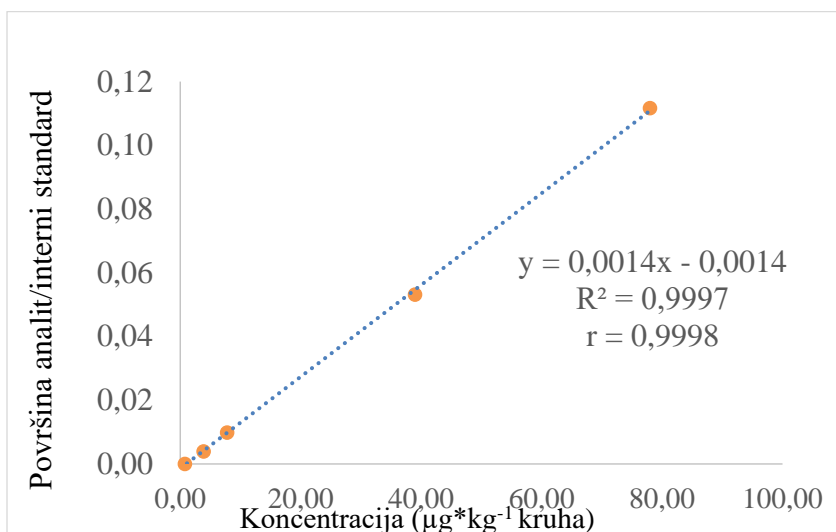
Slika 16. Baždarni dijagram za 3-metilbutan-1-ol



Slika 17. Baždarni dijagram za 2-metilpirazin



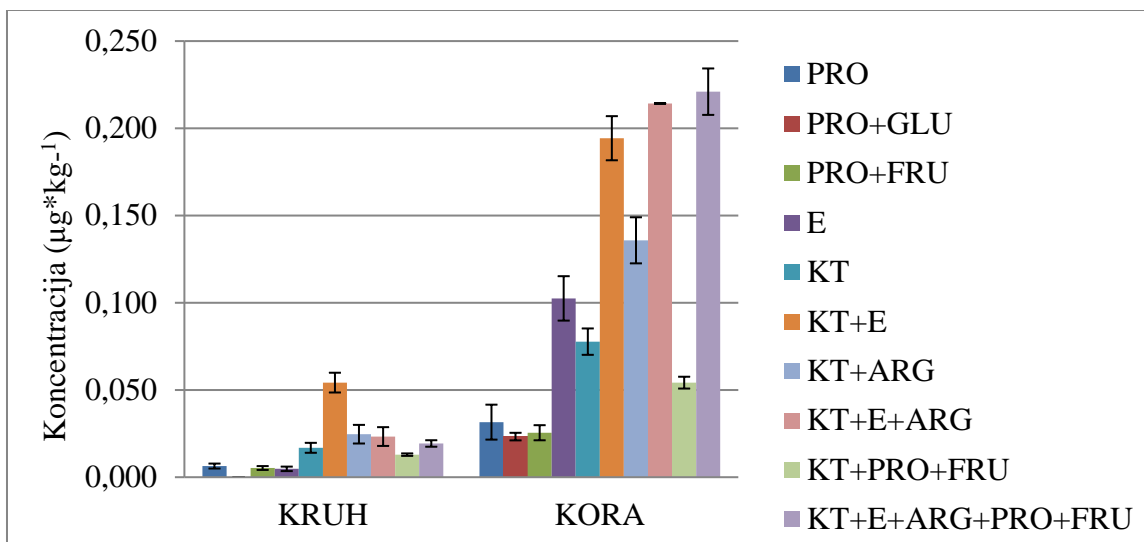
Slika 18. Baždarni dijagram za 3-metilbutanal



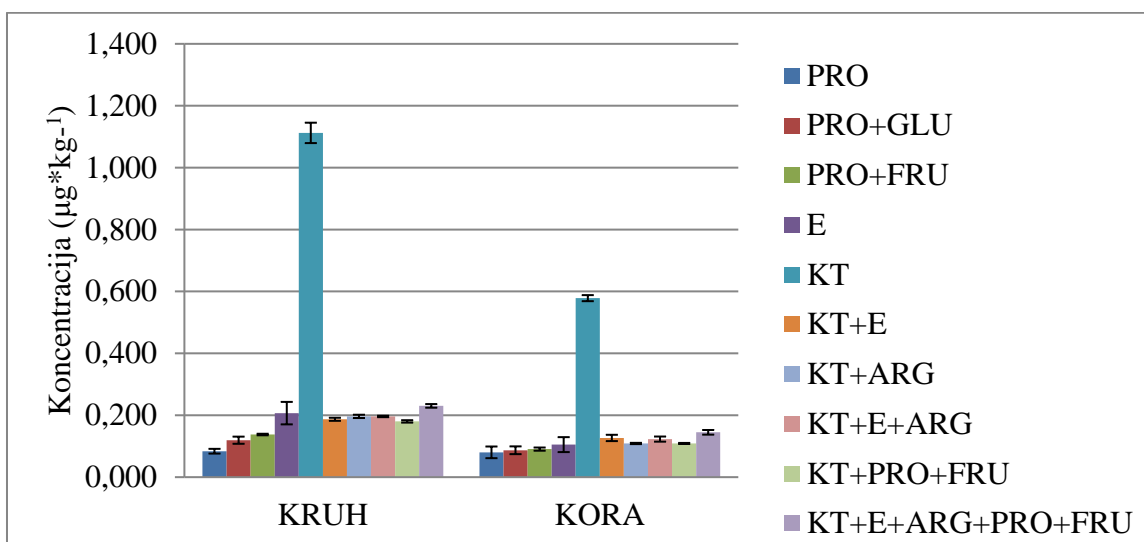
Slika 19. Baždarni dijagram za 2-metil butanska kiselina

Konačni cilj ovog istraživanja bio je u uzorcima kore i kruha odrediti koncentracije 17 različitih aromatskih spojeva nositelja arome kruha/kore te utvrditi prekursore čiji dodatak najznačajnije utječe na poboljšanje arome bezglutenskog kruha.

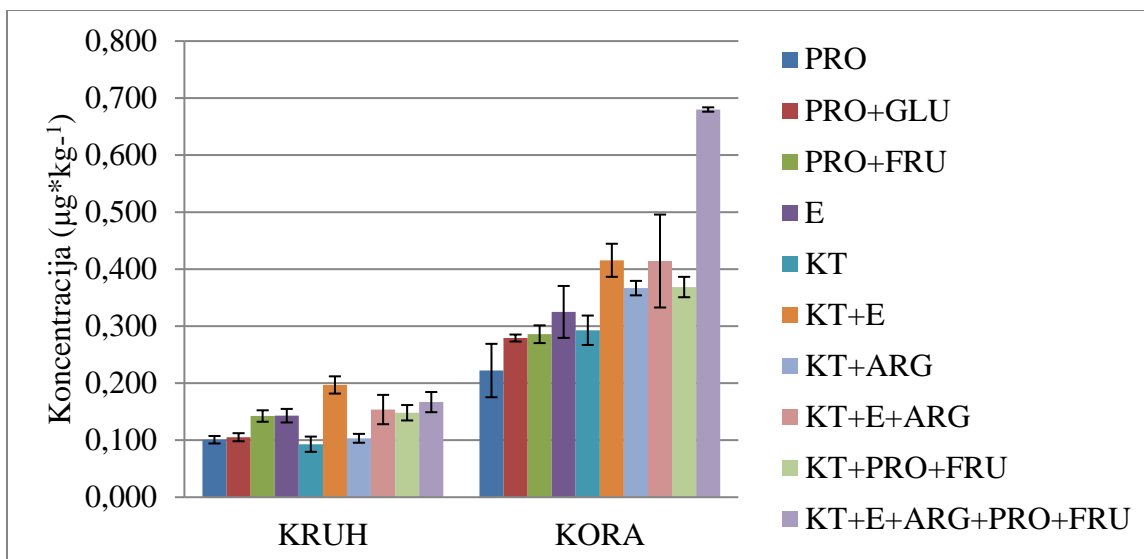
Na Slikama od 20. do 36. prikazane su koncentracije svih analiziranih spojeva za sve uzorke kruha.



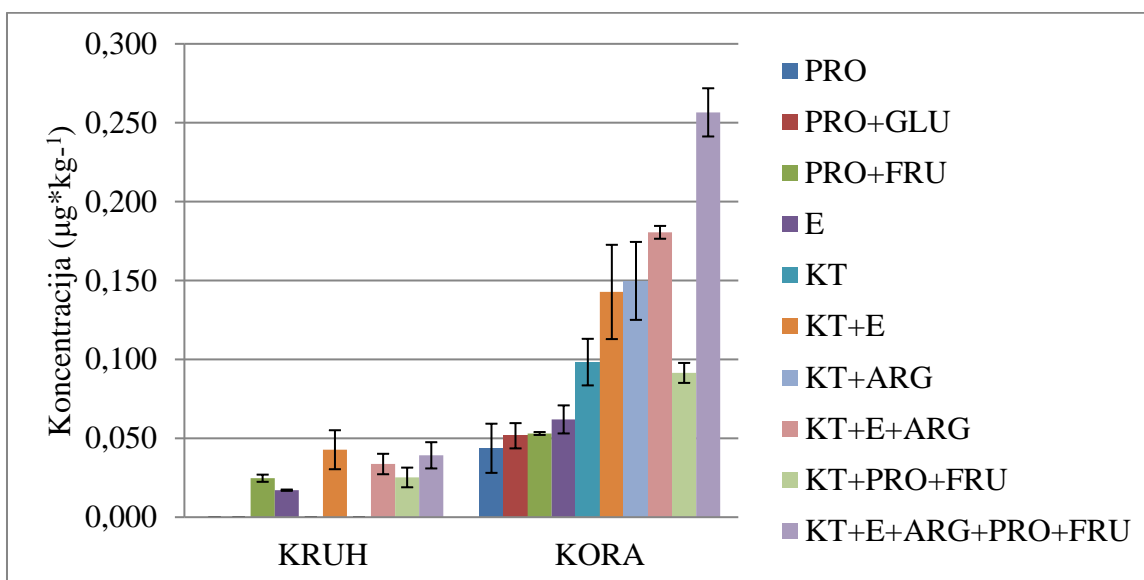
Slika 20. Koncentracija 2-etilpirazina u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



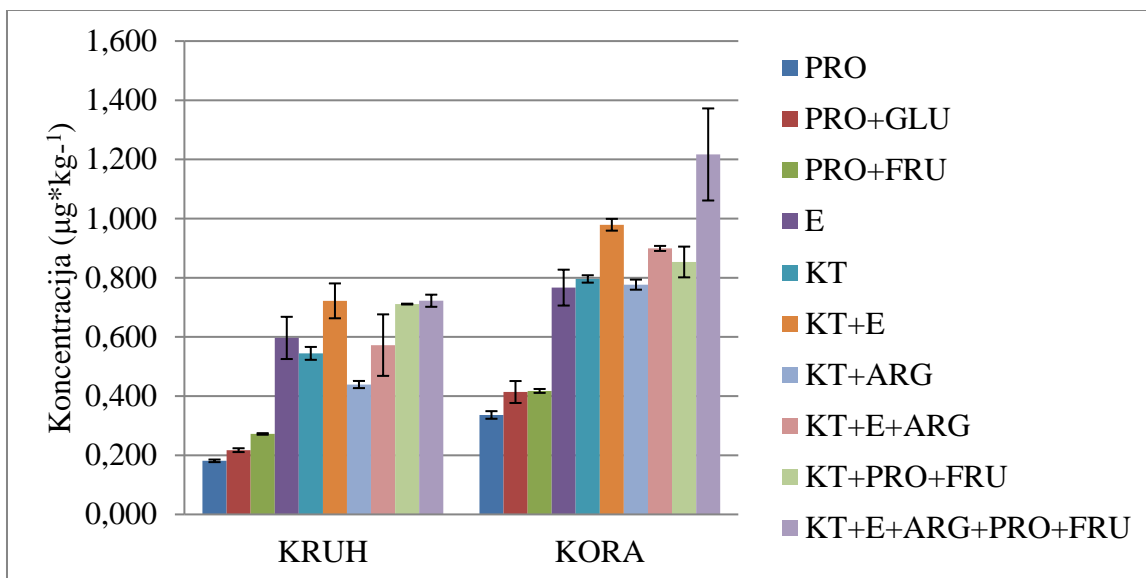
Slika 21. Koncentracija okt-1-en-3-ola u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



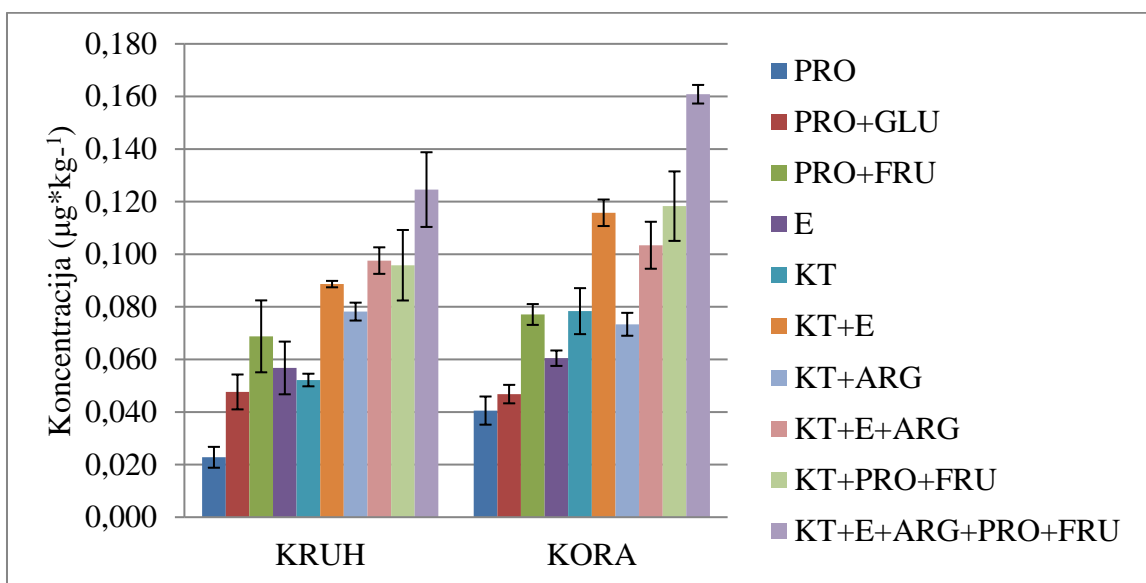
Slika 22. Koncentracija furan-2-karbaldehida u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



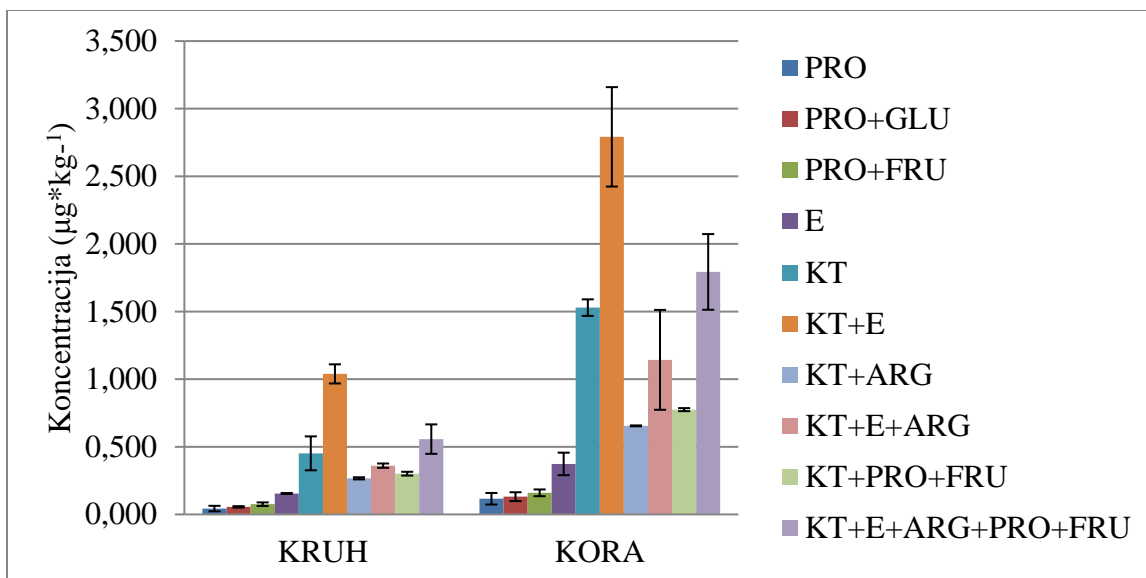
Slika 23. Koncentracija 1-(furan-2-il) etanona u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



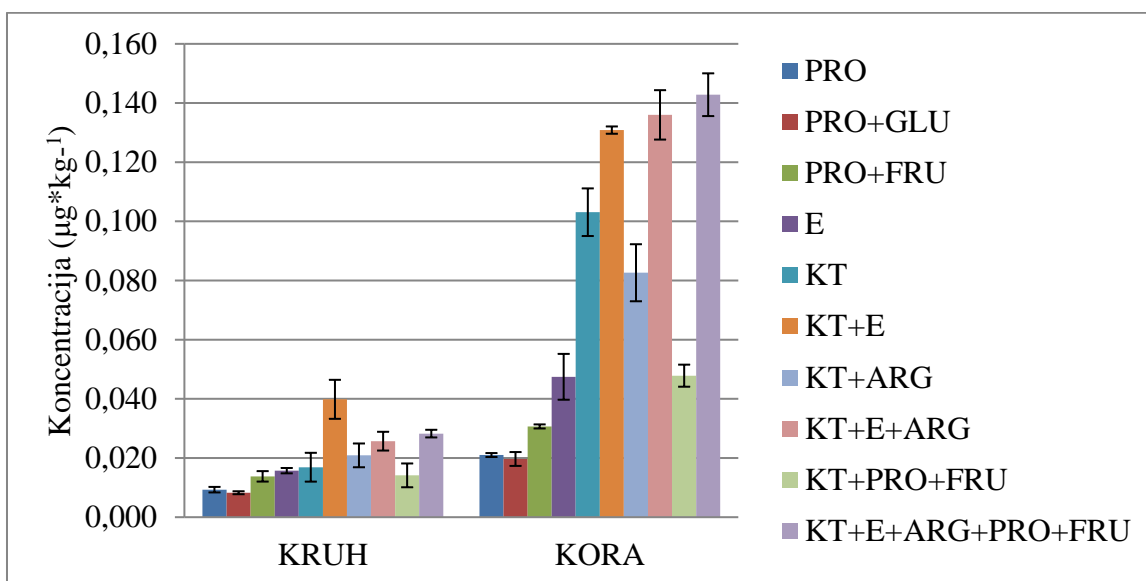
Slika 24. Koncentracija benzaldehida u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



Slika 25. Koncentracija (E)-non-2-eala u uzorcima cijelog kruha i kore kruha

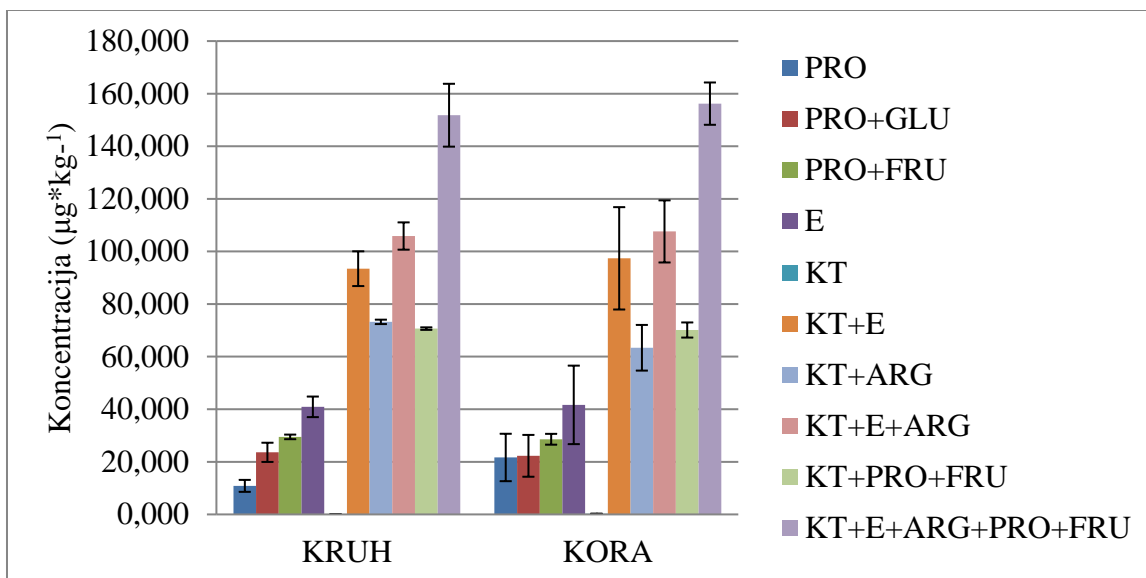


Slika 26. Koncentracija 2-fenilacetaldehida u uzorcima cijelog kruha i kore kruha

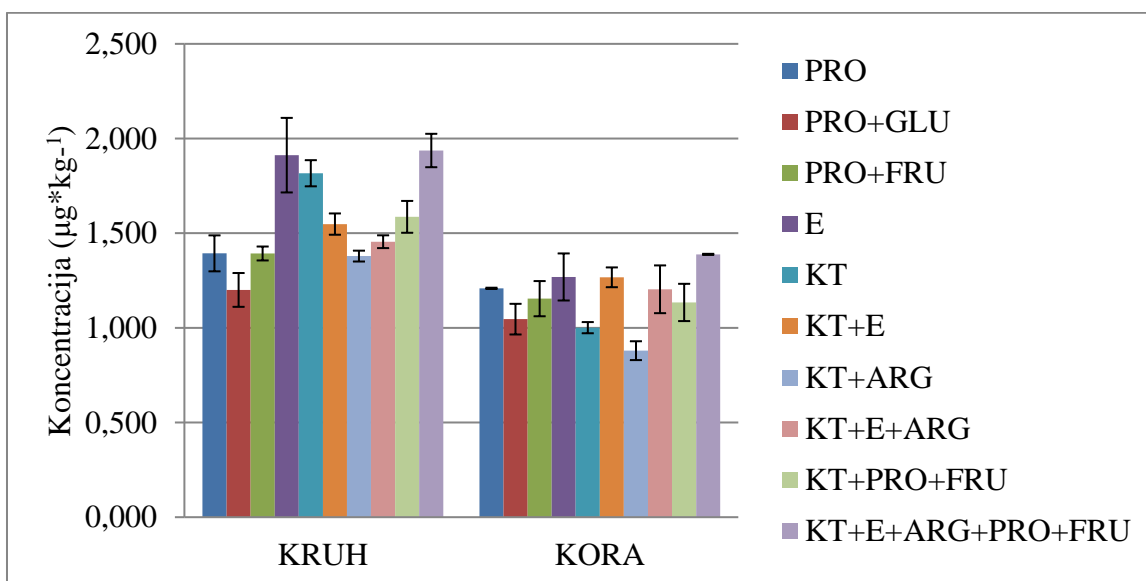


Slika 27. Koncentracija 2,3,5-trimetilpirazina u uzorcima cijelog kruha i kore kruha

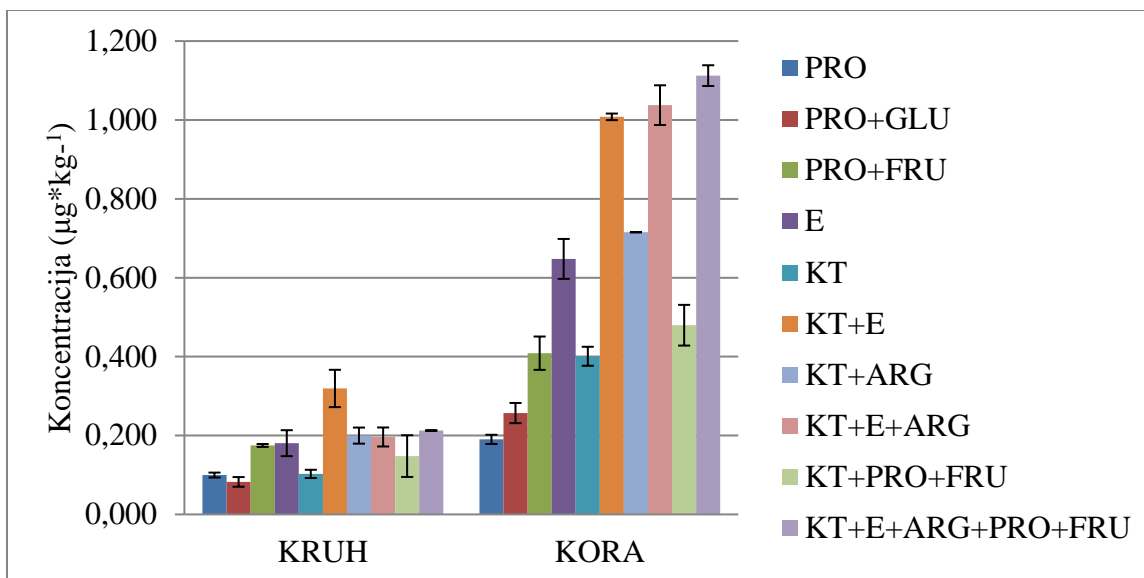




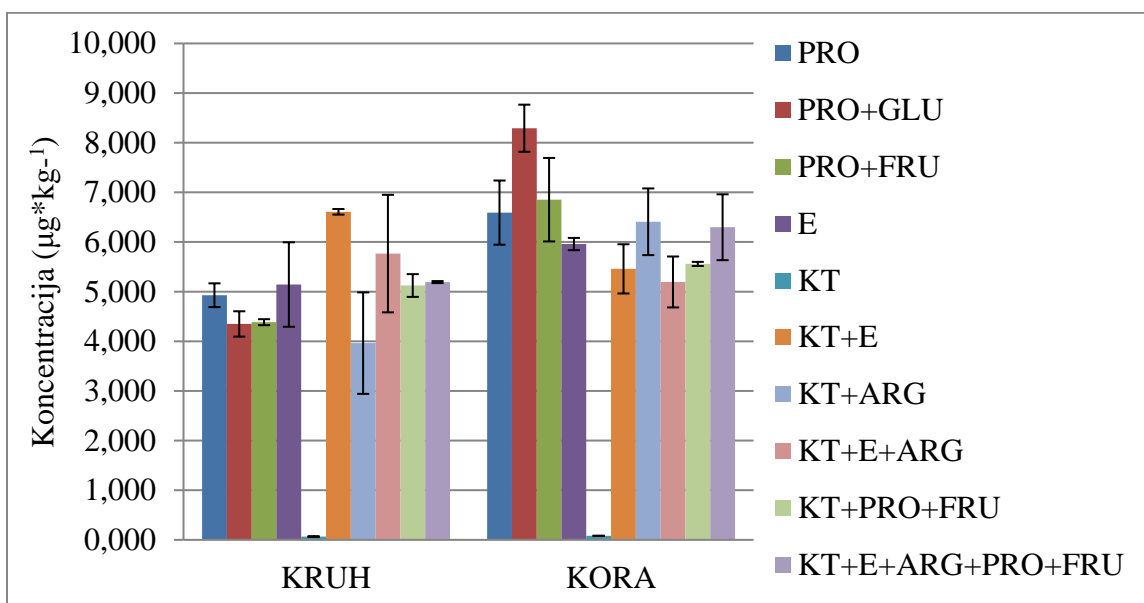
Slika 28. Koncentracija furan-2-ilmetanola u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



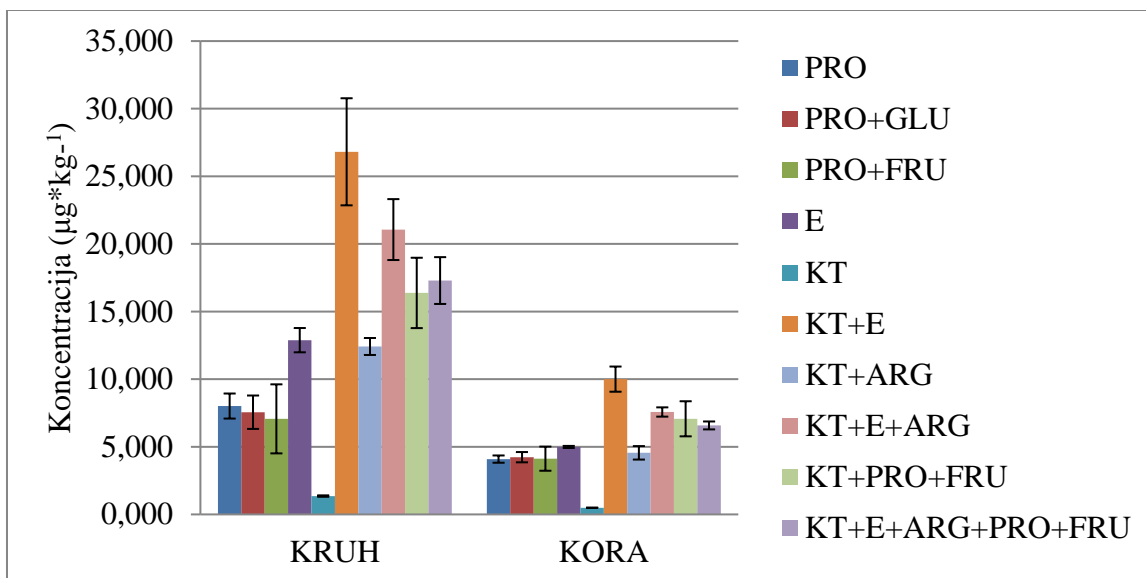
Slika 29. Koncentracija (2E,4E)-deka-2,4-dienala u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



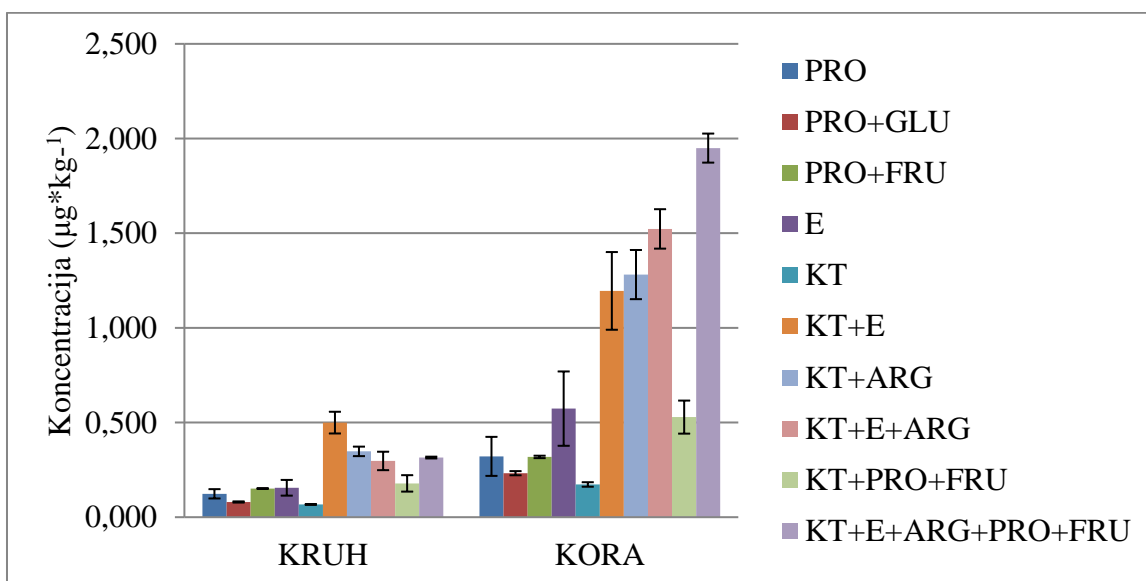
Slika 30. Koncentracija 2,5-dimetilpirazina u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



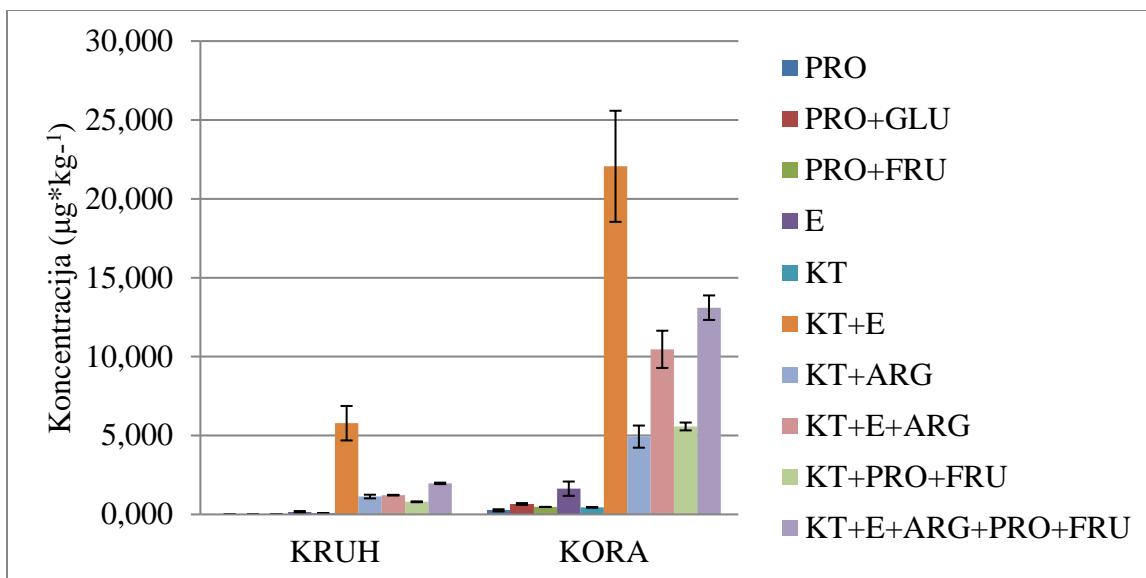
Slika 31. Koncentracija butan-2,3-diona u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



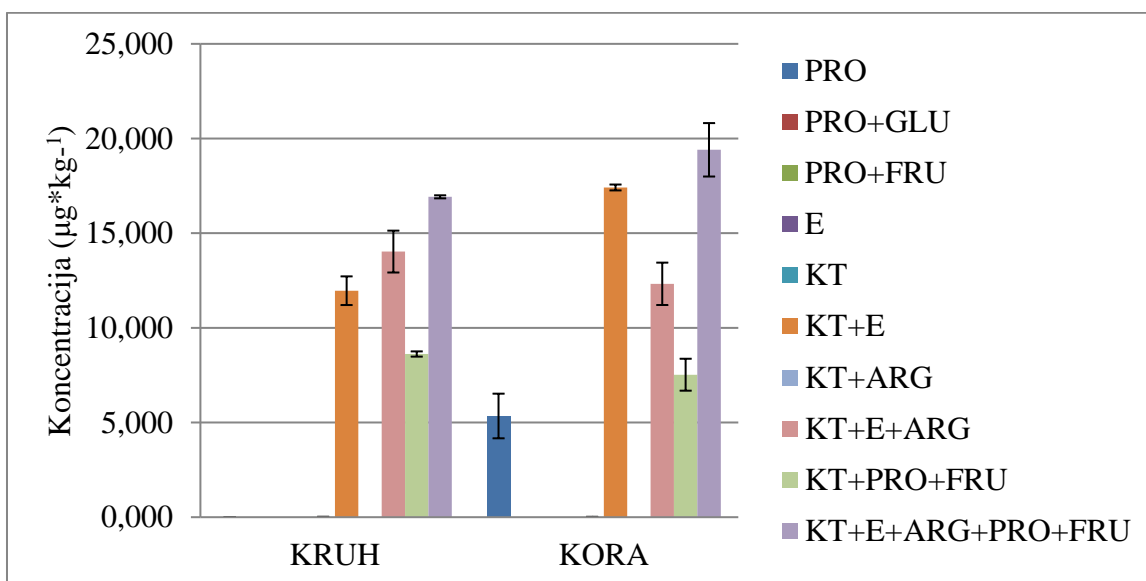
Slika 32. Koncentracija 3-metilbutan-1-ola u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



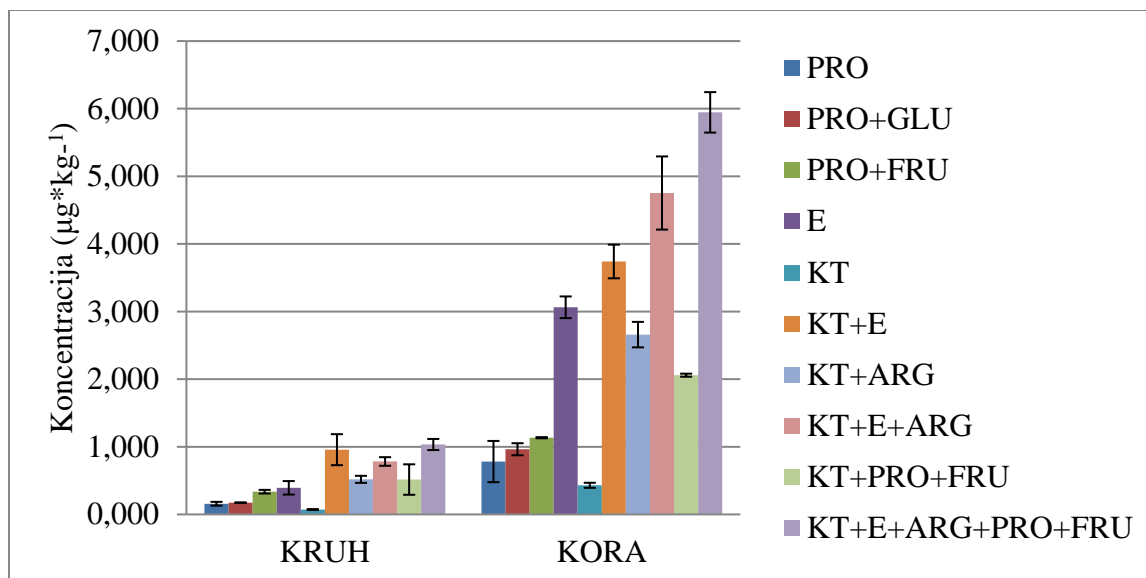
Slika 33. Koncentracija 2-metilpirazina u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



Slika 34. Koncentracija 3-metilbutanala u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



Slika 35. Koncentracija 2-metilbutanske kiseline u uzorcima cijelog kruha i kore kruha



Slika 36. Koncentracija 1-(1H-pirol-2-yl) etanona u uzorcima cijelog kruha i kore kruha

Koncentracija 1-(1H-pirol-2-yl) etanona najviša je u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU za uzorke cijelog kruha i iznosi 1,034 µg\*kg<sup>-1</sup>. Ovaj spoj doprinosi orašastoj, „prepečenoj“ aromi kruha.

Osim ovog spoja, prema literaturi (Cho i Peterson, 2010), spojevi koji najznačajnije doprinose aromi kruha jesu (E)-nonenal (travnati, zeleni miris), (2E,4E)-deka-2,4-dienal (voskasti miris), butan-2,3-dion (diacetil) (zeleni, masni miris), okt-1-en-3-ol (slatkasti miris) i 2-fenilacetaldehid (zeleni, metalni miris).

Najveće koncentracije (E)-nonenala i (2E,4E)-deka-2,4-dienala bile su, također, u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU i iznosile su 0,125 µg\*kg<sup>-1</sup> za (E)-nonenal i 1,937 µg\*kg<sup>-1</sup> za (E,E)-2,4-dekadienala, dok je koncentracija okt-1-en-3-ola najviša bila u uzorku KT (1,112 µg\*kg<sup>-1</sup>) a odmah zatim u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU gdje je koncentracija ovog spoja bila 0,230 µg\*kg<sup>-1</sup>.

Koncentracije butan-2,3-diona i 2-fenilacetaldehida najviše su bile u uzorku KT+E. Koncentracija butan-2,3-diona u uzorku KT+E iznosila je 6,608 µg\*kg<sup>-1</sup> a u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU 5,193 µg\*kg<sup>-1</sup>. U uzorku KT+E kvantificiran je i 2-fenilacetaldehid čija je koncentracija iznosila 1,039 µg\*kg<sup>-1</sup> što je dvostruko više nego u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU.

Dominantni spoj za sve uzorke kruha jest furan-2-ilmetanol koji nastaje u Maillardovim reakcijama, a kojeg karakterizira miris poput karamele. Njegov raspon koncentracije iznosio je od 23,606 µg\*kg<sup>-1</sup> u uzorku PRO+GLU do 156,343 µg\*kg<sup>-1</sup> u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU.

U istraživanju koje su proveli Pacynski i sur. (2015) koncentracija ovog spoja u uzorku bezglutenskog kruha s dodatkom prolina i glukoze iznosila je  $25,54 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Rezultati navedenog istraživanja su slični rezultatima dobivenim tijekom ovog istraživanja za iste dodane prekursore. Dodatkom kiselog tijesta, enzima, arginina i zamjenom glukoze fruktozom značajno je povećana koncentracija ovog spoja (gotovo 6 puta).

U ovom istraživanju posebno je analizirana kora kruha. U prethodnim istraživanjima utvrđeno je da je aromatski sastav kore kruha od rižinog brašna mnogo kompleksniji od aromatskog sastava kore pšeničnog kruha (Pacynski i sur., 2015).

Najznačajniji spojevi za aromu kore kruha od rižinog brašna, s obzirom na faktor razrjeđenja aromatskog spoja (FD - Flavor dilution) prema istraživanju koje su proveli Schieberle i Gorsch (1991,1994) su 3-metilbutanal, (E)-non-2-enal, butan-2,3-dion, okt-1-en-3-ol koji doprinose slatkoj, zelenoj, slatkoj i krumpirastoj aromi.

3-metilbutanal, karakteristični spoj arome kore kruha od rižinog brašna (Cho i Peterson, 2010) identificiran je i u uzorcima kore tijekom ovog istraživanja. Ovaj spoj nastaje u Maillardovim reakcijama a karakterizira ga miris nalik na jabuku. Najviša koncentracija ovog spoja je u uzorku KT+E i iznosi  $22,063 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  što je značajno manje u odnosu na koncentracije ovog spoja u uzorcima bezglutenskog kruha analiziranom u istraživanju Pacynskog i sur. (2015) gdje je raspon koncentracija ovog spoja bio od  $241,18 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  za uzorak kore bezglutenskog kruha bez dodatka prekursora odnosno  $426,00 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  uzorak kore bezglutenskog kruha s dodatkom prolina i glukoze. Uzrok odstupanja rezultata možda potiče od dodatka enzima ili brašna žutog graška.

Koncentracija (E)-non-2-enalala, spoja koji je nositelj zelene arome, u kori najviša je bila u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU i iznosila je  $0,161 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . U istraživanju koje su proveli Pacynski i sur. (2015) koncentracija (E)-non-2-enala bila je značajno veća kako u uzorku bezglutenskog kruha bez dodatka tako i u uzorcima bezglutenskog kruha s dodatkom prekursora.

Benzaldehid i 3-metilbutan-1-ol, spojevi koji nastaju tijekom procesa fermentacije u enzimskim reakcijama (Frasse i sur., 1992; Grosch i Schieberle, 1997; Hansen i Hansen, 1996; Hansen i Schieberle, 2005; Mildner-Szkudalrz i sur., 2011), identificirani su u svim uzorcima kore analiziranim tijekom ovog istraživanja.

Raspon koncentracija 3-metilbutan-1-ola u istraživanju Pacynskog i sur. (2015) u uzorcima bezglutenskog kruha bez dodatka i s dodatkom prekursora iznosio je od  $2,17$  do  $4,24 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

dok je u ovom istraživanju raspon koncentracija ovog spoja iznosio od 4,090  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  za uzorak PRO do 10,003  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  za uzorak KT+E što pokazuje da dodatak enzima i kiselog tijesta značajno utječe na povećanje koncentracije ovog spoja što je povezano s činjenicom da isti nastaje u enzimskim reakcijama tijekom fermentacije. 3-metilbutan-1-ol je nositelj arome na kakao, slad i sl.

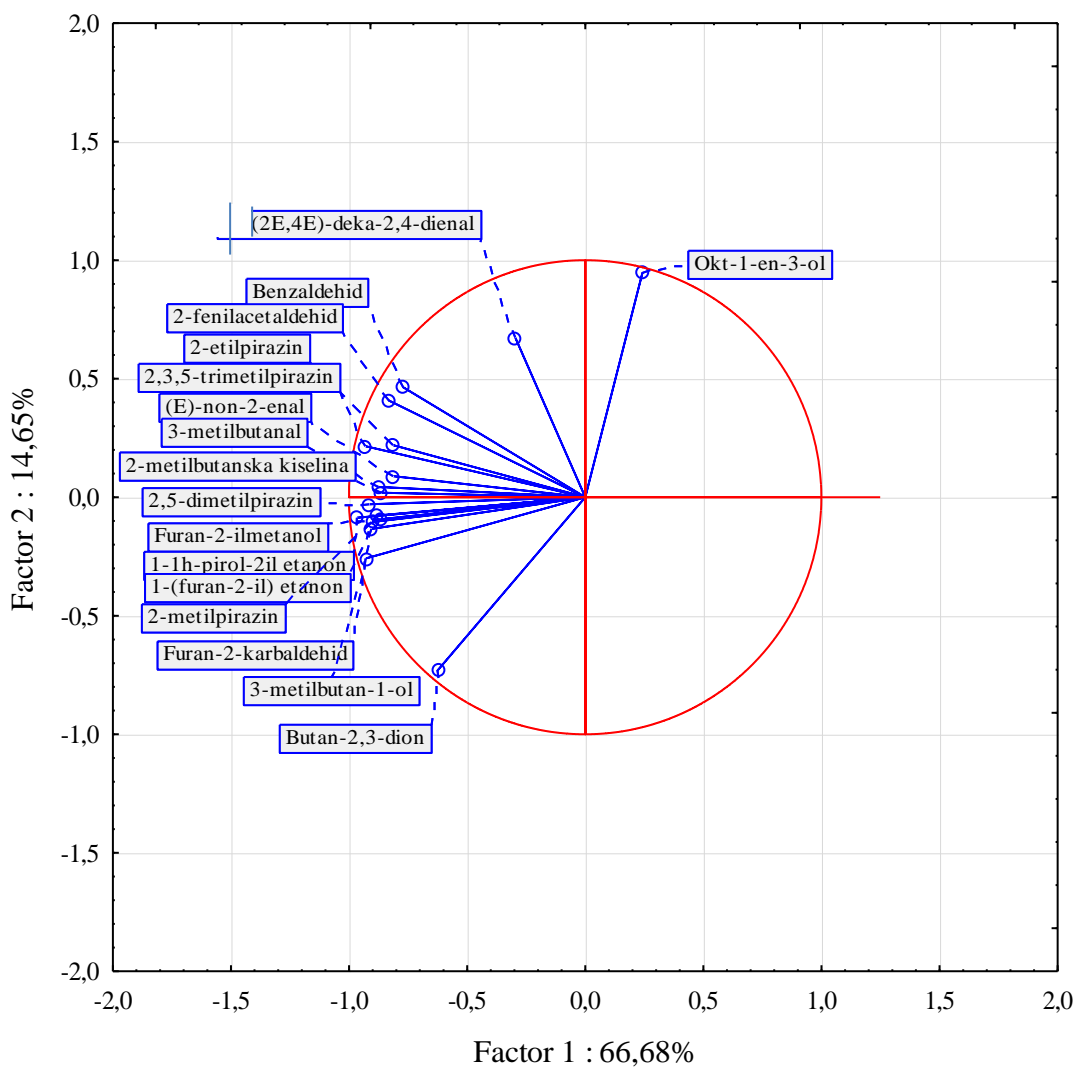
Koncentracija benzaldehida, spoja odgovornog za aromu poput gorkog badema, šećera, slada, najviša je bila u uzorku KT+E+ARG+PRO+FRU i iznosila je 1,217  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . U istraživanju Pacynskog i sur. (2015) ovaj spoj nije detektiran ili je detektiran u tragovima u svim analiziranim uzorcima kore bezglutenskog kruha, što pokazuje da dodatak ciljanih prekursora dovodi do nastanka ovog spoja poželjne arome.

Najviše koncentracije za sve uzorke imao je spoj furan-2il metanol nositelj arome nalik na karamelu i „kuhano“. Raspon koncentracija bio je od 21,655  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  za uzorak PRO do 156,206  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Koncentracija ovog spoja u istraživanju Pacynskog i sur. (2015) u uzorku kore bezglutenskog kruha s dodatkom prolina i glukoze iznosila je 25,54  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  što je usporedivo s koncentracijom istog spoja u uzorku kore bezglutenskog kruha s istim dodanim prekursorima analizirane tijekom ovog istraživanja koja je iznosila 22,273  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Ovi rezultati ukazuju na to da dodatak kiselog tijesta, enzima i arginina značajno utječu na povećanje koncentracije ovog spoja u uzorcima kore bezglutenskog kruha, što doprinosi poboljšanju arome istog.

#### **4.4. Rezultati statističke analize glavnih komponenti**

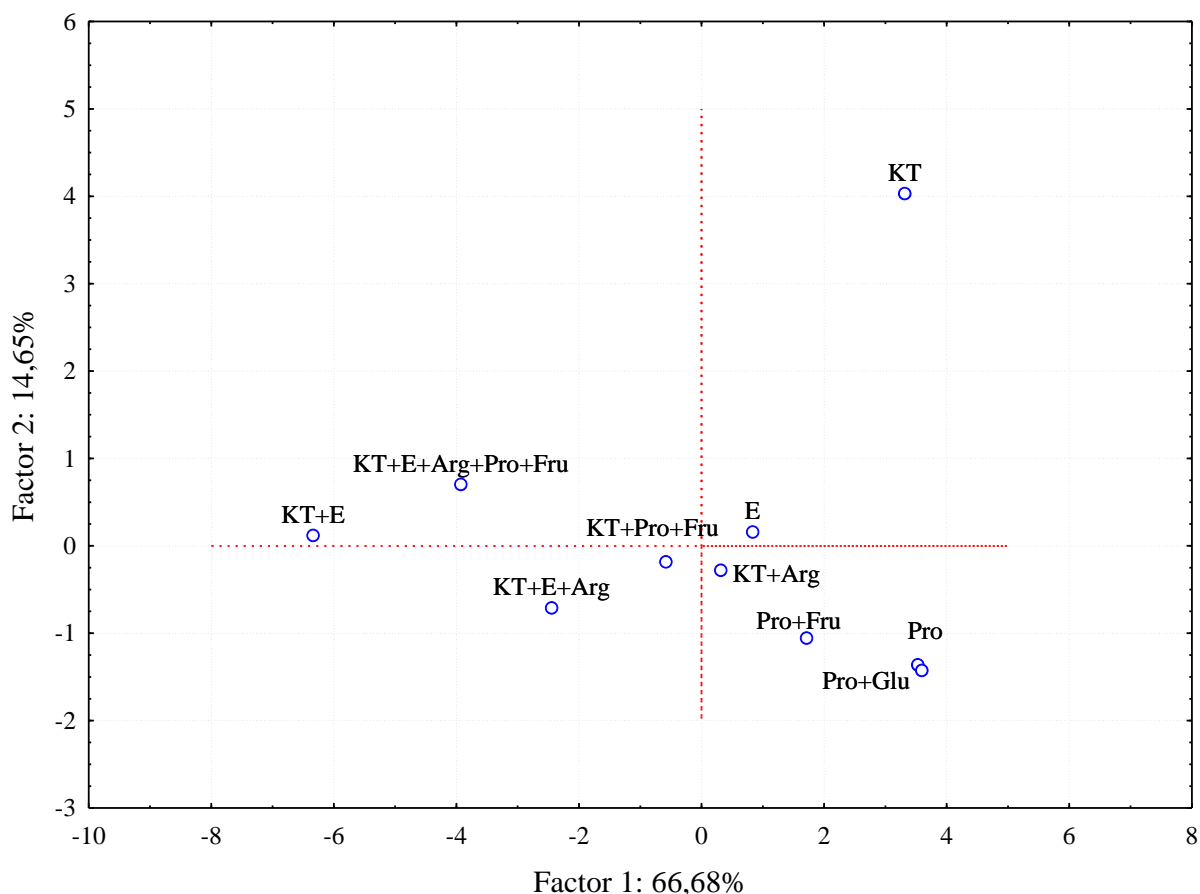
Kako bi se dobio bolji uvid u povezanost koncentracije pojedinih spojeva s razlikama među analiziranim uzorcima provedena je analiza glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA).

Prve dvije glavne komponente sa svojstvenim ('*eigen*') vrijednostima 11,33 i 2,49 objašnjavaju 81,3 % ukupne varijance. Na slikama 37. i 38. prikazani su rezultati PCA analize za prve dvije glavne komponente za analizirane uzorke cijelog kruha.



Slika 37. Faktorsko opterećenje ('loadings') na prve dvije glavne komponente izračunato analizom glavnim komponenti za spojeve u uzorcima cijelih kruhova





Slika 38. Vrijednosti prve dvije komponente u faktorskim bodovima ('scores') izračunato analizom glavnim komponenti za uzorke cijelih kruhova

Komponenta 1, objašnjavajući oko 67 % varijance za analizirane spojeve arome u kruhu, u negativnoj je korelaciji s 1-1h-pirol-2il etanomom (-0,967), 2,3,5-trimetilpirazinom (-0,930), 3-metilbutan-1-olom (-0,930), 2,5-dimetilpirazin (-0,914), furan-2-karbaldehidom (-0,905), 2-metilpirazinom (-0,904), 1-(furan-2-il) etanomom (-0,887), 3-metilbutanalom (-0,875), furan-2-ilmetanolom (-0,869), 2-metilbutanskom kiselinom (-0,862), 2-fenilacetaldehidom (-0,831), 2-etilpirazinom (-0,814), (E)-non-2-enalom (-0,813) i benzaldehidom (-0,770).

Komponenta 2 objašnjava oko 15 % varijance za analizirane spojeve arome u kruhu. Spoj okt-1-en-2-ol u pozitivnoj je korelaciji s komponentom 2 (0,946) dok je spoj butan-2,3-dion u negativnoj korelaciji s ovom komponentom (-0,731).

Sa slike 38 vidljivo je da su uzorci kruha PRO, PRO+GLU i PRO+FRU u pozitivnoj korelaciji s komponentom 1 dok su u negativnoj korelaciji s komponentom 2. Odnosno, ovi uzorci kruha imaju sličan profil analiziranih spojeva arome iz čega se zaključuje da dodatak prolina u

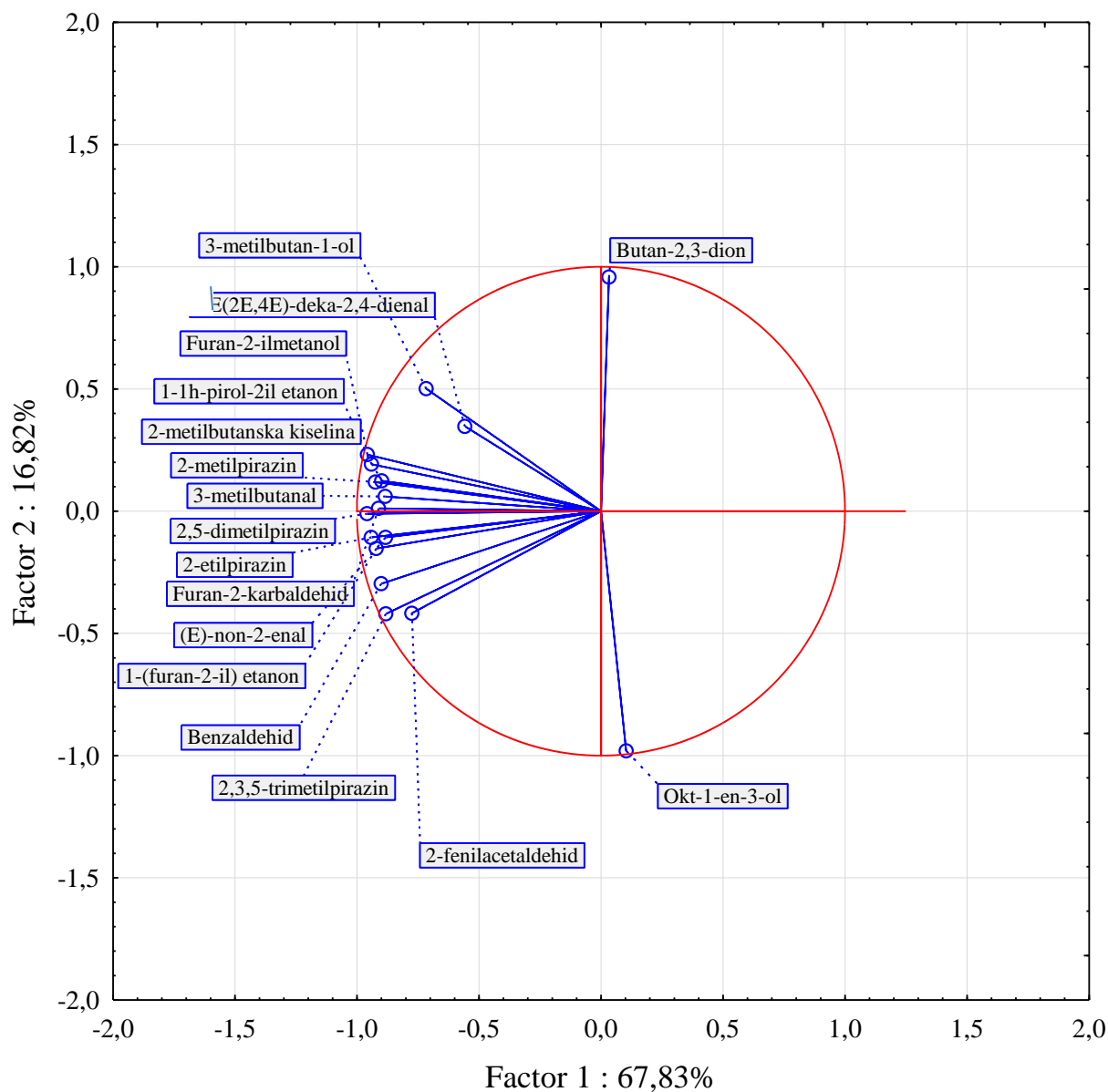
kombinaciji sa šećerima u odnosu na dodatak samo prolina ne mijenja značajno profil analiziranih spojeva arome.

Također vidljivo je uzorak KT u pozitivnoj korelaciji s obje komponente iz čega proizlazi da se razlikuje s obzirom na profil aromatskih spojeva od svih drugih analiziranih uzoraka.

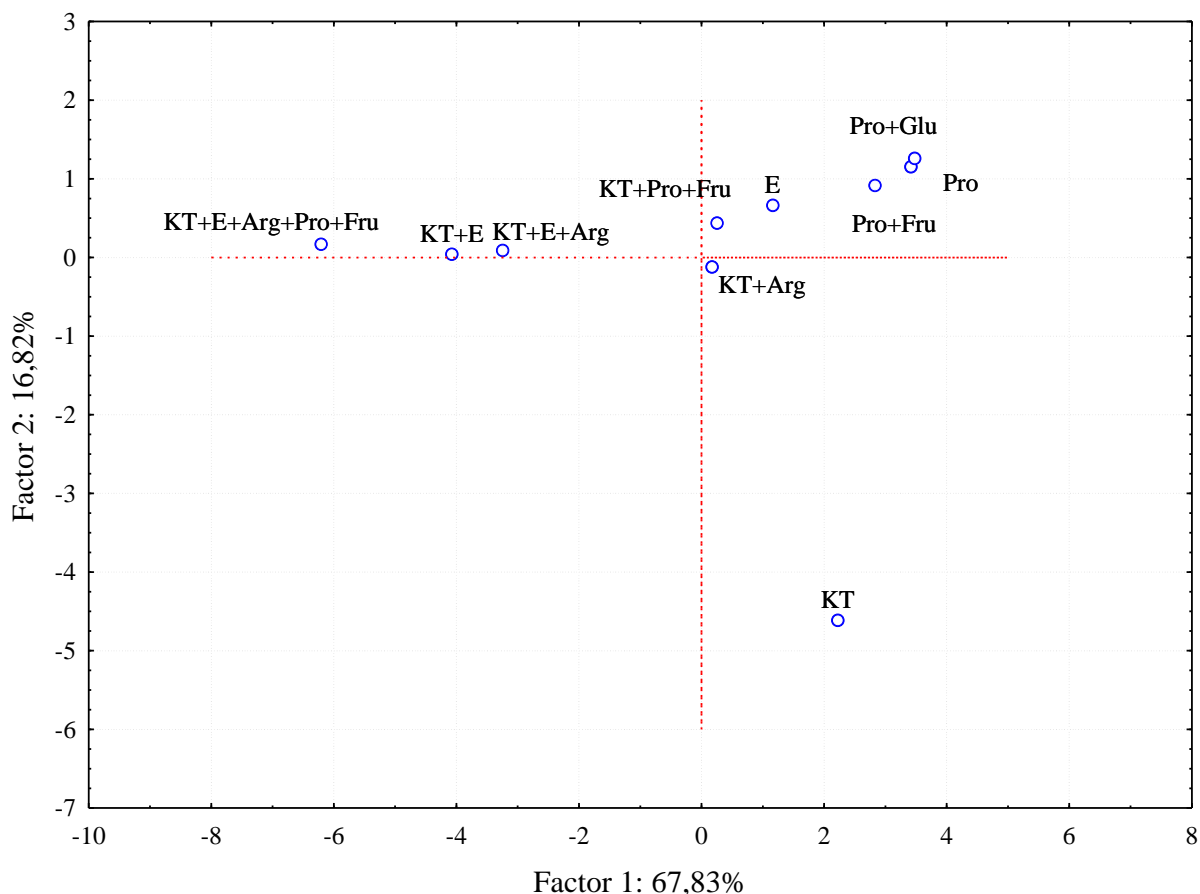
Najznačajniju negativnu korelaciju analiziranih spojeva arome povezanih s komponentom 1 ima uzorak KT+E koji je u pozitivnoj korelaciji s komponentom 2, zatim uzorak KT+E+ARG+PRO+FRU koji je u istim odnosima s komponentama 1 i 2, što znači da ih karakterizira najviše izražen profil arome.

Prema Slici 38 vidljivo je da uzorci E, KT+PRO+FRU i KT+E+ARG imaju slične koncentracije analiziranih spojeva te bi stoga s ekonomskog stajališta prihvatljiviji bio dodatak enzima proteaze direktno u krušno tijesto s obzirom da se postiže sličan profil aromatskih spojeva, a proces proizvodnje kruha bez dodatka kiselog tijesta je jednostavniji i znatno kraći.

Na Slikama 39. i 40. prikazani su rezultati PCA analize za analizirane uzorke kore.



Slika 39. Faktorsko opterećenje ('loadings') na prve dvije glavne komponente izračunato analizom glavnim komponenti za spojeve u uzorcima kore kruhova



Slika 40. Vrijednosti prve dvije komponente u faktorskim bodovima ('scores') izračunato analizom glavnim komponenti za uzorke kore

Prikazani rezultati dobiveni su za prve dvije glavne komponente sa svojstvenim ('eigen') vrijednostima 11,53 i 2,86 koje objašnjavaju 84,6 % ukupne varijance.

Komponenta 1, koja objašnjava oko 68 % varijance, u negativnoj je korelaciji s gotovo svim analiziranim spojevima u kori: 2,5-dimetilpirazinom (-0,959), furan-2-ilmetanolom (-0,956), 2-etilpirazinom (-0,942), 1-1h-pirol-2il etanonom (-0,940), 2-metilpirazinom, (-0,925), 1-(furan-2)-il etanonom (-0,921), furan-2-karbaldehidom (-0,911), benzaldehidom (-0,901), 2-metilbutanskom kiselinom (-0,899), 3-metilbutanalom (-0,884), (E)-non-2-enalom (-0,882), 2,3,5-trimetilpirazinom (-0,882), fenilacetaldehidom (-0,775), 3-metilbutan-1-olom (-0,716).

Komponenta 2, objašnjava oko 17 % varijance u pozitivnoj je korelaciji s butan-2,3 dionom (0,957), a u negativnoj korelaciji s okt-1-en-3-olom (-0,981).

Na Slici 38. vidljivo je da su uzorci kore kruhova PRO, PRO+GLU i PRO+FRU grupirani zajedno što pokazuje da je profil analiziranih spojeva u ovim trima uzorcima sličan. Odnosno,

dodatak šećera i prolina u kombinaciji u odnosu na dodatak samo prolina ne utječe na značajnu razliku profila analiziranih spojeva u kori kruha. Također, s obzirom na položaj ovih uzoraka na Slici 38. vidljivo je da dodatak prolina, bez i uz dodatak glukoze i fruktoze u najmanjoj mjeri poboljšava profil spojeva arome u kori.

S druge strane, uzorci kore kruhova KT+E+ARG, KT+E i KT+E+ARG+PRO+FRU najviše koreliraju s analiziranim spojevima arome. Uzorak KT+E+ARG+PRO+FRU ima najizraženiji profil spojeva arome, no rezultati ukazuju da se dodatkom kiselog tijesta i enzima proteaze, bez i s dodatkom arginina može postići sličan aromatski profil.

Uzorci E, KT+ARG i KT+PRO+FRU imaju sličan profil analiziranih spojeva aroma kore. Zanimljivo je da se dodatkom samo enzima u zamjes za krušno tijesto bez dodatka kiselog tijesta postiže sličan profil spojeva arome u kori, kao i u cijelom kruhu.

## 5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti koncentracije karakterističnih hlapljivih spojeva, nositelja arome kruha te na temelju koncentracija karakterističnih spojeva odrediti prekursore koji najviše utječu na poboljšanje arome kore/kruha bezglutenskog kruha s dodatkom brašna žutog graška.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Uspješno je određena koncentracija svih 17 ciljanih spojeva odgovornih za aromu kore/cijelog kruha metodom GC/MS.
2. Dodatak prekursora u manjoj ili većoj mjeri utječe pozitivno na aromu kruha, dok nije imao utjecaj na pH vrijednost i ukupnu kiselost.
3. Najveće koncentracije karakterističnih spojeva odgovornih za aromu cijelog kruha određene su u uzorku u koji je dodano kiselo tijesto i enzim proteaza.
4. Najveće koncentracije karakterističnih spojeva odgovornih za aromu kore određene su u uzorku bezglutenskog kruha u koji je dodano kiselo tijesto, enzimi, arginin, prolin i fruktoza.
5. Sa stajališta senzorske prihvatljivosti bezglutenskih kruhova važnija je aroma kore te je prema tome najbolji profil arome postignut dodatkom kiselog tijesta, enzima, arginina, prolina i fruktoze. S ekonomskog stajališta se može zaključiti da se sličan profil arome bezglutenskog kruha postiže samo s dodatkom kiselog tijesta i enzima proteaze.
6. Dodatak enzima proteaze u krušno tijesto ima gotovo isti utjecaj na profil analiziranih spojeva, kao i dodatak kiselog tijesta i arginina, odnosno kiselog tijesta, prolina i fruktoze. S ekonomskog stajališta, s obzirom na jednostavniji i brži proces, opcija dodatka enzima bio bi mogući izbor za poboljšanje profila arome bezglutenskog kruha.

Daljnja istraživanja mogla bi biti usmjerena na utvrđivanje optimalnog udjela, kako prekursora, tako kiselog tijesta i njihovog utjecaja na profil arome bezglutenskog kruha.

## 6. LITERATURA

- Ahlborn, G. J., Pika, O. A., Hendrix, S. B., Hess, W. M, Huber, C. S. (2005) Sensory, mechanical and microscopic evaluation of staling in low-protein and gluten-free breads. *Cereal Chem* **82**, 328-335.
- Arendt, E. K., O' Brien, C. M., Schober, T. J., Gallagher, E., Gormley, T. R. (2002) Development of gluten free cereal products. *Farm Food* **12**, 21-27.
- Bácenas, M.E., Haros, M., Rosell, C. M. (2003) *Eur. Food Res. Technol* **218**, 56-61.
- Barbarić, I. (2008) Coeliac disease – a retrospective and prospective view: a Review. *Medicina* **44**, 229-234.
- Barbarić, I. (2008) Diagnostic tests for coeliac disease: Mini-review. *Medicina* **45**, 44-48.
- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Ait-Ameur, L., Fogliano, V. (2008) Characterization of the maillard reaction in bread crisps. *Eur Food Res Technol* **228**, 311–319.
- Caul, J. F., Vaden, A. G. (1972) Flavor of white bread as it ages. *Baker's Dig* **46**, 39-60.
- Cayot, N. (2007) Sensory quality of traditional foods. *Food Chem* **102**, 445-453.
- Chang, C. Y., Chambers, E. (1992) Flavor characterization of breads made from hard red winter wheat and hard white winter wheat. *Cereal Chem* **69**, 556-559.
- Cho, I. H., Peterson, D. G. (2010) Chemistry of bread aroma: a Review. *Food Sci Biotechnol* **19**, 575-582.
- De la Hera, E., Ruiz-Paris, E., Oliete B., Gómez, M. (2012) Studies on the quality of cakes made with wheat-lentil composite flours. *LWT-Food Sci* **49**, 48-54.
- Fasano, A., Catassi, C. (2001) Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* **120**, 636-651.
- Frasse, P., Lambert, S., Levesque, C., Melcion, D., Richard-Molard, D., Chiron, H. (1992) The influence of fermentation on volatile compounds in French bread crumb. *Lebensm Wiss Technol* **25**, 66-70.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., Arendt, E. K. (2003) Crust and crumb characteristics of gluten-free breads, *J Food Eng* **56**, 153-161.
- Ganzle, M., Loponen, J., Gobetti, M. (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci. Technol* **19**, 513–521.

- Grosch, W., Schieberle, P. (1997) Flavour of cereal products: a Review. *Cereal Chem* **74**, 91-97.
- Gujral, N., Freeman, H. J., Thomson, A. B. R. (2012) Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* **18**, 6036-6059.
- Han, J., Janz, J. A. M., Gerlat, M. (2010) Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Res. Int* **43**, 627-633.
- Hansen, A., Hansen, B. (1996) Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Z Lebensm Unters For* **202**, 244-249.
- Hansen, A., Schieberle, P. (2005) Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci Techn* **16**, 85-94.
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., Dickinson, J. R. (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microb* **74**, 2259-2266.
- Heiniö, R. L., Noort, M. W. J., Katina, K., Alam, S. A., Sozer, N., de Kock, H. L., Hersleth, M., Poutanen, K. (2008) Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods: a Review. *Trends Food Sci Tech* **47**, 25-38.
- Jensen, S., Oestdal, H., Skibsted, L. H., Larsen, E., Thybo, A. K. (2011) Chemical changes in wheat pan bread during storage and how it affects the sensory perception of aroma, flavour, and taste. *J Cereal Sci* **53**, 259–268.
- Kadam, M. L., Salve, R. V., Mehrajfatema, Z. M., More, S. G. (2012) Development and evaluation of composite flour for missi roti / chapatti. *Food Proc.Technol* **3**, 134-140.
- Kirchhoff, E., Schieberle, P. (2001) Determination of key aroma compounds in the crumb of a three-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *J Agr Food Chem* **49**, 4304–4311.
- Klarić, F. (prevoditelj) 2010: Priručnik o pekarstvu i slastičarstvu (Bulić I.,ured.), Biblioteka Kruh za život, TIM ZIP doo Zagreb ; Original: Albrecht T., Ehrlinger, HG., Willeke, E., Schild E. (2009) Fachkunde in Lernfeldern, Backer/Backerin, Praxis und Theorie, Fachbuchverlag Panneberg GmbH&Co.KG, Han Gruitzen, Deutschland.



- Kohajdová, Z., Karovicová, J., Magala, M. (2013) Rheological and qualitative characteristics of pea flour incorporated cracker biscuits. *Croat J Food Sci Technol* **5**, 11-17.
- Lotong, V., Chambers, E., Chambers, D. H. (1999) Determination of the sensory attributes of wheat sourdough bread. *J Sens Stud* **15**, 309–326.
- Martinez-Anaya, M. A. (1994) Enzymes in Bread Flavour. *J Agr Food Chem* **44**, 2469-2480.
- Mert, I. D., Campanella, O. H., Sumnu, G., Sahin, S. (2014) Gluten-free sourdough bread prepared with chestnut and rice flour. *FOODBALT*, Jelgava, str. 239-242.
- Molberg, O., Solheim Flaete, N., Jensen, T., Lundin, K. E., Arentz-Hansen, H., Anderson, O. D. (2003) Intestinal T-cell re-sponses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* **125**, 337-344.
- Moroni, A. V., Dal Bello, F., Arendt, E. K. (2009) 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.
- Mrvčić, J., Mikelec, K., Stanzer, D., Križanović, S., Grba, 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.
- Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E., Pedrosa, M. (2012) Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health: a Review. *Phytochem* **11**, 227-244.
- Novotni, D. (2015) Pekarski proizvodi bez glutena, <http://www.pekarskiglasnik.com/pekarstvo/90-pekarstvo-2/pekarske-crtice/94-pekarski-proizvodi-bez-glutena>. Pristupljeno 5. srpnja 2017.
- Pacynski, M., Wojtasiak Zawirska R., Mildner-Szkudlarz, S. (2015) Improving the aroma of gluten-free bread. *Food Sci Techn* **63**, 706-713.
- Pietzak, M. M. (2005) Follow-up of patients with celiac disease: Achieving compliance with treatment. *Gastroenterology* **128**, 135-141.
- Pozo-Bayon, M. A., Guichard, E., Cayot, N. (2006) Flavor Control in Baked Cereal Products. *Food Rev Int* **22**, 335-379.

- Richman, E. (2012) The safety of oats in the dietary treatment of celiac disease. *Proc Nutr Soc* **29**, 1-4.
- Roland, W. S. U., Pouvreau L., Curran, J., van de Velde, F., de Kok, P. M. T (2017) Flavor Aspects of Pulse Ingredients. *Cereal Chem* **94**, 58-65.
- Rosell, C. M., Marco, C. (2008) Rice. U: Gluten free cereal products and beverages, (Arden, E. K., Dal Bello, F., ed.), Elsevier, Amsterdam/Boston/Heidelberg/London/New York/Oxford/Paris/San Diego/San Francisco/Singapore/Sydney/Tokyo, str. 81-96.
- Ruiz, J. A., Quilez, J., Mestres, M., Guasch, J. (2003) Solid-Phase Microextraction Method for Headspace Analysis of Volatile Compounds in Bread Crumb. *Cereal Chem* **80**, 255-259.
- Sessa, D. J., Rackis, J. J. (1977) Lipid-derived flavors of legume protein product. *J. Am Oil Chem* **54**, 468-473.
- Schieberle, P., Grosch, W. (1991) Potent odorants of the wheat bread crumb Differences to the crust and effect of a longer dough fermentation. *Z Lebensm Unters Forsch* **192**, 130-135.
- Schieberle, P., Grosch, W. (1994) Potent odorants of rye bread crust – differences from the crumb and from wheat bread crust. *Z Lebensm Unters Forsch* **198**, 292 – 296.
- Seitz, L. M., Wright, R. L., Waniska, R. D., Rooney, L. W. (1993) Contribution of 2-acetyl-1-pyrroline to odors from wetted ground pearl millet. *J. Agric. Food Chem* **41**, 955-958.
- Shogren, R. L., Mohamed, A. A., Carriere, C. J. (2003) Sensory analysis of wholewheat/soy flour breads. *J Food Sci* **68**, 2141-2145.
- Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratapa, V. M., Singh, V. (2012) Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chem* **131**, 462-468.
- Starčević Čizmarević, N., Mijandrušić-Sinčić, B., Licul, V., Kapović, M., Ristić, S. (2015) Geni i celijakija: Pregledni članak. *Paediatr Croat* **59**, 88-94.

Statistica, v. 12, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA; 2012. Available from: <http://www.statsoft.com>.

Stone, H., Sidel, J. L. (2004) *Sensory Evaluation Practices*, 3. izd., Elsevier Academic Press. San Diego, CA, str. 247-277.

Tack, G. J., Verbeek, W. H., Schreurs, M. W., Mulder, C. J. (2010) The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**, 204-213.

Vučičević Boras, V., Benčević, I., Jurić, H. (2013) Manifestacija celijakije u usnoj šupljini. *Medix* **19**, 232-234.

Williamson, D., Marsh, M. N. (2002) Celiac disease. *Mol Biotechnol* **22**, 293-299.

Zehentbauer, G., Grosch, W. (1998a) Crust Aroma of Baguettes I. Key Odorants of Baguettes Prepared in Two Different Ways. *J Cereal Sci* **28**, 81–92.

Zehentbauer, G., Grosch, W. (1998kb) Crust aroma of baguettes II. Dependence of the concentrations of key odorants on yeast level and dough processing. *J Cereal Sci* **28**, 93–96.