Opis postupka vođenja i karakteristika kiselog tijesta za proizvodnju trajnijih pekarskih proizvoda

Kantoci, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:292275

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Helena Kantoci

OPIS POSTUPKA VOĐENJA I KARAKTERISTIKA KISELOG TIJESTA ZA PROIZVODNJU TRAJNIJIH PEKARSKIH PROIZVODA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić i komentorstvom dr. sc. Snježane Kazazić, više znanstvene suradnice, Institut Ruđer Bošković.

Zahvaljujem svima koji su na neki način doprinijeli izradi ovog rada.

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Jasni Mrvčić na ideji, izdvojenom vremenu, prenesonom znanju, korisnim savjetima i velikoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada. Od srca hvala na motivaciji, razumijevanju i dostupnosti van svih vremenskih okvira.

Zahvaljujem komentorici dr. sc. Snježani Kazazić, višoj znanstvenoj suradnici IRB na izdvojenom vremenu i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada. Također, hvala asistentici Karli Hanousek Čiči, dr. sc. na pristupačnosti, korisnim savjetima te pomoći i uvijek ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvale idu i mojoj drugoj obitelji, mojim prijateljima koji su bili bezvremenska podrška, ljubav i motivacija, koji su vjerovali u mene kada i sama nisam te bili moja pumpa proton.

Najveće hvala mojoj prvoj postavi, majci Katici, ocu Dragi, sestri Kristini i bratu Davoru koji su svih ovih godina bili korak iza mene, čuvajući me te korak ispred mene, pokazujući mi pravi put. Hvala vam na dobronamjernim savjetima, bezuvjetnoj ljubavi, podršci i razumijevanju.

Zadnje i najsrčanije hvala zaručniku Marku koji je u ovim posljednjim, ključnim trenucima studiranja bio neizmjerna podrška, motivacija, ljubav i radost.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioprocesno inženjerstvo

OPIS POSTUPKA VOĐENJA I KARAKTERISTIKA KISELOG TIJESTA ZA PROIZVODNJU TRAJNIJIH PEKARSKIH PROIZVODA

Helena Kantoci, univ. bacc. ing. biotechn.
0058203256

Sažetak: Smatra se da je uvođenje kiselog tijesta u proizvodnju kruha odlučujući korak za postizanje njegove više kvalitete, a onda i širenje upotrebe kiselog tijesta na tržištu. Cilj ovog rada bio je opisati postupak *vođenja* kiselog tijesta pomoću komercijalno dostupne starter kulture i ispitati trajnost kruha proizvedenog njenom primjenom. Kiselim tijestima određivana je pH vrijednost, ukupna titracijska kiselost (TTA) te koncentracija odabranih metabolita UPLC metodom. Broj mikrobnih stanica određivan je nacjepljivanjem na hranjivi agar, dok je antifungalna aktivnost kiselog tijesta određivana disk difuzijskom metodom. Na osnovu spektrometrije masa dokazano je da kultura sadrži bakteriju *Lactiplantibacillus plantarum* i kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Postupkom *vođenja* kiselog tijesta kojim se zadržava 10 % kiselog tijesta kao inokuluma za slijedeću fermentaciju može se održati starter kulturu aktivnom kroz 14 dana prihranjivanja, a kruščići pripremljeni s dodatkom kiselog tijesta u iznosu od 15 % odnosno 30 % na brašno, imali su manje zone kontaminacije u odnosu na kruščiće proizvedene bez kiselog tijesta. Tako se dodatak kiselog tijesta pokazao kao učinkovita prirodna zaštita za inhibiciju rasta plijesni *Penicillium* sp. s obzirom na sposobnost *Lpb*. *plantarum* da sintetizira široki spektar spojeva s antifungalnim djelovanjem.

Ključne riječi: *starter kultura, kiselo tijesto, bakterije mliječne kiseline, fermentacija, antifungalna aktivnost*

Rad sadrži: 69 stranica, 28 slika, 17 tablica, 63 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
Komentor: dr. sc. Snježana Kazazić, v. znan. sur., Institut Ruđer Bošković
Pomoć pri izradi: dr. sc. Karla Hanousek Čiča, asistentica

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. prof. dr. sc. Damir Stanzer (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (mentor)
3. dr. sc. Snježana Kazazić, v. znan. sur., IRB (član)
4. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

DESCRIPTION OF THE LEADING PROCEDURE AND CHARACTERISTICS OF SOURDOUGH FOR THE PRODUCTION OF BAKERY PRODUCTS WITH A LONGER SHELF LIFE

Helena Kantoci, univ. bacc. ing. biotechn.
0058203256

Abstract: It is considered that the introduction of sourdough in the production of bread is a decisive step for achieving its higher quality, and then the expansion of the use of sourdough on the market. The aim of this work was to describe the process of *leading* sourdough using a commercially available starter culture and to examine the durability of bread produced using it. The pH value, total titration acidity (TTA) and the concentration of selected metabolites were determined in sourdough samples using the UPLC method. The number of microbial cells was determined by inoculation on nutrient agar, while the antifungal activity of the sourdough was determined by the disc diffusion method. Based on mass spectrometry, it was proved that the culture contains the bacterium *Lactiplantibacillus plantarum* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The sourdough *leading* procedure, which retains 10 % of the sourdough as an inoculum for the next fermentation, can keep the starter culture active through 14 days of feeding, and the bread roll prepared with the addition of sourdough in the amount of 15 % or 30 % to the flour had smaller contamination zones compared to the bread roll produced without sourdough. In this way, the addition of sourdough proved to be an effective natural protection for inhibiting the growth of *Penicillium* sp. considering the ability of *Lpb. plantarum* to synthesize a wide spectrum of compounds with antifungal activity.

Keywords: *starter culture, sourdough, lactic acid bacteria, fermentation, antifungal activity*

Thesis contains: 69 pages, 28 figures, 17 tables, 63 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.
Mentor: Jasna Mrvčić, PhD, Full professor
Co-mentor: Snježana Kazazić, *Senior Research Associate*
Technical support and assistance: *Karla Hanousek Čiča, assistant*

Reviewers:

1. Damir Stanzer, PhD, Full professor (president)
2. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (mentor)
3. Snježana Kazazić, PhD, Sr. Rsch. Assoc., IRB (member)
4. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended:

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. POVIJEST UPOTREBE KISELOG TIJESTA 2
2.2. PROIZVODNJA KISELOG TIJESTA 4
2.2.1. Mikroflora kiselog tijesta 4
2.2.1.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK) u kiselom tijestu 6
2.2.1.2. Kvasci u kiselom tijestu 7
2.2.1.3. Interakcija između kvasaca i bakterija 8
2.2.2. Fermentacija kiselog tijesta 9
2.2.3. Uvjeti fermentacije 15
2.2.4. Prednosti proizvodnje pekarskih proizvoda s kiselim tijestom 17
2.2.5. Tehnološki procesi u pripremi kiselog tijesta 18
2.2.5.1. Vrste kiselog tijesta (KT) 19
2.3. MIKROBIOLOŠKE PREDNOSTI KRUHA S KISELIM TIJESTOM 21
3. EKSPERIMENTALNI DIO 22
3.1. MATERIJALI 22
3.1.1. Brašno 22
3.1.2. Radni i test mikroorganizmi 22
3.1.3. Ostale sirovine 22
3.1.4. Hranjive podloge 22
3.1.5. Kemikalije i reagensi 24
3.1.6. Uređaji i oprema 24
3.2. METODE RADA 26
3.2.1. Metoda identifikacije mikrobnih vrsta pomoću spektrometrije masa 26
3.2.2. Uzorci kiselog tijesta 28
3.2.3. Priprema i vođenje kiselog tijesta 29
3.2.4. Određivanje fermentacijskih karakteristika kiselog tijesta 30
3.2.4.1. Određivanje pH vrijednosti 30
3.2.4.2. Titracijsko određivanje ukupne kiselosti (TTA) 30
3.2.4.3. Određivanje koncentracije metabolita UPLC metodom 30
3.2.5. Mikrobiološka analiza kiselog tijesta 33
3.2.5.1. Priprema uzoraka decimalnih razrijeđenja za analizu 33
3.2.5.2. Određivanje broja mikroorganizama 33
3.2.6. Ispitivanje antifungalne aktivnosti kiselog tijesta 35
3.2.6.1. Priprema kiselog tijesta i pečenje krušnog tijesta (kruščića) 35

3.2.6.2. Praćenje antifungalne aktivnosti disk difuzijskom metodom 37
4. REZULTATI I RASPRAVA 38
4.1. IDENTIFIKACIJA MIKROBNIH KULTURA U KOMERCIJALNOM STARTERU 38
4.2. ODREĐIVANJE BROJA MIKROOGRANIZAMA KROZ VRIJEME VOĐENJA KISELOG TIJESTA 41
4.3. ODREĐIVANJE FERMENTACIJSKIH KARAKTERISTIKA KISELOG TIJESTA 47
4.3.1. Određivanje pH vrijednosti 47
4.3.2. Titracijsko određivanje ukupne kiselosti (TTA) 51
4.3.3. Određivanje koncentracije metabolita UPLC metodom 54
4.4. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST KISELOG TIJESTA 59
5. ZAKLJUČAK 62
6. LITERATURA 63

1. UVOD

Prema podacima Hrvatske gospodarske komore Hrvati jedu najviše kruha i ostalih pekarskih proizvoda u Europskoj uniji, čak 62 kg po osobi godišnje, dok je prosjek Europske unije 55 kg. Do prije dvadeset godina, kruh se najčešće prodavao u malim pekarnicama u kojima se i proizvodio, ili u prodavaonicama prehranom koje su opskrbljivali lokalni pekari ili veće industrijske pekare. Dolaskom velikih trgovačkih lanaca ovaj trend se promijenio i počeli su se prodavati pekarski proizvodi koji se dopremaju zamrznuti i potom peku u pojedinoj prodavaonici. Svaki peti kruh i većina pekarskih proizvoda uvozi se zamrznuto kao polugotov proizvod i distribuira kroz trgovačke lance te lance pekarnica s pečenjem na prodajnim mjestima. Također, Hrvati najviše konzumiraju bijeli i polubijeli kruh. Navedeni pekarski proizvodi imaju percepciju loše kvalitete i niske nutritivne vrijednosti pa je povećana osviještenost potrošača i želja za kvalitetnijim kruhom dovela do pojave *craft* pekarstva, odnosno majstorskih i zanatskih pekarnica koje nastoje slijediti nove trendove u pekarstvu, koji između ostalog podrazumijevaju npr. tehnologiju proizvodnje bez aditiva te proizvode s funkcionalnim sastojcima.

Craft je zapravo odgovor na masovnu industrijalizaciju u proizvodnji i označava povratak tradicionalnim načinima proizvodnje koji podrazumijevaju korištenje kiselih tijesta. Kiselo tijesto u sebi sadrži bakterije mliječne kiseline i kvasce koji zahvaljujući svom metabolizmu osiguravaju bolju kvalitetu kruha. Smatra se da je uvođenje kiselog tijesta u proizvodnju kruha odlučujući korak za postizanje visoke kvalitete kruha te se ističu određene prednosti proizvodnje pekarskih proizvoda s dodatkom kiselog tijesta (Mrvčić i sur., 2011). Unatoč prednostima upotrebe kiselog tijesta u pekarstvu, ono je u Republici Hrvatskoj tek u začecima, a smatra se da će širenjem majstorskih i zanatskih pekarnica doći do širenja upotrebe kiselog tijesta na tržištu.

Jedan od problema korištenja kiselog tijesta je svakako složeniji proces proizvodnje u usporedbi s korištenjem pekarskog kvasca kao monokulture. Taj proces podrazumijeva razvoj vlastitog startera te njegovo čuvanje, odnosno obnavljanje što znači da je i proces proizvodnje kruha vremenski zahtjevniji, a onda i skuplji. No, proizvođači starter kultura za pekarstvo razvili su starter kulture za kisela tijesta koje proizvođačima kruha olakšavaju proizvodnju pekarskih proizvoda s kiselim tijestima. Cilj ovog rada bio je opisati postupak *vođenja* kiselog tijesta pomoću jedne komercijalno dostupne starter kulture i ispitati trajnost kruha proizvedenog njenom primjenom.

2. TEORIJSKI DIO

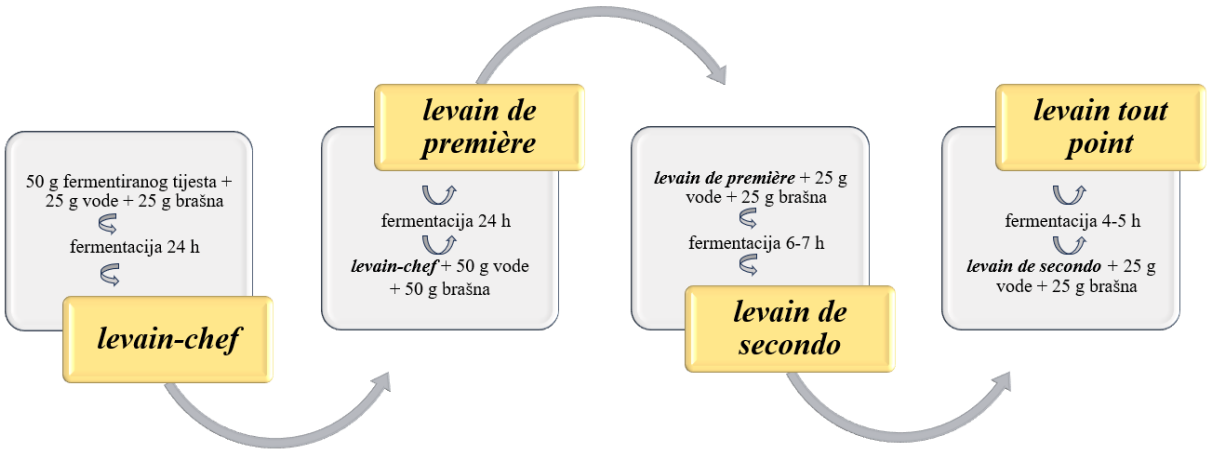
2.1. POVIJEST UPOTREBE KISELOG TIJESTA

Povijest kiselog tijesta i srodnih pekarskih proizvoda prati razvoj ljudske civilizacije od samih početaka agrikulture pa sve do danas. Kruh i drugi pekarski proizvodi kiselog tijesta napravljeni od žitarica objedinjuju različita znanja iz poljoprivrednih praksi, tehnoloških procesa i kulturne baštine (Cappelle i sur., 2013).

Upotreba kiselog tijesta seže daleko u prošlost. Prvi dokumentirani zapisi o proizvodnji i potrošnji kruha od kiselog tijesta datiraju iz 26. stoljeća prije Krista kada Egipćani započinju s upotrebom kiselog tijesta (Cappelle i sur., 2013; Mrvčić i sur., 2011). Tadašnje kiselo tijesto je bilo komad tijesta od prethodnog pečenja koje se dodavalo u novi zamjes s brašnom, soli i vodom (Hansen i Schieberle, 2005). Drugi izvor navodi da su Egipćani iz emmara, drevnog srodnika pšenice, mljevenjem pomoću kamenog mlina dobivali brašno koje su zatim miješali s vodom. Napravljeni zamjes bi se ostavio na spontanoj fermentaciji određeni vremenski period s ciljem dobivanja prirodnog kiselog tijesta. Potom bi se takvom tijestu dodala nova količina brašna i vode koja bi spontano fermentirala te bi se dobiveno prirodno kiselo tijesto peklo u krušnim pećima i spremalo u glinene vrčeve. Poznato je da su uz Egipćane i narodi Mezapotamije, Sumerani, više od 40 % svojih žitarica iskorištavali za proizvodnju kruha iz kojega su kasnije proizvodili pivo (Cappelle i sur., 2013; Grba, 2010). Oko 800 godina prije Krista, znanja o upotrebi kiselog tijesta Grci preuzimaju od Egipćana koji su proizvodili kruh od suhog kiselog tijesta (Cappelle i sur., 2013). Stari Grci su iskoristili proizvodnju vina za proizvodnju kruha na način da su odstajali mošt miješali s pšeničnim posijama, nakon čega se dobivena smjesa sušila na suncu. Nakon sušenja, dio smjese bi se otopio u vodi i miješao s brašnom (Mutak, 2018). Tradicija izrade kruha od kiselog tijesta dalje se širila preko Rimskog Carstva prema dijelovima Europe i ostatku svijeta (Hansen i Schieberle, 2005).

Za vrijeme Srednjeg vijeka dolazi do otvaranja pekarnica u većim europskim gradovima poput Pariza, budući da je do tada pekarstvo bilo svedeno na proizvodnju u kućnoj radinosti. Prema navodima Cappelle i sur. (2013), pariški pekari su proizvodili kisela tijesta miješanjem vode i brašna kroz trostupanjski proces proizvodnje, *travail sur 3 levains* (slika 1). Prvi zamjes vode i brašna se prepuštao spontanoj fermentaciji. Zatim se dijelu tijesta oduzetom od ukupne količine fermentiranog tijesta postepeno povećavao volumen dodavanjem nove količine vode i brašna. Takav zamjes bi se ostavio na fermentaciji jedan dan, nakon čega bi se dobilo kiselo tijesto koje su nazvali *levain-chef*. Dodavanjem 2-3 puta veće količine vode i brašna dobivao se *levain de*

première, a nakon 6-7 sati fermentacije uz prethodni ponovni dodatak vode i brašna nastaje *levain de seconde*. Skraćivanjem vremena fermentacije na 4-5 sati te ponavljanjem postupka dodavanja vode i brašna, u konačnici se dobilo kiselo tijesto naziva *levain tout point* kojemu se posljednji put dodaje određena količina vode i brašna uz fermentaciju od 2 sata. Opisani postupak proizvodnje bio je veoma popularan u Francuskoj kroz 17. stoljeće s obzirom da se njime osiguravala najbolja kvaliteta kruha.



Slika 1. Trostupanjski proces proizvodnje kiselog tijesta, *travail sur 3 levains*, u Francuskoj (*prema* Cappelle i sur., 2013)

Sve do 15. stoljeća kiselo tijesto se dobivalo procesom spontane fermentacije koja se odvijala pomoću kvasaca i bakterija prirodno prisutnih u brašnu. Izdvajanjem kvasca iz tzv. alkoholnih procesa i njegovom primjenom u pekarstvu, spontane fermentacije se napuštaju, a pekarstvo kreće k proizvodnji pekarskog kvasca na melasi i njegovom korištenju u pekarstvu kao monokulture. Zbog skraćenog vremena fermentacije na 30 minuta, pekarski kvasac sve više dominira nad upotrebom kiselih tijesta, koja nakon Drugog svjetskog rata gube na svojoj važnosti i dominantnosti te s vremenom polako padaju u zaborav (Mrvčić i sur., 2011; Poutanen i sur., 2009). Skraćivanjem vremena fermentacije smanjuju se i senzorske karakteristike kvalitete kruha (jače mrvljenje i brže starenje) što je dovelo do sve većeg nezadovoljstva potrošača.

Kritikama i željama potrošača za boljim i kvalitetnijim pekarskim proizvodima, brojni pogoni se vraćaju tradicionalnom načinu izrade kruha pomoću kiselog tijesta i predtijesta. U početku je povratak bio ograničen na proizvodnju kruha od raženog brašna. Danas, zahvaljujući brojnim istraživanjima i naporima u proizvodnji specifičnih i funkcionalnih starter kultura, tehnologija

kiselog tijesta nalazi sve veću primjenu u proizvodnji kruha od pšeničnog brašna. U Republici Hrvatskoj se zadnjih desetak godina pridaje posebna pažnja i interes za sve veći razvoj i primjenu ove tehnologije, dok se u zemljama zapadne Europe već u potpunosti udomaćila (Mrvčić i sur., 2011).

2.2. PROIZVODNJA KISELOG TIJESTA

Kiselo tijesto nastaje fermentacijom brašna i vode uz pomoć bakterija mliječne kiseline (BMK) i metabolički aktivnih kvasaca koji određuju stupanj zakiseljavanja i sposobnost dizanja tijesta (Ferraz i sur., 2021). Navedene karakteristike mikrobnog ekosustava mogu se reaktivirati i optimizirati kroz uzastopna osvježenja (Boyaci-Gunduz i sur., 2022). Pojam osvježenje podrazumijeva tehniku kojom tijesto napravljeno od brašna, vode i ponekad drugih sastojaka spontano fermentira (predtijesto), a naknadno se dodaje kao inokulum za početak fermentacije nove mješavine brašna, vode ili drugih sastojaka (Falciano i sur., 2022). Postupak je potrebno ponoviti nekoliko puta kako bi se u konačnici razvilo kiselo tijesto s pH vrijednošću oko 4. Pojava većih mjehurića plina ugljikovog dioksida na površini tijesta te ugodan, blago kiseli i slatki miris najbolji su pokazatelji dobivanja kiselog tijesta (Hernández-Parada i sur., 2023). Postupak osvježenja potrebno je provoditi i nakon dobivanja kiselog tijesta kako bi se osigurala konstantna metabolička aktivnost mikrobnih kultura (Corsetti, 2013).

2.2.1. Mikroflora kiselog tijesta

Mikrofloru kiselog tijesta čine BMK i kvasci koji su ujedno i dominantni mikroorganizmi, a ponekad mogu biti prisutni i drugi mikroorganizmi poput bakterija octene kiseline (Martín-Garcia i sur., 2023). Mikroorganizmi kiselog tijesta potječu iz brašna žitarica, same pekarske industrije ili se mogu dodati u obliku starter kulture (Aspri i Tsaltas, 2023). Brašno žitarica i ostali sastojci kiselog tijesta nisu sterilni, stoga je mikroflora kiselih tijesta prilično složena, posebice onih koja su spontano fermentirana (Martín-Garcia i sur., 2023). Uz kemijski i mikrobni sastav brašna, na bioraznolikost i varijabilnost broja mikroorganizama u kiselom tijestu utječu i drugi čimbenici kao što su temperatura i vrijeme fermentacije, stupanj hidratacije tijesta, redoks potencijal, vrijeme i dinamika hranjenja startera te temperatura čuvanja kiselog tijesta. Tablica 1 prikazuje neke od mikroorganizama izoliranih iz kiselog tijesta s obzirom na vrstu korištenog brašna (Martín-Garcia i sur., 2023; Lau i sur., 2021).

Tablica 1. Mikroorganizmi izolirani iz kiselog tijesta s različitom vrstom brašna (*prema* Martín-Garcia i sur., 2023; Lau i sur., 2021)

BRAŠNO	BMK	KVASAC
Pšenično	*Fructilactobacillus sanfranciscensis*	*Kazachstania humilis*
	Lactobacillus acidophilus	*Saccharomyces bayanus*
	Levilactobacillus brevis	*Saccharomyces cerevisiae*
	Limosilactobacillus fermentum	*Saccharomyces exiguus*
	Lactiplantibacillus plantarum	*Wickerhamomyces anomalus*
	Latilactobacillus sakei	
	Lactococcus lactis	
	Leuconostoc citreum	
	Pediococcus pentosaceus	
	Weissella cibaria	
Raženo	*Companilactobacillus kimchii*	*Kazachstania humilis*
	Levilactobacillus brevis	*Saccharomyces cerevisiae*
	Limosilactobacillus fermentum	*Wickerhamomyces anomalus*
	Lactiplantibacillus plantarum	
	Lactococcus lactis	
	Weissella spp.	
Pirovo	*Levilactobacillus brevis*	*Saccharomyces cerevisiae*
	Lactiplantibacillus paraplantarum	*Wickerhamomyces anomalus*
	Lactiplantibacillus plantarum	
	Pediococcus pentosaceus	
Kukuruzno	*Enterococcus saccharolyticus*	*Saccharomyces cerevisiae*
	Lactobacillus acidophilus	
	Levilactobacillus brevis	
	Limosilactobacillus fermentum	
Rižino	*Companilactobacillus crustorum*	*Saccharomyces cerevisiae*
	Lactiplantibacillus pentosus	
	Lactiplantibacillus plantarum	

Brojne mikrobiološke analize pokazuju da su BMK dominantni mikroorganizmi kiselog tijesta. Prema navodima Martín-Garcia i sur. (2023), kvantitativni omjer kvasaca i BMK je približno 1:100. BMK sudjeluju u procesu zakiseljavanja tijesta dok kvasci utječu na sposobnost dizanja tijesta opuštanjem CO_2 (Hernández-Parada i sur., 2023). Zbog svoje dominacije, BMK odnosno njihova aktivnost određuje okus, miris, reologiju i nutritivna obilježja kruha proizvedenog od kiselog tijesta (Mrvčić i sur., 2011). Calvert i sur. (2021) navode da je kiselo tijesto pogodno za rast više od 60 vrsta BMK i više od 30 vrsta kvasaca. S napretkom tehnologije i otkrićem novih vrsta BMK ove brojke se mijenjaju pa je zanimljiv podatak da je u 2020. godini evidentirana

čak 261 vrsta BMK koja pripada rodu *Lactobacillus* (Lau i sur., 2021; Zheng i sur., 2020). Iz tog razloga, studija Zheng i sur. (2020) predlaže reklasifikaciju roda *Lactobacillus* što posljedično dovodi do promjene nomenklature nekih vrsta BMK (npr. *Lactobacillus plantarum* je preimenovan u *Lactiplantibacillus plantarum*). U skladu s ovom promjenom, u radu su korišteni novi nazivi vrsta iz roda *Lactobacillus*.

2.2.1.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK) u kiselom tijestu

Zajedničko svojstvo svih BMK je sposobnost proizvodnje velike količine mliječne kiseline iz ugljikohidratnih izvora u procesu fermentacije (Sakandar i sur., 2019). Zbog efekta zakiseljavanja, BMK imaju značajan utjecaj na senzorska i tehnološka svojstva gotovog proizvoda te njegovu trajnost (Martín-Garcia i sur., 2023). Za kiseljenje tijesta koriste se BMK koje potječu iz žitarica ili kontaminacija bilo pekarskog kvasca ili same pekarske odnosno mlinarske industrije. Kao starter kulture u pekarstvu koriste se dvije skupine BMK koje se razlikuju po načinu previranja glukoze (tablica 2):

1. Homofermentativne BMK – Embden-Meyerhof-Parnasovim putem kataboliziraju glukozu gotovo u potpunosti do mliječne kiseline.
2. Heterofermentativne BMK – fosfoglukonatnim putem previru glukozu do mliječne kiseline, CO_2 i octene kiseline ili etanola u ekvimolarnim količinama. Mogu se podijeliti u dvije podskupine, obligatno heterofermentativne BMK i fakultativno heterofermentativne BMK (Sakandar i sur., 2019; Mrvčić i sur., 2011).

Tablica 2. Vrste BMK koje se najčešće nalaze u kiselom tijestu (*prema* Pérez-Alvarado i sur., 2022)

HOMOFERMENTATIVNE BMK	HETEROFERMENTATIVNE BMK	
	OBILAGTNE	FAKULTATIVNE
Companilactobacillus crustorum	*Furfurilactobacillus rossiae*	*Companilactobacillus alimentarius*
Companilactobacillus farciminis	*Fructilactobacillus sanfranciscensis*	*Companilactobacillus paralimentarius*
Lactobacillus acidophilus	*Levilactobacillus acidifarinae*	*Lactiplantibacillus plantarum*
Lactobacillus amylolyticus	*Levilactobacillus brevis*	*Latilactobacillus sakei*
Lactobacillus crispatus	*Limosilactobacillus fermentum*	*Pediococcus pentosaceus*
Lactobacillus delbrueckii	*Limosilactobacillus panis*	
Lactobacillus johnsonii	*Limosilactobacillus pontis*	
Enterococcus durans	*Limosilactobacillus reuteri*	
	Leuconostoc citreum	
	Weissella cibaria	

Homofermentativne BMK proizvode više mliječne kiseline što posljedično dovodi do smanjenja pH vrijednosti i povećanja ukupne titracijske kiselosti (engl. *Total titratable aciditiy*, TTA). Zakiseljavanju tijesta tijekom fermentacije pridonose i heterofermentativne BMK koje su isto tako odgovorne za proizvodnju raznih spojeva arome te jedinstvene karakteristike konačnog proizvoda s kiselim tijestom. Uz kvasce, heterofermentativne BMK također mogu doprinijeti dizanju tijesta proizvodeći manju količinu CO_2, zbog čega je vrlo bitan stabilan kometabolizam BMK i kvasaca (Martín-Garcia i sur., 2023; Sakandar i sur., 2019).

Uzimajući u obzir novu sistematizaciju, u proizvodnji kiselog tijesta najvažnije, a ujedno i najzastupljenije BMK pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructobacillus*, *Levilactobacillus* i *Limosilactobacillus*. Druge vrste BMK koje mogu biti u sastavu kiselog tijesta pripadaju rodovima *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Weissella* (Hernández-Parada i sur., 2023). Kao najčešće BMK izolirane iz kiselog tijesta, Martín-Garcia i sur. (2023) ističu vrste *Lactiplantibacillus plantarum*, *Fructobacillus sanfranciscensis*, *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum* i *Pediococcus pentosaceus* što je i vidljivo iz tablice 1.

2.2.1.2. Kvasci u kiselom tijestu

Kvasci koji čine mikrofloru kiselog tijesta imaju sposobnost prilagodbe na specifične i stresne uvjete stvorene od strane BMK poput niskog pH, visoke koncentracije ugljikohidrata i visoke gustoće stanica (Huys i sur., 2013). Dok se zakiseljavanje povezuje s BMK, kvascima se pripisuje sposobnost dizanja tijesta, ali i sudjelovanje u stvaranju aromatskog profila kiselog tijesta (Martín-Garcia i sur., 2023). Kvasci poboljšavaju okus i miris kruha od kiselog tijesta proizvodnjom metabolita koji znatno pridonose aromi kao što su esteri, aldehidi i acetoin. Drugi spojevi koji nastaju metabolizmom kvasaca poput glutationa, glicerola i pirogrožđane kiseline, doprinose teksturi kruha jačanjem glutenske mreže (Hernández-Parada i sur., 2023).

U kiselom tijestu su prisutne različite vrste kvasaca čiji broj ovisi o okolišu, regiji i tehnološkom procesu (Sakandar i sur., 2019). Kao što je ranije navedeno, više od 30 vrsta kvasaca je izolirano iz kiselog tijesta od kojih su dominatne vrste iz roda *Saccharomyces*, dok je vrsta *Wickerhamomyces anomalus* zabilježena kao dominantna u azijskim zemljama (Martín-Garcia i sur., 2023; Sakandar i sur., 2019). Druge uobičajene vrste kvasca pronađene u kiselom tijestu pripadaju rodovima *Kazachstania* (*Kazachstania humilis*, *Kazachstania exigua*), *Pichia* (*Pichia kudriavzevii*) i *Torulaspora* (*Torulaspora delbrueckii*) (Carbonetto i sur., 2020).

2.2.1.3. Interakcija između kvasaca i bakterija

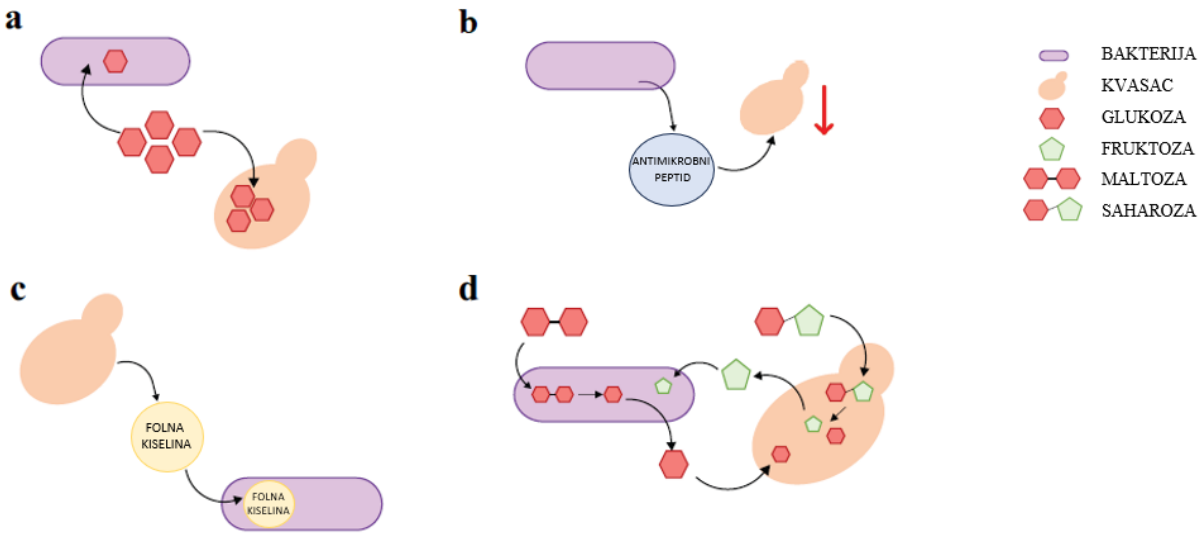
BMK su dominantni mikroorganizmi u kiselom tijestu čiji je broj oko 10^8-10^9 CFU/g, dok je broj kvasaca oko 10^6-10^7 CFU/g (Hernández-Parada i sur., 2023). Dominacija bakterijskih vrsta ovisi i o sastavu supstrata zbog kojega jedna vrsta može antagonizirati ili sinergizirati druge bakterijske vrste proizvodeći razne vrste bakteriocina i antibakterijskih spojeva (Sakandar i sur., 2019). Osim bakterijskih interakcija, vrlo su važne i interakcije između kvasaca i BMK koje su također određene pozitivnim, sinergističkim ili negativnim, antagonističkim efektom jedne vrste na drugu. Martín-Garcia i sur. (2023) navode nekoliko tipova kvasac-bakterija interakcija koje su i prikazane na slici 2:

a) Kompetitivnost – natjecanje mikroorganizama za resurse koji mogu biti fermentabilni ugljikohidrati ili izvori dušika.

b) Amensalizam – jedan mikroorganizam inhibira rast drugog (npr. BMK sintetizira antimikrobni peptid koji inhibira rast kvasca).

c) Komensalizam – jedan mikroorganizam potiče rast drugog s ciljem održavanja metaboličke aktivnosti tijekom fermentacije.

d) Mutualizam (*cross-feeding*) – mikroorganizmi proizvode i međusobno izmjenjuju esencijalne hranjive tvari.

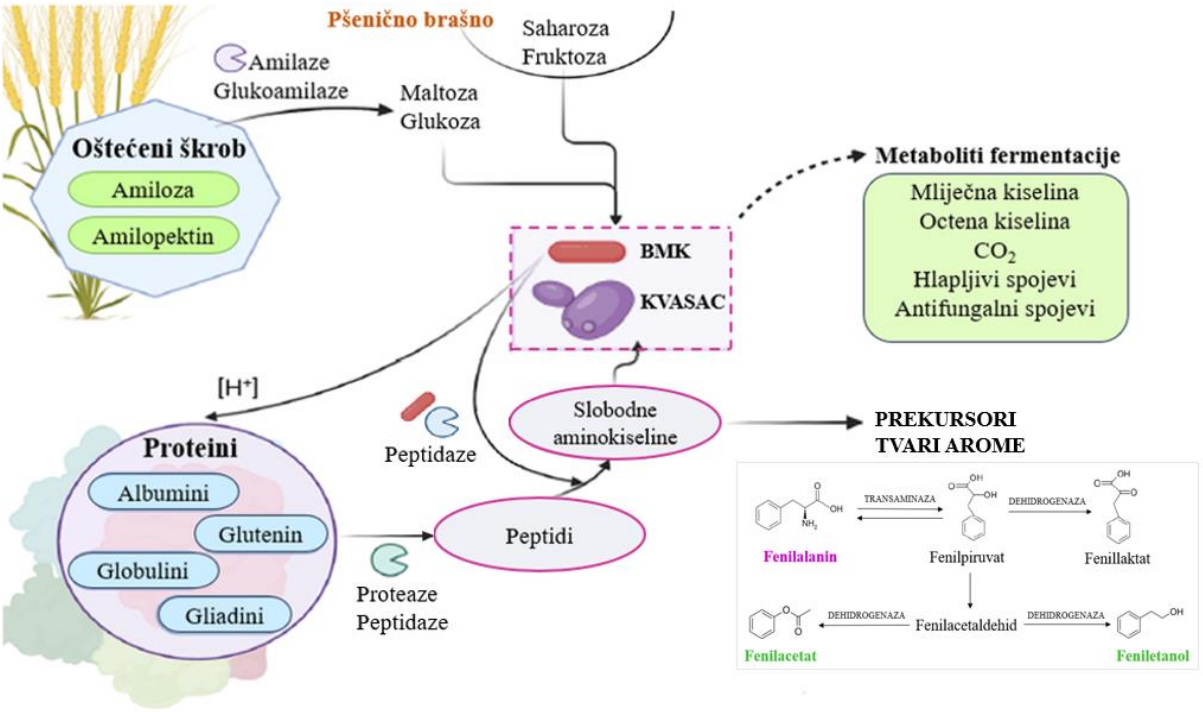


Slika 2. Glavne kvasac-bakterija interakcije u kiselom tijestu;
a – kompetitivnost, b – amensalizam, c – komensalizam, d – mutualizam (*prema* Martín-Garcia i sur., 2023)

Spomenute interakcije posebno su važne prilikom stimulacije ili represije rasta mikroorganizama te povećane ili smanjene ekskrecije određenih metabolita, što u konačnici utječe na gotovi proizvod. Istraživanje Sieuwertsa i sur. (2018) je pokazalo sinergističko i antagonističko djelovanje kvasac-BMK interakcija. Naime, kvasac *S. cerevisiae* proizvodeći CO_2 kao rezultat razgradnje izvora ugljika osigurava anaerobne uvjete što može stimulirati rast BMK poput *Lpb. plantarum* i *F. sanfranciscensis*. S druge strane, *S. cerevisiae* može upotrebljavati mliječnu kiselinu dobivenu metabolizmom BMK što rezultira povećanje pH vrijednosti okoline kiselog tijesta, a onda i veći rast mikrobnih vrsta (Sieuwerts i sur., 2018). Slika 3d prikazuje mutualizam koji se može promatrati na primjeru *F. sanfranciscensis*, BMK sposobne za razgradnju maltoze te kvasaca *K. humilis* (prije *C. humilis*) i *S. exiguus* koji ne mogu asimilirati maltozu. Razgradnjom maltoze dolazi do opuštanja i nakupljanja glukoze u medij čime se kvascima koji nemaju sposobnost razgradnje maltoze osigurava izvor fermentabilnih ugljikohidrata. Na taj način se sprječava gladovanje i iscrpljenost kvaščevih stanica uslijed nedostatka glukoze i hranjivih tvari (Venturi i sur., 2012). Mutualizam se može objasniti i na primjeru saharoze koju kvasci mogu metabolizirati osiguravajući druge izvore ugljika za BMK. C*ross-feeding* mehanizmom se smanjuje konkurencija između mikroorganizama te se stimulira njihov rast (Sieuwerts i sur., 2018). Isto tako, Hernández-Parada i sur. (2023) navode prihranjivanje kiselog tijesta kao rješenje za kompetitivnost između mikroorganizama te nedostatak supstrata.

2.2.2. Fermentacija kiselog tijesta

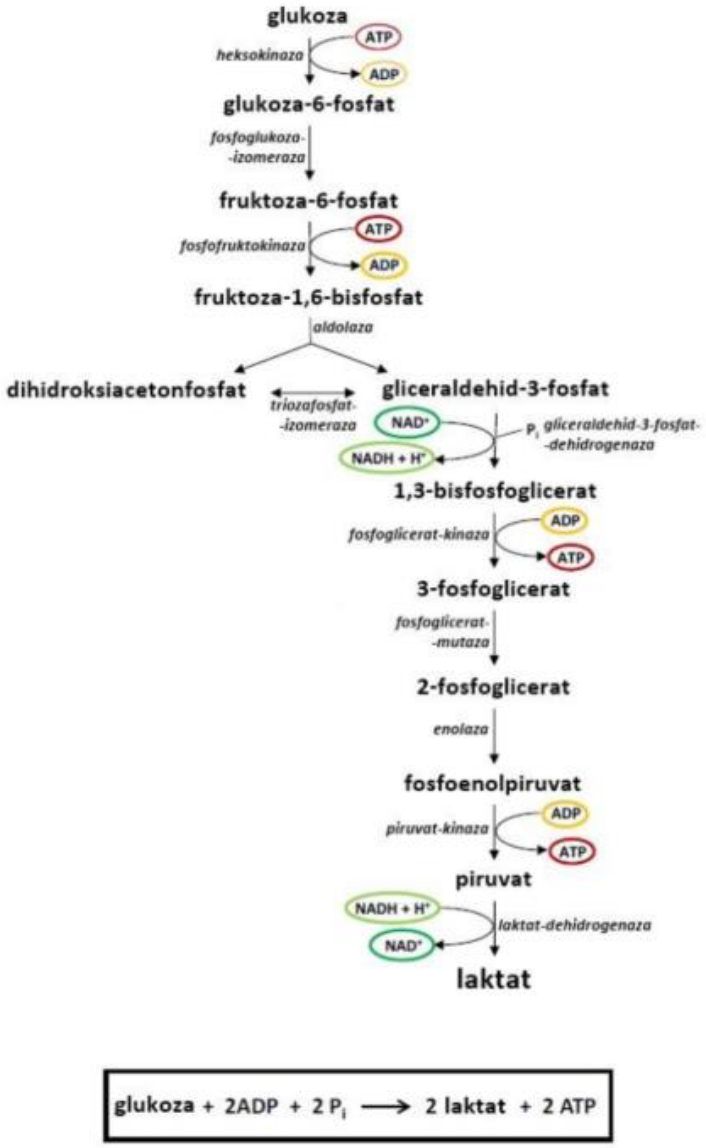
Fermentacija kiselog tijesta je složen proces kojim nastaju promjene u tijestu, a uvjetovan je kombiniranim utjecajima metabolizma BMK i kvasaca (slika 3). Tijekom fermentacije nastaju različite skupine spojeva (kiseline, alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri, fenoli i dr.) među kojima su i spojevi arome odgovorni za jedinstven okus i miris tijesta te antimikrobni spojevi (Akamine i sur., 2023). Brašna žitarica s pH vrijednošću između 5,0 i 6,2 te visokom koncentracijom fermentabilnih ugljikohidrata pogodna su za rast BMK sve dok tijesto ne dosegne približnu pH vrijednost od 4,0. Nakon toga, kvasci otporni na kiselost medija postaju prevladavajući mikroorganizmi u procesu fermentacije (Hernández-Parada i sur., 2023).



Slika 3. Biokemijske promjene u kiselom tijestu za vrijeme fermentacije (*prema* Hernández-Parada i sur., 2023; Gobbetti i sur., 2014)

Za rast i aktivnost mikroorganizama kiselog tijesta potrebni su ugljikohidrati koji potječu iz brašna žitarica. Dostupni izvori ugljikohidrata u kiselom tijestu u najvećoj mjeri su maltoza, saharoza, glukoza i fruktoza, a može se pronaći i maltotrioza te rafinoza (Akamine i sur., 2023). Škrob, jedan od sastojaka brašna, tijekom fermentacije se razgrađuje na glukozu i maltozu pomoću amilaza i glukoamilaza prisutnih u brašnu te α-amilaze i glukoamilaze BMK prisutnih u kiselom tijestu (Mietton i sur., 2022). Maltoza se dalje razgrađuje do glukoze enzimima iz BMK (maltoza fosforilaza) i kvasaca iz roda *Saccharomyces* (maltaza). Tijekom fermentacije BMK i kvasci metaboliziraju i druge složene ugljikohidrate zbog čega dolazi do porasta koncentracije glukoze koju onda mogu koristiti kao supstrat (Akamine i sur., 2023; Mietton i sur., 2022).

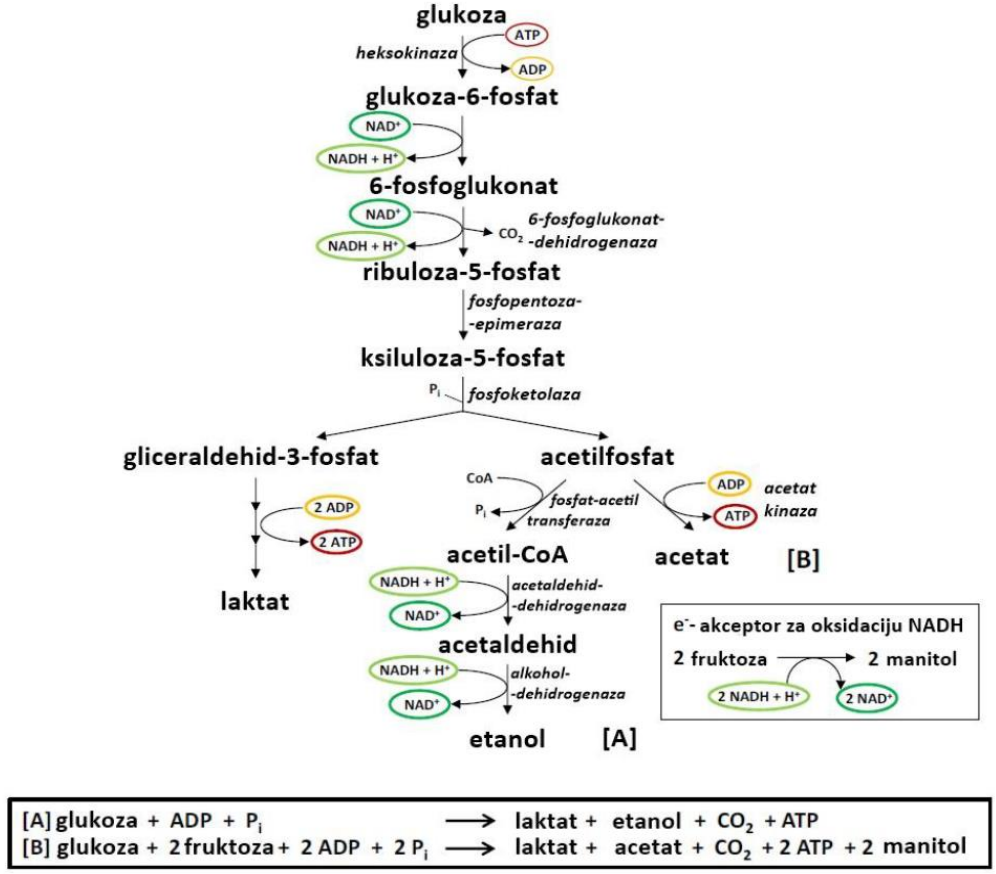
Ovisno o vrsti mikroorganizma koja dalje metabolizira glukozu, postoje dvije glavne vrste fermentacija: mliječna (laktična) fermentacija i alkoholna fermentacija. Kao što je već navedeno, u homolaktičnoj fermentaciji svojstvenoj homofermentativnim BMK, piruvat dobiven razgradnjom glukoze EMP metaboličkim putem reducira se u mliječnu kiselinu (Akamine i sur., 2023; Slika 4). Homolaktičnom fermentacijom se proizvede najmanje 85 % mliječne kiseline iz 100 % glukoze (Sakandar i sur., 2019).



Slika 4. Metabolizam homofermentativnih BMK (*prema* Doenecke i sur., 2005)

S druge strane, heterolaktična fermentacija je karakteristična za heterofermentativne BMK koje ragrađuju glukozu fosfoglukonatnim metaboličkim putem zbog nedostatka enzima karakterističnih za glikolizu (aldolaza i trioza fosfat izomeraza). Uz mliječnu kiselinu, produkti heterolaktične fermentacije su CO_2 te octena kiselina i/ili etanol (slika 5). Osim glukoze, navedenim metaboličkim putevima BMK mogu fermentirati i druge heksoze prisutne u kiselom tijestu poput fruktoze. Pentoze koje nastaju enzimskom hidrolizom pentozana i drugih kompleksnih ugljikohidrata u bijelom i raženom brašnu, također mogu biti metabolizirane fosfoglukonatnim putem (Akamine i sur., 2023; Mietton i sur., 2022; Bintsis, 2018). Poput homofermentativnih BMK, fakultativno heterofermentativne BMK EMP putem kataboliziraju heksoze skoro u potpunosti do mliječne kiseline, uz dodatnu mogućnost razgradnje pentoza do

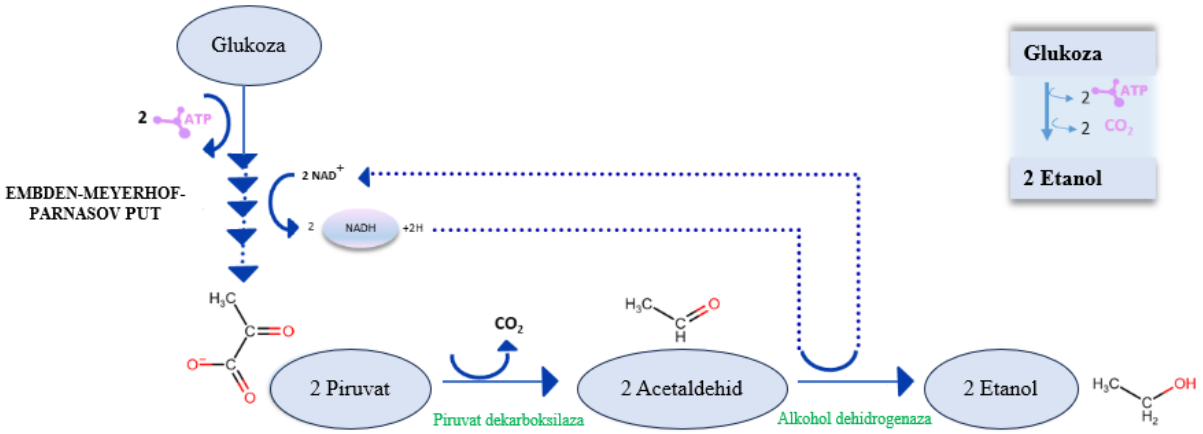
mliječne kiseline i etanola bez proizvodnje CO_2. Fakultativno heterofermentativne BMK imaju ovu sposobnost zbog konstituivne fosfoketolaze čija je sinteza inducirana pentozama, pa će za razgradnju heksoza odabrati EMP put. Shodno tome, fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne BMK određuju različite udjele mliječne i octene kiseline u kiselom tijestu (Gaglio i sur., 2018). Proizvodnjom mliječne (kiselina svježeg mirisa) i octene kiseline (kiselina oštra mirisa), BMK omogućuju zakiseljavanje tijesta te doprinose okusu kruha s kiselim tijestom (Akamine i sur., 2023).



Slika 5. Metabolizam heterofermentativnih BMK (*prema* Goyal, 1999)

Alkoholna fermentacija je povezana s metabolizmom kvasaca. Glukoza se razgrađuje EMP metaboličkim putem do piruvata koji se prvo dekarbokslira opuštanjem CO_2, a onda i reducira u etanol (slika 6). Proizvedeni plin CO_2 povećava volumen kiselog tijesta, pospješuje obradu kiselog tijesta te daje poželjan okus i miris pekarskim proizvodima. Količina proizvedenog CO_2 u kiselom tijestu je u korelaciji s aktivnošću enzima glikolize prisutnih u stanicama kvasca, dok je zadržavanje CO_2 sposobnost brašna (Akamine i sur., 2023). Etanol također utječe na svojstva kiselog tijesta jačajući glutensku mrežu, ali u manjoj mjeri s obzirom da značajna količina ispari

tijekom pečenja pekarskih proizvoda s kiselim tijestom (Pérez-Alvarado i sur., 2022). Prema istraživanju Warburton i sur. (2022), glukoza koju kvasac koristi kao supstrat za glikolizu može biti formirana iz amida pomoću BMK amilaza što je još jedan primjer ranije spomenutih kvasac-BMK interakcija. Uz dizanje tijesta i utjecaj na čvrstoću glutenske mreže, kvasci tijekom fermentacije sintetiziraju brojne tvari arome o kojima je nešto više rečeno u kasnijem dijelu rada (Pérez-Alvarado i sur., 2022).



Slika 6. Alkoholna fermentacija u stanicama kvasca (*prema* Akamine i sur., 2023)

Nakon škroba, drugi glavni sastojak pšeničnog brašna su proteini (Mietton i sur., 2022). Najvažnija proteinska komponenta pšeničnog brašna je gluten koji tijekom pripreme kiselog tijesta veže vodu formirajući glutensku mrežu (Mrvčić i sur., 2011). Brašno žitarica i njegova mikrobiota sadrže proteaze i peptidaze koje hidroliziraju proteine tijekom fermentacije kiselog tijesta (Hernández-Parada i sur., 2023; Slika 3). Sintezom kiselina za vrijeme fermentacije odnosno zakiseljavanjem tijesta snižava se pH vrijednost sa 6,0 na 3,5-4,0. Smanjenjem pH vrijednosti aktiviraju se asparaginske i cisteinske proteaze iz brašna koje su odgovorne za primarnu proteolizu tijekom fermentacije. Kiseli medij također utječe na redukciju disulfidnih mostova proteina glutena što dovodi do njegove depolimerizacije. Posljedično se povećava topivost, a onda i osjetljivost glutena na enzimsku razgradnju (Graça i sur., 2021). U sekundarnoj proteolizi, djelovanjem peptidaza BMK razgrađuju se peptidi pri čemu se oslobađaju aminokiseline. Neki sojevi BMK kiselog tijesta nemaju peptidaze u staničnoj membrani pa ovise o aminokiselinama iz brašna, proteazama iz brašna i njihovom proteolitičkom mehanizmu da bi zadovoljili metaboličke potrebe za dušikom. Nadalje, kvasci iziskuju aminokiseline kao izvor dušika za fermentaciju tijekom koje će u nizu enzimskih

reakcija osigurati glukozu, fruktozu i aminokiseline za sojeve BMK (Hernández-Parada i sur., 2023; Graça i sur., 2021).

Oslobađanje aminokiselina tijekom fermentacije u pozitivnom je odnosu s okusom i mirisom proizvoda od kiselog tijesta, budući da su aminokiseline važni prekursori arome (Mietton i sur., 2022). S trajanjem fermentacije povećava se i koncentracija aminokiselina koje BMK i kvasci prevode u hlapljive aromatske tvari (Thiele i sur., 2002). Ovisno o soju, BMK razgrađuju aminokiseline preko α-keto-kiseline do α-hidroksi-kiseline ili dekarboksilacijom do aldehida, koji se u procesu oksidacije mogu prevesti u karboksilne kiseline. Dobiveni spojevi poput 3-metil maslačne kiseline i fenilacetata važni su za aromu sredine pšeničnog i raženog kruha. S druge strane, djelovanjem kvasaca kiselog tijesta i pekarskog kvasca, aminokiseline se prevode u aroma-aktivne više alkohole pa se tako na primjer iz fenilalanina dobiva feniletanol (Gänzle i sur., 2007).

Poboljšanje aromatskog profila kruha dodatkom kiselog tijesta postiže se i sintezom aromatskih tvari i njihovih prekursora koji su produkti metabolizma mikroflore kiselog tijesta. Jedan od produkata metabolizma ugljikohidrata heterofermentativnih laktobacila je i mirisna tvar acetat. Već je poznato da za vrijeme heterolaktične fermentacije BMK metaboliziraju heksoze i pentoze u laktat, CO_2, etanol i acetat. Dodatkom fruktoze, saharoze, citrata ili uvođenjem kisika u kiselo tijesto, ravnoteža nastajanja produkta pomiče se u smjeru nastajanja acetata (Mrvčić i sur., 2011). Tijekom fermentacije kvasac *Saccharomyces cerevisiae* prevodi 95 % fermentabilnih šećera prisutnih u brašnu do etanola i CO_2. Ostalih 5 % sudjeluje u sekundarnim reakcijama fermentacije gdje se piruvat dobiven glikolizom prevodi u više alkohole, karbonilne spojeve i kratkolančane masne kiseline iz kojih kasnije nastaju aromatski spojevi. Nastajanje 2-feniletanola i 3-metilbutanola u direktnoj je korelaciji s fermentacijskom aktivnošću kvasca, pa se povećanje koncentracije tih spojeva ostvaruje produljenjem fermentacije kiselog tijesta (Pozo-Bayón i sur., 2006).

Uz poželjne tvari arome, u kiselom tijestu se mogu razviti i negativne tvari arome koje se modificiraju pomoću BMK. Slobodne masne kiseline brašna mogu oksidirati u više aldehide koji daju neželjenu aromu kiselog tijesta. Zahvaljujući pojedinim heterofermentativnim BMK nastala količina viših aldehida se reducira u alkohole s pozitivnim aromatskim karakteristikama (Mrvčić i sur., 2011). Prema Mrvčić i sur. (2011), ovim načinom tijekom fermentacije kiselog tijesta dolazi do redukcije aroma negativnih aldehida za čak 85 %.

Uz proces fermentacije, okus i miris proizvoda od kiselog tijesta određeni su i kvalitetom brašna te njihovim samim pečenjem (Mietton i sur., 2022; Mrvčić i sur., 2011).

2.2.3. Uvjeti fermentacije

Niz unutarnjih i vanjskih čimbenika koji utječu na proces fermentacije odražavaju se na rast i metaboličku aktivnost mikroorganizama, a onda i na karakteristike dobivenog kiselog tijesta te kruha od kiselog tijesta (Martín-Garcia i sur., 2023). Prema Martinez-Anaya (2003), unutarnji čimbenici obuhvaćaju sastav korištene mikroflore (vrsta, broj, parametri rasta te enzimska i fermentacijska aktivnost) i svojstva korištenog brašna (sadržaj hranjivih i mineralnih tvari, prisutnost aktivatora rasta, stupanj mljevenja i enzimska aktivnost). S druge strane, vanjski čimbenici podrazumijevaju procesne parametre: temperaturu i vrijeme fermentacije, pH, prinos tijesta, broj i interval osvježenja, korištene radne mikroorganizme te dodatak aditiva poput soli (Ferraz i sur., 2021). Unutarnji čimbenici su uglavnom nepromjenjivi dok su vanjski čimbenici kontrolabilni i njima se usmjerava fermentacija unutar određenih granica. Navedeni čimbenici se mogu kombinirati u različitim odnosima imajući na umu međudjelovanja pojedinih čimbenika (Martín-Garcia i sur., 2023).

- **Tip brašna**

  Različiti tipovi brašna izvor su hrane BMK i kvascima kiselog tijesta. Sadrže hranjive tvari, uglavnom ugljikohidrate i aminokiseline koje su esencijalne za rast i metaboličku aktivnost mikroorganizama kiselog tijesta (Hernández-Parada i sur., 2023). Tamnija brašna sadrže znatno veću količinu posija i topljivih šećera pa im se često daje prednost u zakiseljavanju u odnosu na bijela brašna. Isto tako, tamnija brašna (primjerice tip 850 i tip 1100) sadrže veći udio pepela koji je povezan s intenzivnijim rastom mikroorganizama i proizvodnjom metabolita fermentacije (Mrvčić i sur., 2011).
- **Prinos kiselog tijesta (engl. *dough yield, DY*) i pH**

  Tekstura kiselog tijesta može varirati ovisno o dodanoj količini vode u zamjes s brašnom (Falciano i sur., 2022). Prinos tijesta podrazumijeva omjer brašna i vode s obzirom na 100 g korištenog brašna. Veća DY vrijednost je povezana s većom količinom dodane vode pa se razlikuju tekuća (DY>300), polutekuća (DY između 200-300) i pastozna tijesta (DY<160). Prinos kiselog tijesta je u korealciji s pH vrijednošću kiselog tijesta. Naime, voda aktivira proteolitiče enzime pa veći udio vode u kiselom tijestu ubrzava nastajanje kiselina (Hernández-Parada i sur., 2023). Martín-Garcia i sur. (2023) navode da tekuća kisela tijesta imaju niže koncentracije organskih kiselina i niže TTA vrijednosti, ali je stupanj zakiseljavanja brži i intenzivniji. Za razliku od njih, kod

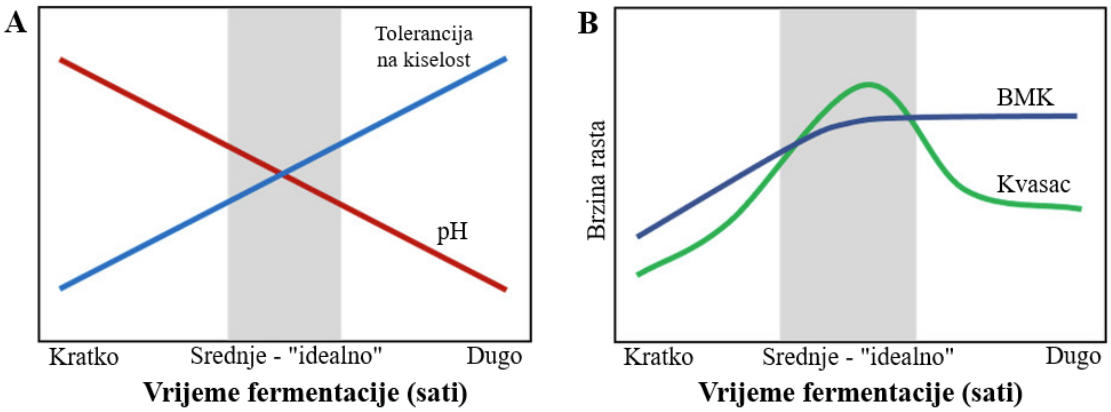
pastoznih kiselih tijesta su zabilježene više TTA vrijednosti, veća koncentracija organskih kiselina, naročito octene kiseline i niži stupanj zakiseljavanja.

- **Temperatura fermentacije**

  Temperatura je jedan od glavnih čimbenika koji utječe na mikrofloru kiselog tijesta, budući da mikroorganizmi imaju različite optimalne temperature rasta. Općenito, niže temperature (25-28 °C) pozitivno utječu na rast i metaboličku aktivnost kvasaca što rezultira većom proizvodnjom etanola, CO_2 i spojeva arome. Više temperature (≥ 30°C) će pogodovati metabolizmu BMK s utjecajem na omjer nastale mliječne i octene kiseline, a onda i na stupanj zakiseljavanja tijesta (Martín-Garcia i sur., 2023). Brojna istraživanja kiselog tijesta pokazala su 30 °C kao optimalnom i najčešće primijenjenom temperaturom fermentacije.

- **Vrijeme fermentacije**

  Odabir vremenskog trajanja fermentacije odražava se na razvoj stupnja kiselosti, moć dizanja tijesta i broj stanica mikroorganizama u kiselom tijestu odnosno starteru (Hernández-Parada i sur., 2023). Calvert i sur. (2021) su predložili model "idealnog" vremena fermentacije u kojemu kiselo tijesto postiže ravnotežu između kiselosti i rasta mikroorganizama, optimizirajući sposobnost dizanja tijesta i senzorska svojstva (slika 7). Skraćivanje "idealnog" vremena fermentacije nepovoljno se odražava na aromu, teksturu i trajnost kruha od kiselog tijesta, dok njegovo produljenje rezultira kiselijim i trpkijim okusom (Calvert i sur., 2021).



Slika 7. "Idealno" vrijeme fermentacije uspostavlja ravnotežu između pH i selekcije mikroorganizama otpornih na kiseline (A) te omogućuje BMK i kvascima postizanje optimalne brzine rast (B) (*prema* Calvert i sur., 2021)

- **Osvježenje**

  Osim trajanja fermentacije, tijekom pripreme kiselog tijesta potrebno je razmotriti i dinamiku osvježenja kiselog tijesta. S povećanjem koraka osvježenja okolina kiselog tijesta postaje selektivnija što rezultira dominacijom određenih vrsta, ponajprije heterofermentativnih BMK. Učestalost osvježenja također se odražava na stabilnost i rast mikroorganizama te stupanj zakiseljavanja tijesta (Martín-Garcia i sur., 2023).

2.2.4. Prednosti proizvodnje pekarskih proizvoda s kiselim tijestom

Optimizacija procesnih parametara omogućuje proizvodnju aktivnog kiselog tijesta koje se može upotrijebiti za proizvodnju kruha poboljšanih tehnoloških, organoleptičkih, mikrobioloških, nutritivnih i zdravstvenih karakteristika (Mrvčić i sur., 2011). Kruh s dodatkom kiselog tijesta u usporedbi s direktno proizvedenim kruhom ima bolju teksturu, aromu i nutritivni profil te duži rok trajanja (Poščić i Karagić, 2023).

Protein gluten je odgovoran za teksturu i volumen kruha zbog svojstva zadržavanja CO_2 koji nastaje kao produkt metabolizma kvasaca. Zakiseljavanjem tijesta uvode se promjene u reologiju tijesta zbog povećane topljivosti glutena u kiselom mediju (Siepmann i sur., 2018). Posljedice reoloških promjena su elastičnije, stabilnije i obradivije tijesto čime se dobiva kruh bolje teksture i većeg volumena. Shodno tome, sredina kruha s kiselim tijestom je čvršća, elastičnija i manje mrvljiva, pa je smanjena migracija vode iz sredine kruha prema kori koja dulje vrijeme ostaje hrskava. Zakiseljavanje tijesta pozitivno se odražava i na svježinu te trajnost kruha. Zbog prisutnosti kiselog medija, brzina retogradacije amilopektina, enzima odgovornog za starenje sredine kruha se smanjuje, a time i produljuje svježina kruha (Mrvčić i sur., 2011). Osim toga, neki rodovi BMK kiselog tijesta imaju sposobnost proizvodnje raznih vrsta egzopolisaharida koji u tijestu djeluju jednako kao i sastojci aditiva, hidrokoloidi. Njihovo djelovanje se očituje poboljšanim vezanjem vode u tijestu, što povoljno utječe na teksturu, volumen, svježinu i trajnost kruha (Lau i sur., 2021).

Primjena tehnologije kiselog tijesta u pekarskoj industriji pozitivno utječe na mikrobiološke i organoleptičke karakteristike gotovog proizvoda. Mikrobiološke karakteristike kiselog tijesta odnosno kruha o kojima će više biti rečeno u idućem poglavlju rada, proizlaze iz antimikrobnog djelovanja BMK koje sprječava proces kvarenja, a time i produljuje trajnost kruha s dodatkom kiselog tijesta (Lau i sur., 2021). Za organoleptička svojstva kruha s kiselim tijestom zaslužen je stabilan kometabolizma BMK i kvasaca tijekom fermentacije te proces pečenja (Siepmann i sur., 2018). Tijekom fermentacije kiselog tijesta, oslobađanjem i konverzijom aminokiselina

nastaju alkoholi, kiseline, aldehidi, ketoni i esteri koji doprinose aromi sredine kruha. S druge strane, procesom pečenja u Maillardovoj reakciji iz aminokiseline ornitin nastaje 2-acetil-1-pirolin, ključna tvar arome kore pšeničnog kruha (Mrvčić i sur., 2011).

Uz spomenuta pozitivna djelovanja kiselog tijesta, zadnjih desetak godina brojna istraživanja naglašavaju nutritivne te zdravstvene vrijednosti pekarskih proizvoda s kiselim tijestom (Graça i sur., 2021; Lau i sur., 2021). Već spomenuti kiseli medij utječe na topljivost glutena i povećanje aktivnosti enzima odgovornih za razgradnju škroba pa je jedna od najvećih prednosti ovih proizvoda njihova lakša probavljivost (Pérez-Alvarado i sur., 2022). Lau i sur. (2021) povezuju modifikaciju škroba s nižim glikemijskim indeksom pekarskih proizvoda fermentiranih kiselim tijestom. Nadalje, Pérez-Alvarado i sur. (2022) ističu važnost aktivnosti proteaza za smanjenje koncentracija cerealnih alergena u kruhu što rezultira smanjenjem alergijskih reakcija povezanih sa žitaricama. Cjelovite žitarice su važan izvor mineralnih tvari (kalcij, kalij, magnezij, željezo, cink), no u prisutnosti fitinske kiseline koja je prirodno prisutna u zrnu žitarica, njihova biološka raspoloživost se smanjuje. Zakiseljavanje tijesta pogoduje razgradnji fitinske kiseline što se pozitivno odražava na bioraspoloživost minerala, a time i nutritivnu vrijednost kruha (Siepmann i sur., 2018). Prema navodima Hugenholtza i Smida (2002), neki sojevi BMK imaju sposobnost sinteze vitamina niacina i riboflavina, dok drugi izvor spominje važnost kvasaca u povećanju njihove koncentracije čime se doprinosi nutritivnoj i zdravstvenoj vrijednosti kruha (Pérez-Alvarado i sur., 2022). Novije studije pokazuju prisutnost bioaktivnih spojeva poput antikancerogenih, imunomodularnih i protuuplanih peptida u proizvodima na bazi kiselog tijesta (Graça i sur., 2021).

2.2.5. Tehnološki procesi u pripremi kiselog tijesta

Postoji niz postupaka za vođenje procesa proizvodnje kiselog tijesta. Postupci se razlikuju po svojoj recepturi koja uključuje:

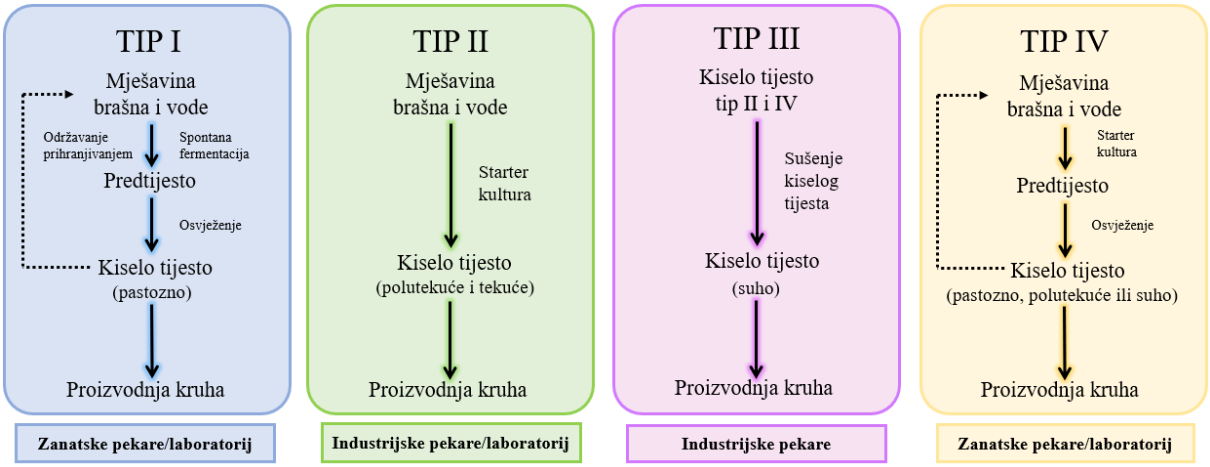
- omjer sirovina koje ulaze u sastav kiselog tijesta
- korištene mikroorganizame (pekarski kvasac i/ili starter kultura)
- vrijeme trajanja
- temperaturne uvjete
- puno znanja i radnog iskustva.

Proizvodnja se može provoditi ručno u plastičnim posudama ili posudama za zamjes te uz pomoć automatizirane tehnologije, u fermentoru. Proizvodnja kiselog tijesta od pšeničnog brašna najčešće se odvija jednostupanjskom metodom, dok se višestupanjska metoda najviše

primjenjuje u proizvodnji raženog kiselog tijesta. Kod proizvodnje pšeničnog kiselog tijesta jednostupanjskom metodom fermentacija traje od 15 do 20 sati. Ukoliko se proizvodnja odvija dvostupanjskom metodom, fermentacija se odvija u trajanju između 18 i 23 sata, a preporučeno doziranje kiselog tijesta u glavni zamjes je 10 % na brašno. Kiselo tijesto se može proizvoditi tradicionalnim postupkom odnosno spontanom fermentacijom ili dodatkom komercijalnih starter kultura koje obavezno sadrže jednu ili više vrsta BMK, dok određene vrste kvasaca mogu i ne moraju sadržavati. Broj mikroorganizama u starter kulturi mora biti veći u odnosu na broj u brašnu kako bi se postigla dominantnost odabrane kulture. Pri proizvodnji pšeničnog kiselog tijesta upotrebom komercijalne starter kulture, preporučeno doziranje startera je 1 % na brašno (Mrvčić i sur., 2011).

2.2.5.1. Vrste kiselog tijesta (KT)

Broj, raznolikost i održivost vrsta mikroorganizama u kiselom tijestu ovisi o vrsti brašna i odabiru tehnoloških parametara (Corsetti i Settanni, 2007). S obzirom na korištenu tehnologiju proizvodnje kiselog tijesta, slika 8 prikazuje 4 vrste odnosno tipa kiselog tijesta: Tip I, Tip II, Tip III i Tip IV (Hernández-Parada i sur., 2023).



Slika 8. Shematski prikaz proizvodnje različitih tipova kiselog tijesta (*prema* Hernández-Parada i sur., 2023; Martín-Garcia i sur., 2023)

- **Tip I (pastozno KT)**

  Kiselo tijesto se proizvodi ranije opisanim tradicionalnim postupkom u kojemu se mješavina brašna i vode prepušta spontanoj fermentaciji na temperaturi između 20 i 30 °C. Ovaj tip kiselog tijesta karakterizira ekvivalentan omjer brašna i vode te

kontinuirana osvježenja na dnevnoj bazi, s ciljem održavanja mikroorganizama u aktivnom stanju. U praksi se provode 3 serije osvježenja svaka 24 sata čime se dobiva kiselo tijesto za pečenje (Hernández-Parada i sur., 2023; Calvert i sur., 2021).

- **Tip II (polutekuće i tekuće KT)**

  Spontanim razmnožavanjem bakterija i kvasaca u tijestu potencijalno dolazi do rasta i neželjenih mikroorganizama koji su prirodno prisutni u tijestu. Nadalje, brašno nije sterilno i u njemu mogu biti prisutni mikroorganizmi koji fermentaciju usmjeravaju u neželjenom smjeru. Iz tog razloga u većini pogona se primjenjuje tip II kiselog tijesta, čija je glavna karakteristika dodatak komercijalne starter kulture definiranog sastava u mješavinu brašna i vode (Mrvčić i sur., 2011). Tip II vrsta kiselog tijesta naziva se još i industrijski tip tijesta te se prepušta fermentaciji na temperaturi višoj od 30 °C u trajanju od 2-5 dana (Corsetti i Settanni, 2007). Više temperature pomiču ravnotežu u smjeru veće produkcije mliječne kiseline pa takva kisela tijesta imaju pH niži od 3,5 te daju aromatičan i snažan okus kruha. Još jedna važna karakteristika ovog tipa kiselog tijesta je visoki prinos tijesta što ga čini pogodnim za industrijsku primjenu zbog lakog prepumpavanja (Mrvčić i sur., 2011).

- **Tip III (suho KT)**

  Kiselo tijesto tipa III proizvodi se tradicionalnim postupkom ili uz dodatak starter kulture, nakon čega se procesom sušenja dobiva suho tijesto u obliku praha (Hernández-Parada i sur., 2023). Prednosti ove vrste su produljena trajnost, jednostavna i praktična upotreba te standardizacija kvalitete pekarskog proizvoda pripremljenog s ovakvim tipom kiselog tijesta (Calvert i sur., 2021). S druge strane, osjetljivost starter kulture odnosno BMK na sušenje kao i visoka cijena postupka smatraju se nedostacima ovog tipa kiselog tijesta (Hernández-Parada i sur., 2023).

- **Tip IV (pastozno, polutekuće i suho KT)**

  Ova vrsta kiselog tijesta je kombinacija tipa I i tipa II kiselog tijesta; započinje fermentacijsku aktivnost uz dodatak starter kulture, a razmnožava se kroz serije osvježenja sve dok se ne razvije zrelo kiselo tijesto (Martín-Garcia i sur., 2023). Ovisno o prinosu tijesta može biti u sva tri oblika: pastoznom, polutekućem i suhom. Rast i aktivnost mikrobnih vrsta startera ovisi o vrsti i kvaliteti brašna, fermentacijskim uvjetima te interakcijama s autohtonom mikrobiotom. Nakon izvršene prirodne selekcije između autohtonih mikrobnih vrsta i onih u starteru, mikroflorom kiselog tijesta dominiraju sojevi koji su prilagođeni okolini kiselog tijesta, a ujedno imaju sposobnost vođenja fermentacije (Hernández-Parada i sur., 2023). Vrste BMK i

kavasaca izolirane iz ovog tipa tijesta su: *Lim*. *fermentum*, *Lpb*. *plantarum*, *F*. *sanfranciscensis*, *Lc*. *mesenteroides*, *W*. *confusa*, *S*. *cerevisiae*, *C*. *humilis* i *W*. *anomalous* (Martín-Garcia i sur., 2023). Kiselo tijesto tip IV najčešće je izabrano za laboratorijska istraživanja (Hernández-Parada i sur., 2023) pa je ova vrsta kiselog tijesta upotrijebljena za istraživanje u ovom radu.

Za razliku od tipa I kiselog tijesta, tipovi II i III zahtijevaju dodatak pekarskog kvasca kao sredstvo za dizanje tijesta zbog inhibicije rasta prirodno prisutnih kvasaca uslijed zakiseljavanja (Harth i sur., 2016). Zadnjih godina, tekuća kisela tijesta imaju sve veću primjenu u pekarskoj industriji, između ostalog, zbog lakše kontrole parametara fermentacije te mogućnosti proizvodnje kiselog tijesta u velikom mjerilu (Pérez-Alvarado i sur., 2022).

2.3. MIKROBIOLOŠKE PREDNOSTI KRUHA S KISELIM TIJESTOM

Mikrobno kvarenje je glavni ograničavajući faktor trajnosti krušnih proizvoda koji se negativno odražava na ekonomiju pekarske industrije, ali i samih potrošača (Stanzer i sur., 2017). Kao glavne uzročnike kvarenja kruha, Lau i sur. (2021) navode plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia* i *Fusarium*, dok drugi izvor spominje i bakterije iz roda *Bacillus* (Siepmann i sur., 2018). Tijekom fermentacije kiselog tijesta BMK proizvode različite organske kiseline (mliječna, 3-fenilmliječna, octena, kapronska, valerijanska) koje snižavaju pH vrijednost i na taj način smanjuju razvoj patogena. Isto tako produciraju i spektar drugih spojeva s antimikrobnim djelovanjem poput vodikovog peroksida, ugljikovog dioksida, cikličkih dipeptida, kratkolančanih masnih kiselina, bakteriocina i bakteriocinima slične inhibitorne spojeve (Sakandar i sur., 2019, Siepmann i sur., 2018). Kod nekih vrsta BMK zabilježena je i proizvodnja reutericiklina, antibiotika s bakteriostatskim i baktericidnim djelovanjem prema Gram-pozitivnim bakterijama koje su uzročnici nitavog kvarenja kruha (Martín-Garcia i sur., 2023). Većina rodova BMK ima antibakterijsko djelovanje, dok samo pojedine vrste ispoljavaju inhibitorsko djelovanje prema plijesnima (Sakandar i sur., 2019). Primjer takvih vrsta je *Lpb*. *plantarum* i *P*. *pentosaceus* koje su u istraživanje Stanzer i sur. (2017) pokazale jako inhibicijsko djelovanje vrste prema plijesnima *Penicillium* sp. i *Aspergillus niger*.

Zahvaljujući sniženju pH vrijednosti te antifungalnom i antibakterijskom djelovanju BMK brojne pekarske industrije uvode tehnologiju kiselog tijesta u svoje pogone kao prirodnu alternativu brojnim kemijskim konzervasima za očuvanje svježine i duže trajnosti proizvoda (De Vero i sur., 2021). U pekarstvu se obično koristi propionska kiselina za produženje trajnosti proizvoda, pa se uz dodatak kiselog tijesta ovaj aditiv može izbjeći (Sakandar i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Brašno

Korištena brašna u ovom radu su pšenična brašna tipova T-550 i T-850 proizvođača Granolio d.d., Zagreb.

3.1.2. Radni i test mikroorganizmi

- **Starter kultura**
  Za pripremu uzoraka kiselog tijesta korištena je komercijalna starter kultura u liofiliziranom obliku. Sastav starter kulture određen je pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije (poglavlje 3.2.1.).

- **Kvasac**
  Za pripremu krušnog tijesta (kruščića) upotrijebljen je instant suhi pekarski kvasac di-go u obliku granula koji sadrži kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Plijesan**
  Za ispitivanje antifungalne aktivnosti kiselog tijesta korištene su spore plijesni *Penicillium* sp. uzete iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.3. Ostale sirovine

- Destilirana voda – proizvedena na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu.
- Kuhinjska sol – sitna morska, proizvođač Solana Pag, Hrvatska.
- Šećer – konzumni šećer, proizvođač Viro tvornica šećera d.d., Hrvatska.

3.1.4. Hranjive podloge

Za uzgoj i određivanje broja BMK u uzorcima kiselih tijesta korišten je:

- MRS (Man-Rogosa-Sharpe) agar čiji je sastav definiran tablicom 3.
- MRS bujon istog sastava kao MRS agar, ali bez dodatka agara.

Za uzgoj i određivanje broja kvasaca u uzorcima kiselih tijesta korišten je Mueller-Hinton agar, MHA (Biolife, Italija) čiji je sastav definiran tablicom 4.

Tablica 3. Sastav MRS (Man-Rogosa-Sharpe) hranjive podloge za BMK

SASTOJCI	g/L
Glukoza	20
Mesni ekstrakt	10
Kazein hidrolat	10
Kvaščev ekstrakt	10
Kalijev hidrogenfosfat	5
Amonijev citrat	2
Natrijev acetat	2
$MnSO_4$ x 4 H_2O	0,05
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,1
Tween 80	1
Agar	20
Destilirana voda	-

Priprema MRS hranjivih podloga: sastojci MRS-a pomiješaju se s agarom u određenim količinama. Pomiješani sastojci se otope u 1 L destilirane vode te sterilizaraju u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije slijedi hlađenje i izlijevanje MRS podloga u sterilne Petrijeve zdjelice. Za vrijema izlijevanja zdjelica se rotira po radnoj plohi radi ravnomjerne raspodijele podloge unutar zdjelice. Tako pripremljene MRS podloge prolaze proces hlađenja i skrućivanja nakon čega su spremne za korištenje. MRS bujon se priprema miješanjem sastojaka navedenih u tablici 3, izuzev agara. Sastojci se otope u 1 L destilirane vode nakon čega se steriliziraju na 121 °C tijekom 15 minuta.

Tablica 4. Sastav MHA (Mueller-Hinton agar) hranjive podloge za kvasce

SASTOJCI	g/L
Mesni ekstrakt	2
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17
Glukoza	20
Destilirana voda	-

Priprema MHA hranjive podloge: 38 g MHA otopi se u 1 L destilirane vode. Otopina se zagrijava do potpunog otapanja sastojaka, nakon čega se sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Zatim slijedi hlađenje na oko 55 °C te izlijevanje MHA podloge u sterilne Petrijeve zdjelice. Prilikom izlijevanja, zdjelica se rotira po radnoj površini kako bi se postigla ravnomjerna raspodijela podloge. Nakon procesa hlađenja i skrućivanja, pripremljena MHA podloga može se koristiti za rast kvasaca.

3.1.5. Kemikalije i reagensi

Sve korištene kemikalije za eksperimentalni dio rada su visoke analitičke čistoće (p.a.). Pri radu su korištene slijedeće kemikalije:

- 0,1 mol/L otopina natrijevog hidroksida, proizvođač: Kemika, Hrvatska
- 0,0025 mol/L otopina sumporne kiseline, proizvođač: Merk, Njemačka
- 1 %-tna otopina oksitetraciklina (OTC), proizvođač: Sigma-Aldrich, SAD
- 0,0001 %-tni cikloheksimid, proizvođač: Sigma, Njemačka
- 96 %-tni etanol, proizvođač: Kemika, Hrvatska
- 70 %-tna mravlja kiselina, proizvođač: Fisher Chemical, SAD
- acetonitril, proizvođač: Fisher Chemical, SAD
- α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina, proizvođač: Bruker Daltonik, Njemačka
- otopina Carezz I (0,085 mol/L otopina kalijeva heksacijanoferata (II) trihidrata), proizvođač: Kemika, Hrvatska
- otopina Carezz II (0,25 mol/L otopina cinkova sulfata heptahidrata), proizvođač: Kemika, Hrvatska
- sterilna voda
- destilirana voda.

3.1.6. Uređaji i oprema

Za eksperimentalni dio rada korišteni su slijedeći uređaji i oprema:

Uređaji

- analitička vaga BP-210-S, proizvođač: Sartorius, Hrvatska
- tehnička vaga KB1200-2N, proizvođač: Kern, Njemačka
- pH-metar Lab 855, proizvođač: SI Analytics, Njemačka
- termostat EBT, proizvođač: Termo medicinski aparati Bodalec i Havoić, Hrvatska
- termostat BTES, proizvođač: Termo medicinski aparati Bodalec i Havoić, Hrvatska

- autoklav, proizvođač: Sutjeska, Srbija
- vorteks MS 3 D S000, proizvođač: IKA, SAD
- Bunsenov plamenik, proizvođač: O.M.M., Italija
- mikrobiološki zaštitni kabinet, proizvođač: Klimaoprema, Hrvatska
- fermentacijska komora GS1 ED 60/40 0600_A-BJDBA, proizvođač: Weisheu, Njemačka
- etažna peć Typ EB 064-320 IS 600, proizvođač: Weisheu, Njemačka
- uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti, UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, proizvođač: Santa Clara, SAD
- centrifuga Centric 200R, proizvođač: Domel, Slovenija
- spektrometar masa Microflex LT, proizvođač: Bruker Daltonik, Njemačka
- hladnjak sa zamrzivačem, proizvođač: Končar, Hrvatska
- ručni mikser, proizvođač: Tefal, Francuska.

Oprema

- laboratorijske čaše i menzure
- stakleni štapić i lijevak
- okrugle tikvice s ravnim dnom
- metalne špatule, žlice, pincete
- metalna balonska mutilica
- bireta, pipete i propipete
- automatske pipete
- kivete po Eppendorfu
- pipetmani
- kapaljka
- silikonski kalupi
- papir za pečenje
- lim za pečenje
- nož za rezanje kruha
- Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm)
- štapić po Drigalskom
- staklene vijalice
- male staklene bočice
- filter papir

- najlonski filter (0,2 μm)
- šprica
- tronožac
- sterilni diskovi (6 mm)
- kolona Rezex ROA-Organic Acid H+ (15 cm x 7,2 mm), proizvođač: Phenomenex, SAD.

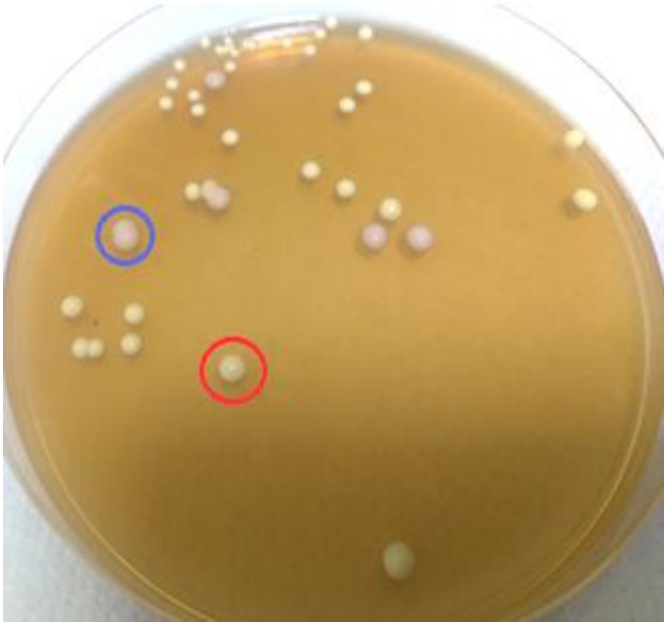
3.2. METODE RADA

3.2.1. Metoda identifikacije mikrobnih vrsta pomoću spektrometrije masa

U svrhu određivanja sastava starter kulture uzete za fermentaciju upotrijebljen je matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja – analizator masa s vremenom leta (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight; MALDI-TOF) spektrometar masa Microflex LT™. Ovaj specijalizirani uređaj se koristi za identifikaciju Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kvasaca te višestaničnih gljiva. Princip rada se temelji na spektrometriji masa, revolucionarnom pristupu u karakterizaciji vrsta, pa ovaj uređaj ima primjenu u kliničkoj mikrobiologiji, analizi hrane te industrijskoj kontroli kvalitete proizvoda. Počevši od mikrobne kolonije, rezultati se dobivaju u nekoliko minuta. Uz brzinu postizanja rezultata, osnovne prednosti ovog instrumenta su jeftina i jednostavna priprema uzoraka te pouzdanost rezultata.

- **Odabir kolonija za identifikaciju**

  Kako bi se odredio sastav korištene starter kulture, dio startera zahvaćen je mikrobiološkom ušicom i prenesen u sterilan MRS bujon. Nakon 24 sata termostatiranja na 32 °C bujon se zamutio kao rezultat porasta mikrobnih kultura. Nakon toga je bujon mikrobiološkom ušicom dalje nacijepljen na MRS agar. Sastav mikroflore određivan je nakon 48 sati rasta mikrobnih kultura u termostatu na 32 °C te je ploča ostavljena još 48 sati na sobnoj temperaturi kako bi kolonije pigmentirale i kako bi morfološke karakteristike bile izražajnije. Na osnovu morfoloških karakteristika kolonija poraslih na MRS agaru, odabrane vrste za identifikaciju su bile žute i roze odnosno krem kolonije (slika 9).



Slika 9. Morfološki izgled i odabir kolonija za identifikaciju kultura iz komercijalnog startera (*vlastita fotografija*)

- **Priprema uzoraka za analizu**

  Vrhom nastavka automatske pipete uzme se malo mikrobne kolonije porasle na MRS hranjivoj podlozi i resuspendira miješanjem u kiveti po Eppendorfu s 300 µL destilirane vode. Dodaje se 900 µL etanola i suspenzija se miješa na stolnoj miješalici barem jednu minutu. Kiveta se centrifugira dvije minute pri 13 000 rpm, nakon čega se uklanja supernatant i ponavlja postupak centrifugiranja kako bi se uklonio sav etanol. Na dobiveni talog se dodaje 20 µL 70 %-tne mravlje kiseline uz miješanje. Zatim se dodaje 20 µL acetonitrila te se svi sastojci još jednom oprezno izmiješaju. Suspenzija se centrifugira 2 minute pri 13 000 okretaja po minuti nakon čega se 1 µL dobivenog supernatanta stavlja na MALDI pločicu. Nakon što se uzorak osuši na zraku, obloži se s 1 µL otopine matrice (α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina) i takav je spreman za analizu.

- **Analiza uzoraka pomoću Microflex LT™ MALDI-TOF spektrometra masa**

  MALDI pločica se umetne u spektrometar masa (Microflex LT™) i pokrene se snimanje MALDI Biotyper Compass HT 5.1 računalnim programom (Bruker Daltonik). Dobivaju se spektri koji se uspoređuju s referentnim spektrima pohranjenim u Bruker Biotyper bazi podataka uz algoritam MALDI Biotyper. Algoritam izračunava korelaciju između eksperimentalno dobivenih spektara i referentnih spektara u bazi podataka te rezultate

prikazuje u obliku logaritamskih vrijednosti (engl. *score*) koje mogu biti u rasponu od 0 do 3. Prema uputama proizvođača vrijednosti od 2,0 i više pokazuju sigurnu identifikaciju vrste, vrijednosti od 1,7 do 1,9 identifikaciju na razini roda, a za vrijednosti ispod 1,7 identifikacija je nemoguća (tablica 5).

Tablica 5. Značenje bodovnih vrijednosti rezultata dobivenih obradom podataka tijekom identifikacije (Schulthess i sur., 2014)

INTERVAL	OPIS	SIMBOL	BOJA
2,00 - 3,00	Visoka vjerojatnost identifikacije na razini vrste	(+++)	zelena
1,70 - 1,99	Vjerojatna identifikacija na razini roda	(+)	žuta
0,00 - 1,69	Nepouzdana identifikacija	(-)	crvena

3.2.2. Uzorci kiselog tijesta

Uzorci kiselog tijesta pripremljeni su u omjerima mase brašna i vode 1:1 te 1:2 i uz dodatak komercijalne starter kulture. 12 uzoraka je stavljeno na termostatiranje pri različitim temperaturama (25, 30 i 40 ºC) tijekom 18 sati (tablica 6). Nakon 18 sati fermentacije svim uzorcima je određena pH vrijednost, ukupna titracijska kiselost te koncentracija odabranih metabolita (etanola, glicerola, mliječne i octene kiseline).

Tablica 6. Oznake uzoraka i parametri fermentacije kiselog tijesta

BROJ UZORKA	TIP BRAŠNA	OMJER MASE BRAŠNA I VODE*	TEMPERATURA FERMENTACIJE [ºC]	KOMERCIJALNA STARTER KULTURA
1	T-550	1:1 (DY 200)	25	DA
2			30	
3			40	
4		1:2 (DY 300)	25	
5			30	
6			40	
7	T-850	1:1 (DY 200)	25	DA
8			30	
9			40	
10		1:2 (DY 300)	25	
11			30	
12			40	

*prinos tijesta, engl. *dough yield, DY*

Uzorci kiselog tijesta s oznakama 2 (brašno T-550, omjer 1:1 i temperatura 30 ºC) i 8 (brašno T-850, omjer 1:1 i temperatura 30 ºC) vođeni su kroz 14 dana uzastopnih fermentacija na 30 ºC. Utjecaj dodatka kiselog tijesta u novu mješavinu brašna i vode utvrđivao se praćenjem i mjerenjem pH vrijednosti i ukupne titracijske kiselosti kroz 14 dana te određivanjem koncentracije metabolita i broja mikroorganizama nakon nultog, sedmog i četrnaestog dana vođenja.

3.2.3. Priprema i vođenje kiselog tijesta

Pripremljena kisela tijesta razlikuju se prema tipu brašna (T-550 i T-850), omjeru brašna i vode (1:1 i 1:2) odnosno prinosu tijesta (DY 200 i DY 300) i temperaturi fermentacije (25, 30 i 40 ºC). Sva kisela tijesta pripremljena su starter kulturom dodavanom 1 % na brašno. U čašama od 200 mL naprave se odvage starter kulture (0,4 g), brašna (40 g) i destilirane vode (40 g za uzorke 1:1 i 80 g za uzorke 1:2). Smjese su homogeniziraju staklenim štapićem kako bi se dobila ravnomjerna raspodijela sastojaka, nakon čega se prekriju aluminijskom folijom u svrhu prevencije sušenja površine tijesta. Tako pripremljeni uzorci stavljaju se na termostatiranje pri 25, 30 i 40 ºC u trajanju od 18 sati.

Kako bi se ispitala robusnost starter kulture, fermentirani uzorci kiselog tijesta s različitim tipovima brašna (T-550 i T-850), DY 200 i temperaturom fermentacije na 30 ºC su korišteni za proces vođenja kroz tehniku osvježenja krušnog tijesta tijekom 14 dana. To bi značilo da se svaki dan rada dobiveno kiselo tijesto nakon analize koristi kao inokulum za slijedeću fermentaciju dodatkom u novu mješavinu brašna i vode koja ponovo fermentira 18 sati na 30 ºC. Postupak osvježenja odnosno prihranjivanja kiselog tijesta se ponavlja u ciklusu od 14 dana. Priprema prihranjenih kiselih tijesta kroz 14 dana odvija se prema sličnoj, iznad navedenoj recepturi. Razlika je u tome što se umjesto odvage starter kulture, u čašama od 200 mL naprave odvage brašna (40 g), destilirane vode (40 g) i dobivenog kiselog tijesta (4 g što iznosi 10 % na brašno) koji je inokulum za početak nove fermentacije. Zamjes se ponovo homogenizira, prekrije aluminijskom folijom te fermentira 18 sati pri 30 ºC.

3.2.4. Određivanje fermentacijskih karakteristika kiselog tijesta

Nakon svakog dana fermentacije uzorcima kiselog tijesta su određeni slijedeći parametri: pH vrijednost pomoću pH-metra i ukupna kiselost titracijom (engl. *Total Titratable Acidity*, *TTA*). Metodom tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, *UPLC*) u uzorcima kiselih tijesta je određena koncentracija odabranih metabolita.

3.2.4.1. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost kiselog tijesta određuje se na način da se u čašu od 200 mL odvaže 10 g uzorka kiselog tijesta i 90 g destilirane vode. Suspenzija se miješa ručno, 1 minutu na sobnoj temperaturi uz pomoć metalne balonske mutilice. Mjerenje pH vrijednosti provodi se uranjanjem elektrode pH-metra u čašu sa suspenzijom. Elektroda ostaje uronjena do postizanja stabilizacije pH vrijednosti koja se potom očitava i bilježi. pH vrijednosti su izmjerene i nerazrjeđenim uzorcima kiselog tijesta direktnim uranjanjem sonde pH-metra u čašu s kiselim tijestom. Nakon 18 sati fermentacije te do početka mjerenja pH, uzorci su čuvani u laboratorijskom hladnjaku.

3.2.4.2. Titracijsko određivanje ukupne kiselosti (TTA)

Ukupna titracijska kiselost (TTA) može se definirati kao ukupna količina kiselina proizvedenih tijekom fermentacije kiselog tijesta, a određuje se titracijom s 0,1 mol/L NaOH. Za određivanje ukupne titracijske kiselosti uzoraka kiselog tijesta koriste se prethodno pripremljene suspenzije za određivanje pH vrijednosti (uzorci kiselog tijesta homogenizirani s 90 mL destilirane vode). Suspenzije su titrirane s 0,1 mol/L NaOH uz konstantnu homogenizaciju do postizanja pH vrijednosti 8,5 koja je praćena uz pomoć elektrode pH-metra. Utrošeni volumen NaOH se očita s birete te se ukupna kiselost izražava kao volumen utrošenog 0,1 mol/L NaOH za postizanje pH 8,5.

3.2.4.3. Određivanje koncentracije metabolita UPLC metodom

Koncentracije alkohola i organskih kiselina određivane su u uzorcima kiselog tijesta. Ciljani metaboliti za razdvajanje i analizu UPLC metodom u ovom radu su etanol, glicerol, mliječna i octena kiselina.

- **Priprema uzoraka za analizu**

  Određivanje koncentracije analita u uzorcima kiselog tijesta započinje pripremom otopina za analizu uzoraka kiselog tijesta s DY 200 i otopina za analizu uzoraka kiselog tijesta s DY 300. Prvi korak pripreme otopina uzoraka kiselog tijesta s DY 200 je razrjeđenje 10 g vaganog uzorka u 100 mL destilirane vode. Alikvot od 10 mL odpipetira se u okrugle tikvice s ravnim dnom od 50 mL. Ovaj korak je izostavljen u pripremi otopina uzoraka kiselog tijesta s DY 300 gdje se 1 g vaganog uzorka dodaje direktno u okruglu tikvicu s ravnim dnom od 50 mL. Daljnji koraci pripreme otopina su isti. Sadržajima tikvica pipetom su dodani 2,5 mL otopine Carrez I i 2,5 mL otopine Carrez II za taloženje proteina, nakon čega su tikvice nadopunjene destiliranom vodom do oznake. Taloženje se provodi 10 minuta, a istaloženi proteini se uklanjaju filtracijom. Otopine se prvo filtriraju kroz filter papir koji je oblikovan u stožac i stavljen u stakleni lijevak. Ispod lijevka se pozicionira čaša za prihvat filtrata, dok talog zaostaje na filter papiru. Injektiranjem pomoć šprice, dobiveni filtrat se profiltrira kroz najlonski filter promjera 0,2 μm u vijalice čime se dobivaju odgovarajući uzorci za analizu. Profiltrirani uzorci se čuvaju u laboratorijskom zamrzivaču na -18 ºC do UPLC analize.

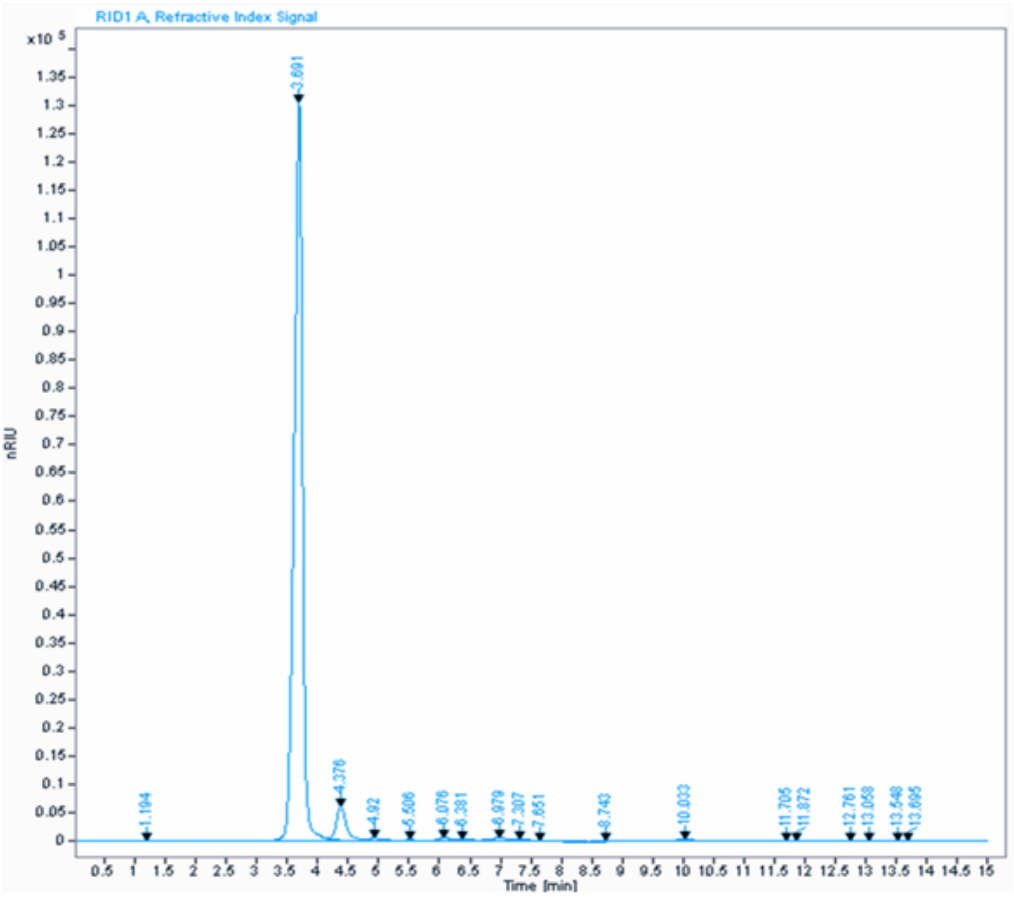
- **Analiza uzoraka UPLC metodom**

  Razdvajanje i analiziranje ciljanih analita u uzorcima kiselog tijesta provodi se UPLC metodom uz primjenu detektora. Za analize je korištena analitička kolona Rezex ROA-Organic Acid H+ proizvođača Phenomenex, SAD, a kao mobilna faza tijekom analize korištena je vodena otopina sumporne kiseline (0,0025 mol/L). Za detekciju ciljanih analita korišten je RID detektor temperature 40 °C. Tablica 7 prikazuje uvjete UPLC analize.

Tablica 7. Uvjeti UPLC analize

NAZIV KOLONE	Rezex ROA-Organic Acid H+
DIMENZIJE KOLONE	15 cm x 7,2 mm
TEMPERATURA KOLONE	60 ºC
MOBILNA FAZA	0,0025 mol/L H_2SO_4
PROTOK MOBILNE FAZE	0,6 mL/min
INJEKTIRANI VOLUMEN UZORKA	10 μL

Rezultat UPLC analize je kromatogram odnosno dijagram koji prikazuje odzive analita koji izlaze iz kromatografske kolone u ovisnosti o vremenu (slika 10). Udio pojedinog analita proporcionalan je površini pika na kromatogramu (A), a vrijeme koje je potrebno da analit prođe kroz kolonu naziva se retencijsko vrijeme (t_R).



Slika 10. Kromatogram dobiven UPLC metodom (računalni program OpenLAB CDS)

- **Kvalifikacija i kvantifikacija alkohola i organskih kiselina**

  Kvalifikacija alkohola i organskih kiselina provodi se usporedbom retencijskih vremena standarda ciljanih analita (otopine čistih ciljanih analita poznatih koncentracija) i retencijskih vremena razdvojenih analita iz injektiranog uzorka. S druge strane, kvantifikacija ciljanih analita se provodi primjenom metode vanjskog standarda. Otopine standarda ciljanih analita se pripremaju u različitim koncentracijskim rasponima te je za svaki standard provedena UPLC analiza u tri ponavljanja. Baždarni dijagrami se konstruiraju pomoću dobivenih površina pikova ciljanih analita (y-os) i njihovih poznatih koncentracija u otopinama standarda (x-os). U tablici 8 su prikazani parametri kvalifikacije i kvantifikacije ciljanih analita.

Tablica 8. Parametri kvalifikacije i kvantifikacije ciljanih analita

CILJANI ANALIT	RETENCIJSKO VRIJEME [min]	JEDNADŽBA BAŽDARNOG DIJAGRAMA*
ETANOL	10,082	y = 484161 x + 737,97
GLICEROL	7,292	y = 115438 x + 2603,5
MLIJEČNA KISELINA	6,927	y = 68594 x - 1912,5
OCTENA KISELINA	7,683	y = 68165 x - 2189,8

*y = površina pika, x = masena odnosno volumna koncentracija ciljanog analita [g/L odnosno L/L]

3.2.5. Mikrobiološka analiza kiselog tijesta

Mikrobiološka analiza uzoraka kiselog tijesta obuhvaća određivanje broja poraslih bakterijskih kolonija na MRS hranjivoj podlozi odnosno broja kvaščevih kolonija na MHA hranjivoj podlozi. Svi postupci i radnje za analizu se provode u aseptičnim uvjetima koji uključuju sterilno posuđe, sterilnu destiliranu vodu, rad uz plamenik i u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu te dezinfekciju radnih površina alkoholom.

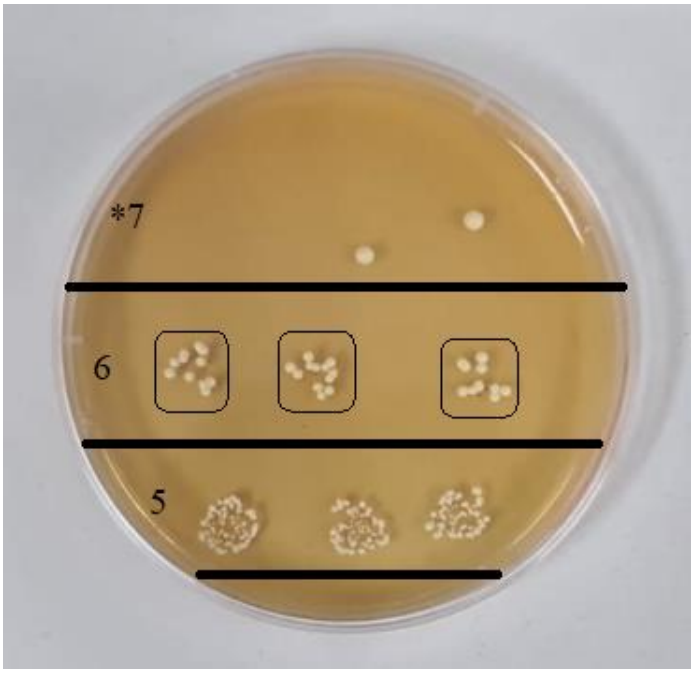
3.2.5.1. Priprema uzoraka decimalnih razrijeđenja za analizu

Uzorci za mikrobiološku analizu pripremaju se uz plamenik na način da se u male staklene bočice odvaže 0,5 g kiselog tijesta i odpipetira 4,5 mL destilirane vode. Sadržaj bočice se homogenizira na vorteksu te se dobiva prvo razrijeđenje (10^{-1}) iz kojega se pripremaju daljnja decimalna razrjeđenja. U mikrobiološkom zaštitnom kabinetu se provodi priprema daljnjih razrjeđenja koja podrazumijeva pipetiranje 1 mL uzorka iz prethodno pripremljenog razrjeđenja u epruvetu s 9 mL destilirane vode. Postupak se ponavlja dok se ne postigne željeno decimalno razrjeđenje. Uzorci se zatim nacjepljuju na pripremljene hranjive podloge.

3.2.5.2. Određivanje broja mikroorganizama

Određivanje broja mikroorganizama također se odvija u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu, a započinje nacjepljivanjem odgovarajućih decimalnih razrjeđenja na pripremljene hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama. Za određivanje broja bakterija nacjepljuje se peto, šesto i sedmo decimalno razrjeđenje (10^{-5}, 10^{-6} i 10^{-7}), dok se za određivanje broja kvasaca odabire treće, četvrto i peto decimalno razrjeđenje (10^{-3}, 10^{-4} i 10^{-5}). Prije nacjepljivanja odabranih razrjeđenja, na MRS ploče za rast bakterija se odpipetira 50 µL 0,0001 %-tnog cikloheksimida za suzbijanje rasta kvasaca, a na MHA ploče za rast kvasaca 100 µL 1 %-tne otopine oksitetraciklina (OTC) za suzbijanje rasta bakterija. Šatpićem po Drigalskom se napravi

ravnomjerna raspodijela kemikalija po hranjivim podlogama, nakon čega se započinje s nacjepljivanjem. 10 µL uzorka odnosno odabranog decimalnog razrjeđenja se nacijepi na odgovarajuću hranjivu podlogu, za svako razrjeđenje u tri paralele. Inkubacija nacjepljenog agara u Petrijevim zdjelicama provodi se u termostatu pri 30 ºC u vremenskom trajanju od 48 sati. Nakon inkubacije izbroje se porasle kolonije na pločama. Ispravno brojanje se provodi zbrajanjem broja poraslih kolonije u pojedinom decimalnom razrjeđenju te njihovo dijeljenje s brojem tri (slika 11).



Slika 11. Brojanje poraslih bakterijskih kolonija na MRS ploči (*oznake decimalnih razrjeđenja, *vlastita fotografija*)

Izbrojane vrijednosti se izražavaju kao CFU (engl. *Colony Forming Unit*) prema jednadžbi [1] (Mutak, 2018):

$$\text{CFU} = \frac{\text{BROJ PORASLIH KOLONIJA}}{\text{UPOTRIJEBLJENI VOLUMEN UZORKA*}} \text{ x RECIPROČNA VRIJEDNOST RAZRJEĐENJA [1]}$$

*ili masa uzorka (CFU/mL ili CFU/g)

3.2.6. Ispitivanje antifungalne aktivnosti kiselog tijesta

Antifungalna aktivnost kiselog tijesta ispitivana je disk difuzijskom metodom uz pomoć spora plijesni *Penicillium* sp. Disk difuzijska metoda provodi se na ispečenim krušnim tijestima (kruščićima) bez dodatka kiselog tijesta te s dodatkom 15 i 30 % kiselog tijesta na korištenu masu brašna. Kroz period inkubacije od 5 dana pri 30 °C, vizualnim pregledom na dnevnoj bazi prati se rast plijesni na krušnim presjecima (poglavlje 3.2.6.2.).

3.2.6.1. Priprema kiselog tijesta i pečenje krušnog tijesta (kruščića)

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti kiselog tijesta pripremljena su 3 uzorka kiselog tijesta u 3 puta većem mjerilu u odnosu na osnovnu recepturu. Dva uzorka kiselog tijesta se pripremaju s dodatkom komercijalne starter kulture, a jedan s dodatkom kiselog tijesta koje je prihranjivano kroz 14 dana. Točna receptura pripreme prikazana je u tablici 9. Pripremljeni uzorci fermentiraju pri 30 °C u trajanju od 18 sati. Nakon provjere pH vrijednosti kisela tijesta su korištena za izradu zamjesa.

Tablica 9. Receptura pripreme uzoraka kiselog tijesta za pečenje kruščića

UZORAK KISELOG TIJESTA	TIP BRAŠNA	OMJER MASE BRAŠNA I VODE	MASA BRAŠNA [g]	MASA DESTILIRANE VODE [g]	MASA KOMERCIJALNE STARTER KULTURE [g]	MASA PRIHRANJENOG KT* [g]
1	T-550	1:1	120	120	1,2	-
2	T-850	1:1	120	120	1,2	-
3	T-850	1:1	120	120	-	12

*KT-kiselo tijesto

Krušna tijesta za pečenje pripremljena su od suhih sastojaka (brašno tip 550 odnosno 850, sol, šećer i kvasac) pomiješanih s vodom (slijepe probe) te s dodatkom 15 i 30 % kiselog tijesta na korištenu masu brašna (tablica 10). Svi sastojci se homogeniziraju ručnim mikserom u plastičnim posudama, nakon čega se krušno tijesto ručno oblikuje. Okruglo oblikovana tijesta važu se na jednake dijelove koji se stavljaju u silikonske kalupe za pečenje. Postupku pečenja prethodi fermentacija pripremljenih tijesta u fermentacijskoj komori pri 35 °C i 85 % relativne vlažnosti tijekom 60 minuta. Po završetku fermentacije, tijesta su stavljena na pečenje pri 220 °C uz 150 mL pare, kroz 25 minuta. Ispečeni kruščići se stavljaju na hlađenje 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Pečenje i hlađenje kruščića prikazano je na slikama 12 i 13.

Tablica 10. Receptura pripreme uzoraka krušnog tijesta (kruščića)

SIROVINA i RADNI MIKROORGANIZAM	UZORAK KRUŠNOG TIJESTA (KRUŠČIĆA)							
	BRAŠNO T-550			BRAŠNO T-850				
	SP*	15 % KT*	30 % KT	SP	15 % KT	30 % KT	15 % KT	30 % KT
		PRIPREMLJENO ZA PEČENJE			PRIPREMLJENO ZA PEČENJE		PRIHRANJENO 14 DANA	
BRAŠNO [g]	100	100	100	100	100	100	100	100
ŠEĆER [g]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
SOL [g]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
KVASAC [g]	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
DESTILIRANA VODA [g]	60	60	60	60	60	60	60	60
KT [g]	-	15	30	-	15	30	15	30

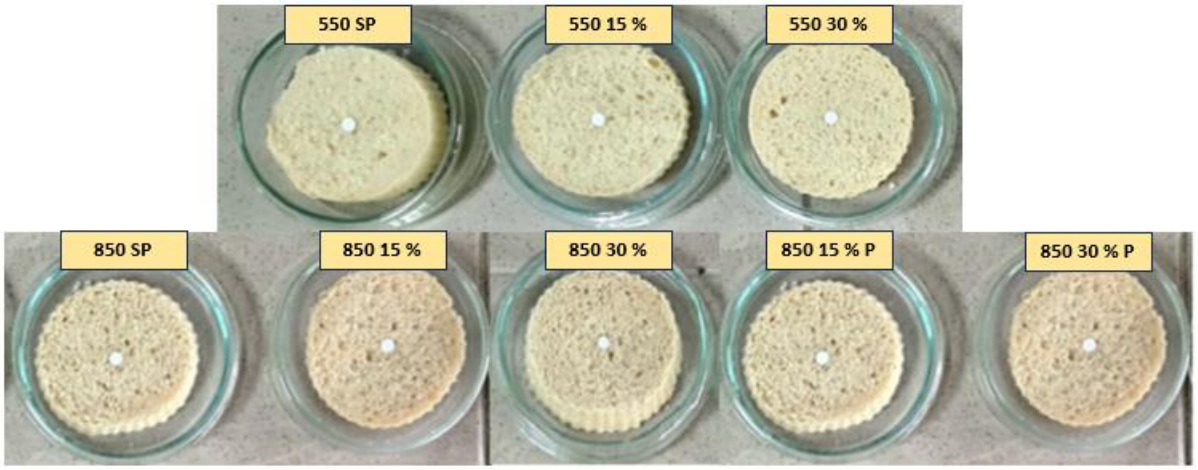
*SP-slijepa proba, KT-kiselo tijesto

Slika 12. Pečenje kruščića u silikonskim kalupima (*vlastita fotografija*)

Slika 13. Hlađenje kruščića na sobnoj temperaturi (*vlastita fotografija*)

3.2.6.2. Praćenje antifungalne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Antifungalna aktivnost kiselog tijesta ispituje se disk difuzijskom metodom na ispečenim kruščićim uz korištenje test mikroorganizma, *Penicillium* sp. Horizontalni presjeci kruščića se slažu na sterilne Petrijeve zdjelice te se inokuliraju s 1 µL homogenizirane suspenzije test mikroorganizma *Penicillium* sp. preko praznih sterilnih diskove veličine 6 mm pozicioniranih u središte uzoraka (slika 14). Metoda se temelji na određivanju promjera zone kontaminacije koja se pojavljuje oko diska natopljenog test mikroorganizmom. Antifungalna aktivnost praćena je inkubacijom uzoraka na 30 °C kroz 5 dana.



Slika 14. Horizontalni presjeci kruščića inokulirani test mikroorganizmom *Penicillium* sp. (oznake: 550 SP – s brašnom T-550 i bez kiselog tijesta (KT), 550 15 % – s brašnom T-550 i 15 % KT fermentiranog 18 h, 550 30 % – s brašnom T-550 i 30 % KT fermentiranog 18 h, 850 SP – s brašnom T-850 i bez KT, 850 15 % – s brašnom T-850 i 15 % KT fermentiranog 18 h, 850 30 % – s brašnom T-850 i 30 % KT fermentiranog 18 h, P – kiselo tijesto vođeno 14 dana, *vlastita fotografija*)

4. REZULTATI I RASPRAVA

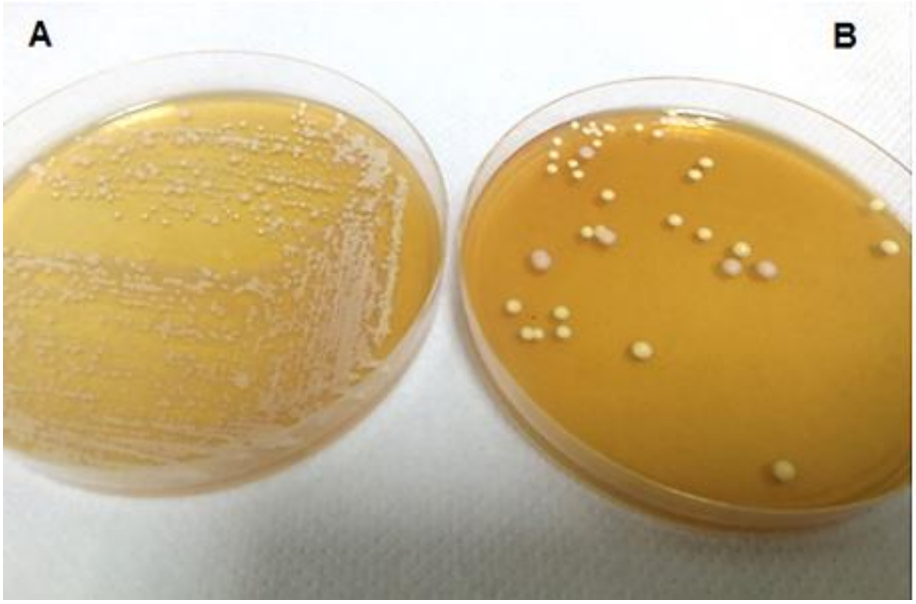
Kiselo tijesto je mješavina brašna i vode na kojoj kompleksni mikrobni ekosustav sintetizira brojne metabolite i specifične spojeve arome. Tradicija fermentacije kiselog tijesta bakterijama mliječne kiseline započinje od spontanih fermentacija, preko definiranih starter kultura, do primjene i razvoja komercijalnih starter kultura. Brojna istraživanja ističu tehnološke prednosti primjene kiselog tijesta u pekarskoj industriji koje se odražavaju na mikrobiološke, zdravstvene, nutritivne i organoleptičke karakteristike konačnog proizvoda. Istovremeno se navodi i složenost samog procesa zbog mnogobrojnih utjecaja i potrebe evaluacije procesnih parametra s ciljem ostvarenja punog potencijala u primjeni.

U ovom radu je istraženo kako se priprema i vođenje kiselog tijesta s dodatkom komercijalne starter kulture odražava na broj mikroorganizama, robusnost starter kulture, fermentacijsku aktivnost te antifungalnu aktivnost kiselog tijesta s potencijalom primjene u manjoj pekarskoj industriji. U 12 uzoraka kiselog tijesta s različitim tipom pšeničnog brašna (T-550 i T-850), omjerom brašna i vode (1:1 i 1:2) odnosno prinosom tijesta (DY 200 i DY 300) i temperaturom fermentacije (25, 30 i 40 °C) proučavane su fermentacijske karakteristike kroz ispitivanje pH vrijednosti, ukupne titracijske kiselosti i koncentracije metabolita UPLC metodom. U svrhu ispitivanja robusnosti starter kulture, vođenim uzorcima kiselog tijesta s karakteristikama DY 200, fermentacijom pri 30 °C te s različitim tipovima brašna, utjecaj osvježenja odnosno prihranjivanja utvrđivao se praćenjem i mjerenjem pH vrijednosti i ukupne titracijske kiselosti te određivanjem broja mikroorganizama (CFU/g kiselog tijesta) i koncentracije metabolita nakon nultog, sedmog i četrnaestog dana fermentacije. Također, u radu je i identificiran mikrobni sastav komercijalne starter kulture upotrijebljene za pripremu svih uzoraka kiselog tijesta korištenih za istraživanje.

4.1. IDENTIFIKACIJA MIKROBNIH KULTURA U KOMERCIJALNOM STARTERU

Kiselo tijesto se može proizvoditi tradicionalno, spontanom feremntacijom ili uz dodatak komercijalne starter kulture. Komercijalni starteri sadržavaju jednu ili više vrsta BMK, dok kvasce mogu i ne moraju imati u svom sastavu (Mrvčić i sur., 2011). Kako bi se odredio mikrobni sastav u korištenoj starter kulturi, proveden je uzgoj mikrobnih vrsta u bujonu i izolacija mikrobnih vrsta nacjepljivanjem na MRS agar. Na slici 15 moguće je vidjeti da su nakon dodatnog rasta na sobnoj temperaturi kolonije pigmentirale i da su u starteru zastupljene dvije mikrobne vrste (žute i krem odnosno roze kolonije) koje su identificirane kao *Lactiplantibacillus plantarum* i *Saccharomyces cerevisiae* (slika 16). Bakterije i kvasci

zastupljeni su u okvirnom omjeru 5:1 što je u suglasju s literaturnim podacima o dominantnosti BMK nad kvascima u kiselim tijestima, iako taj omjer može ići i do 100:1 (Hernández-Parada i sur., 2023; Gobbetti i Gänzle, 2012).



Slika 15. Porasle kolonije na MRS agaru nakon 48 h rasta na 32 °C (slika **A**) i nakon 48 h rasta na sobnoj temperaturi (slika **B**)

Result overview table--start						
Sample Id (Type)	Target Pos.	Organism (best match)	log(score) (Conf.)	Organism (second best match)	log(score) (Conf.)	Consistency
1 (zute) (Sample)	F8	Lactobacillus plantarum	2.24 (+++)	Lactobacillus plantarum	2.23 (+++)	(A)
2 (roze) (Sample)	F11	Saccharomyces cerevisiae	1.72 (+)	Saccharomyces cerevisiae	1.72 (+)	(B)
Result overview table--end						

Slika 16. Identificirane mikrobne kulture iz komercijalnog startera (prema novoj nomenklaturi *Lactobacillus plantarum* ima naziv *Lactiplantibacillus plantarum*)

Obje mikrobne kulture su vrlo značajne u pekarskoj industriji, naročito ako je tehnologija kiselih tijesta implementirana u sustav proizvodnje, zbog svog posebnog i pozitivnog djelovanja na tehnološke, mikrobiološke, organoleptičke, nutritivne te zdravstvene karakteristike gotovog proizvoda (Mrvčić i sur., 2011).

Kao što je ranije navedeno u poglavlju 2.2.1. teorijskog dijela rada, nova sistematizacija roda BMK *Lactobacillus* posljedično je dovela do promjene nomenklature nekih vrsta pa je *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lpb*. *plantarum*) novi naziv za *Lactobacillus plantarum*. Ova fakultativno heterofermentativna bakterija pripada rodu *Lactiplantibacillus* te je uz *F*. *sanfranciscensis* i *Lev*. *brevis* dominatna vrsta tradicionalnih kiselih tijesta. Brojna istraživanja povezuju *Lpb*. *plantarum* s kiselim tijestima diljem svijeta. Gobbetti (1998) navodi povezanost s talijanskim pšeničnim kiselim tijestom, a Zhang i sur. (2011) otkrivaju visoku gustoću stanica ove bakterije u azijskim kiselim tijestima. Brojne vrste iz roda *Lactobacillus* između kojih je i *Lpb*. *plantarum*, Scheirlinck i sur. (2007) su otkrili kao dominatne u tipu I kiselog tijesta, u proizvodnji belgijskih pekara.

Ovakva popularnost *Lpb. plantarum* je i opravdana zbog brojnih pozitivnih učinaka koji se ispoljavaju tijekom fermentacije kiselog tijesta. Uz zakiseljavanje tijesta, zabilježena je i njezina inhibitorna aktivnost prema *B*. *subtilis* zbog sposobnosti sinteze bakteriocina, plantaricina i različitih antifungalnih spojeva što se povoljno odražava na trajnost pekarskih proizvoda s dodatkom kiselog tijesta. Sve veći interes za proizvode bez glutena usmjerio je brojne znanstvenike na istraživanje primjene BMK za njihovo poboljašnje. Naime, *Lpb. plantarum* se zajedno s *F*. *sanfranciscensis* pokazala kao odgovarajuća BMK u proizvodnji bezglutenskih kiselih tijesta dajući proizvod mekše teksture u samo 24 sata ferementacije, u usporedbi s kemijski zakiseljenom kontrolom (Ventimiglia i sur., 2015). Također, u radu Settannia i Moschettia (2010) se *Lpb. plantarum* ističe za razgradnju toksičnih spojeva koji su odgovorni za celijakiju.

Druga identificirana mikrobna vrsta u korištenoj starter kulturi je *Saccharomyces cerevisiae* koji je ujedno i najpoznatija vrsta kvasca. Pripada rodu *Saccharomyces* i sinonim je za pekarski kvasac. Jedan je od osnovnih sirovina u pekarstvu čija svjetska proizvodnja iznosi približno 3×10^6 tona svježeg kvasca/godišnje (Hanousek Čiča i sur., 2015). Upotrebljava se za dizanje tijesta u obliku komercijalnog, industrijskog kvasca ili kao starter kultura u tradcionalnoj odnosno komercijalnoj proizvodnji kiselog tijesta. Upotreba monokulture *S*. *cerevisiae* omogućuje kratku fermentaciju, ali rezultira slabim zdravstvenim i nutritivnim vrijednostima pekarskih proizvoda, smanjenom aromom te trajnošću. Ovakve nedostatke pekarska industrija

riješava upotrebom kiselog tijesta u proizvodnji gdje *S. cerevisiae* u kombinaciji s BMK daje proizvod bolje arome, teksture i volumena. Dok su BMK odgovorne za sniženje pH vrijednosti kiselog tijesta, ključna uloga kvasaca je dizanje tijesta čime se povećava volumen proizvoda. Osim toga, vrlo je važan u formiranju strukture glutena te zajedno s BMK u proizvodnji aromatskih spojeva poput alkohola, aldehida, karbonila i estera koji poboljšavaju okus i miris pekarskih proizvoda (Lahue i sur., 2020).

Brojna istraživanja navode *S. cerevisiae* kao najčešće prisutnu vrstu kvasca u kiselim tijestima. Boyaci-Gunduz i Erten (2020) su identificirali prisutnost *S. cerevisiae* u 8 uzoraka kiselih tijesta prikupljenih iz različitih pekarnica i u jednom uzorku kiselog tijesta koji je fermentiran u laboratoriju. Sva kisela tijesta su proizvedena bez primjene pekarskog kvasca što sugerira da prisutnost *S. cerevisiae* u kiselim tijestima iz pekarnica može biti povezana s kontaminacijom radne jedinice pekarskim kvascem. S druge strane, veliki postotak *S. cerevisiae* u kiselom tijestu proizvedenom u labaratorijskom mjerilu Boyaci-Gunduz i Erten (2020) povezuju s korištenim brašnom koje može biti izvor kvasaca.

4.2. ODREĐIVANJE BROJA MIKROOGRANIZAMA KROZ VRIJEME VOĐENJA KISELOG TIJESTA

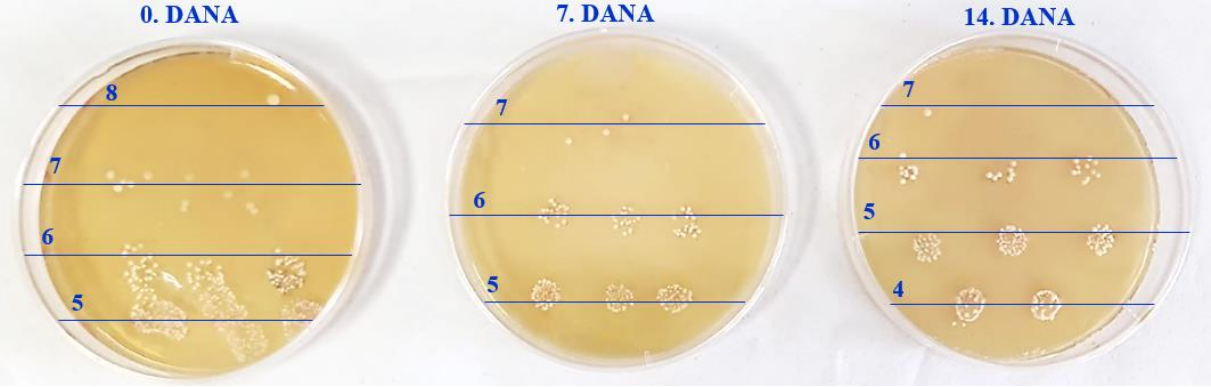
Mikrobna populacija kiselog tijesta određena je pomoću dva različita medija za uzgoj kultura: MRS za brojanje ukupnih bakterija i MHA za brojanje kvasaca. Nakon 48 sati inkubacije pri 30 °C, izbroje se porasle kolonije bakterija i kvasaca u odabranim decimalnim razrjeđenjima te se izračuna broj stanica po mililitru uzorka odnosno po gramu kiselog tijesta. Računanje se provodi prema formuli [1] te se rezultat izražava u CFU jedinicama. Tablica 11 prikazuje broj poraslih bakterijskih i kvaščevih kolonija za uzorke kiselog tijesta nakon nultog (nakon prve fermentacije od 18 sati), sedmog i četrnaestog dana vođenja.

Tablica 11. Broj poraslih stanica bakterija i kvasaca nakon nultog, sedmog i četrnaestog dana vođenja kiselog tijesta

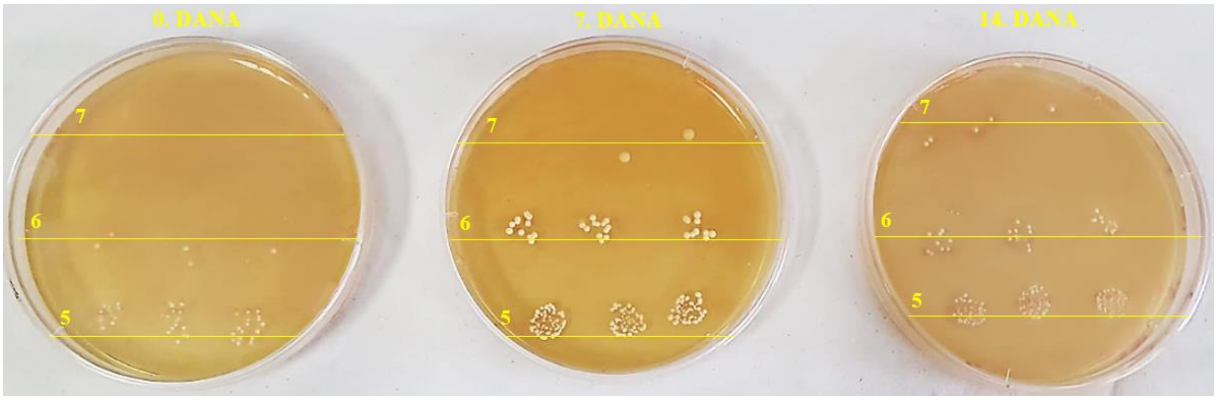
PERIOD VOĐENJA	OPIS UZORKA	BROJ KOLONIJA	
		BAKTERIJA (log CFU/g KT**)	KVASACA (log CFU/g KT)
0 DANA	T-550, 1:1 30 °C*	9,63	6,70
	T-850, 1:1 30 °C	9,18	6,00
7 DANA	T-550, 1:1 30 °C	9,23	6,80
	T-850, 1:1 30 °C	8,95	/
14 DANA	T-550, 1:1 30 °C	8,94	
	T-850, 1:1 30 °C	8,88	6,88

*T-550, T-850 - tipovi brašna, 1:1 - omjer brašno:voda, 30 °C - temperatura fermentacije; ** KT - kiselo tijesto

Dobiveni rezultati pokazuju da je nakon prvog dana fermentacije (nulti dan vođenja) broj bakterija u uzorcima kiselog tijesta oko 10^9 stanica/g. Nakon 7 dana vođenja kiselog tijesta broj poraslih bakterijskih stanica je i dalje oko 10^9 stanica/g, dok je nakon 14 dana vođenja manji za jedno decimalno razrjeđenje, ali su još uvijek stanice prisutne u vrlo visokom broju od oko 10^8 stanica/g. Slike 17 i 18 prikazuju porasle kolonije bakterija u uzorcima kiselog tijesta nakon nultog, sedmog i četrnaestog dana vođenja.



Slika 17. Porasle kolonije bakterija na MRS hranjivim podlogama nacjepljenim uzorcima kiselog tijesta s brašnom T-550 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) nakon nultog, sedmog i četrnaestog dana



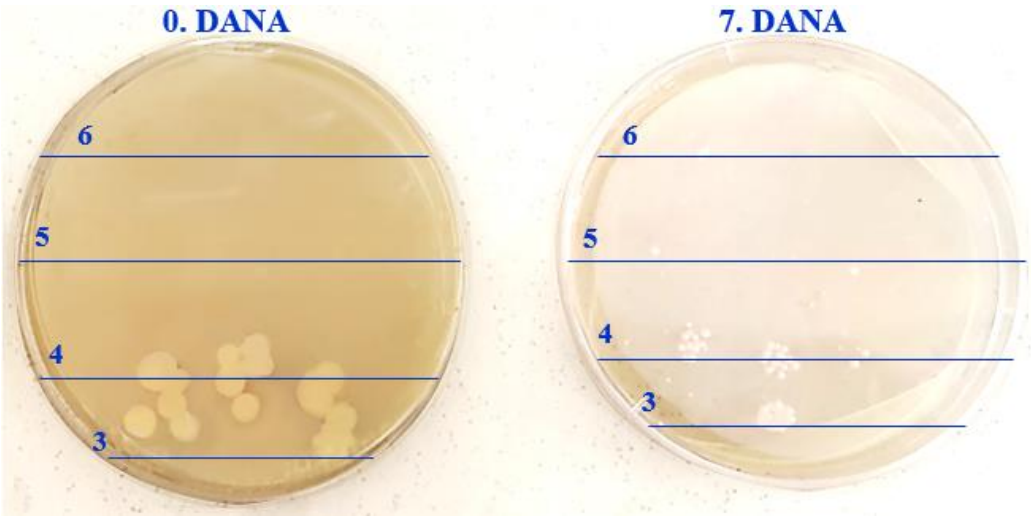
Slika 18. Porasle kolonije bakterija na MRS hranjivim podlogama nacjepljenim uzorcima kiselog tijesta s brašnom T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) nakon nultog, sedmog i četrnaestog dana

Broj poraslih bakterijskih stanica u uzorcima kiselog tijesta s brašnom T-550 se kreće u rasponu od 8,94 do 9,63 log CFU/g kiselog tijesta, a kod uzoraka kiselog s brašnom T-850 taj broj je u rangu od 8,88 do 9,18 log CFU/g kiselog tijesta. Slične rezultate su dobili Boreczek i sur. (2020) koji su određivali broj bakterija u kiselim tijestima s pšeničnim, pirovim i raženim brašnom nakon nultog, drugog i trećeg dana prihranjivanja. Nakon 72 sata njihovi rezultati su pokazali broj mezofilnih bakterija mliječne kiseline u rangu od $6,8 \times 10^8$ do $3,1 \times 10^9$ CFU/g, dok je broj bakterija octene kiseline bio manji za jednu potenciju.

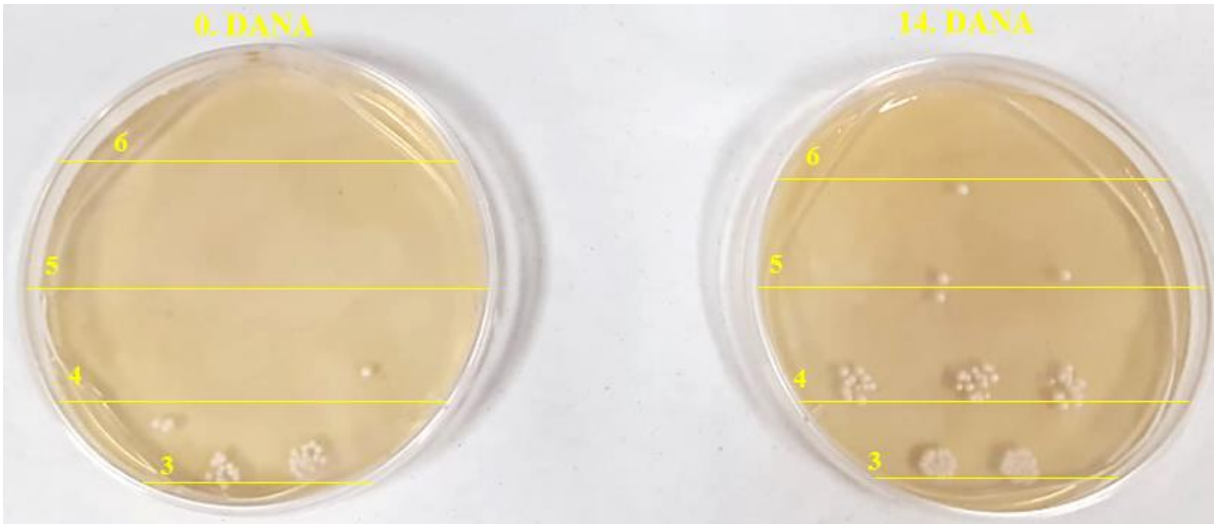
Falciano i sur. (2022) su istraživali rast endogenih mikroorganizama tijekom 6 dana vođenja kiselih tijesta pripremljenih s geografski različitim tipovima pšeničnih brašna, meksičkim i talijanskim te omjerom brašna i vode 1:1. Kisela tijesta su fermentirana na 20 °C i prihranjivana svaki dan u periodu od 6 dana. Nakon prvog dana fermentacije (nulti dan vođenja), u kiselim tijestima dolazi do intenzivnog rasta broja bakterija te je broj bakterija u kiselom tijestu s meksičkim tipom pčeničnog brašna približno jednak broju poraslih kolonija bakterija u uzorcima kiselih tijesta u ovom radu (≈ 9 log CFU/g kiselog tijesta). Nakon 5 dana inkubacije, Falciano i sur. (2022) navode stagnaciju broja bakterija (nema značajne promjene broja kolonija u odnosu na drugi i treći dan) zbog ulaska stanica u stacionarnu fazu rasta. Rezultatom navedenog istraživanja se može potkrijepiti dobiveni gotovo jednak broj bakterija u kiselom tijestu s T-850 nakon sedam i četrnaest dana vođenja u ovom radu. Slične rezultate je pokazala i studija Ercolinia i sur. (2013) koji su proučavali mikrobiotu kiselih tijesta s dva tipa pšeničnog brašna i raženim brašnom, uz vođenje u periodu od 11 dana. Istraživanje je prikazalo broj bakterijskih stanica kroz porodice bakterija mliječne kiseline, najzastupljenijih bakterija kiselog tijesta i *Enterobacteriaceae*. Bez obzira na vrstu brašna, broj bakterija mliječne kiseline

intenzivno raste od prve fermentacije (nulti dan vođenja) do šestog dana vođenja kada dolazi do ustaljenja broja stanica bakterija mliječne kiseline. S druge strane, *Enterobacteriaceae* su detektirane i izbrojane u svim kiselim tijestima te se njihov broj značajno povećao nakon nultog, a onda i prvog dana vođenja, nakon čega dolazi do opadanja broja stanica sve do potpunog izostanka nakon 11 dana.

Rast kvasaca na odgovarajućim hranjivim podlogama ispitan je nakon nultog (prvi dan fermentacije) i sedmog te nakon četrnaestog dana vođenja uzoraka kiselih tijesta. Rast kvaščevih kolonija s vremenom vođenja karakterističan je za oba uzorka. Na pločama nacjepljenima s uzorkom T-550 broj stanica iznosi 6,70 log CFU/g kiselog tijesta (slika 19, lijeva strana), dok je broj na pločama s uzorkom T-850 bio 6,00 log CFU/g kiselog tijesta (slika 20, lijeva strana).



Slika 19. Porasle kolonije kvasaca na MHA hranjivim podlogama nacjepljenim uzorcima kiselog tijesta s brašnom T-550 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) nakon nultog i sedmog dana



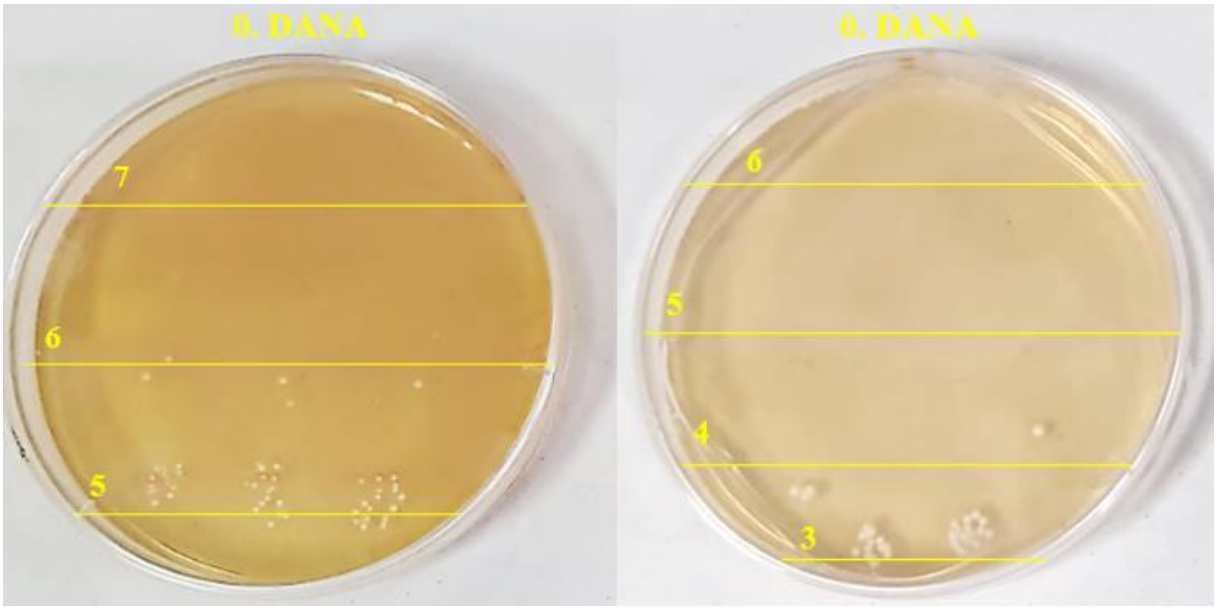
Slika 20. Porasle kolonije kvasaca na MHA hranjivim podlogama nacjepljenim uzorcima kiselog tijesta s brašnom T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) nakon nultog i četrnaestog dana

Bez obzira na tip brašna, u oba analizirana kisela tijesta broj kvasaca se kreće u rangu od 6,00 log CFU/g kiselog tijesta do 6,88 log CFU/g kiselog tijesta odnosno u redu veličine 10^6 CFU/g. Slične studije su prikazale red veličine 10^6 CFU/g kiselog tijesta kao optimalanim za određivanje broja stanica kvasaca u kiselom tijestu. Upravo u tom redu veličine Boreczek i sur., (2020) su svojim eksperimentima pokazali kretanje broja kvasaca kod kiselih tijesta pripremljenima s tri različite vrste brašna, pšeničnim, pirovim i raženim. Isto tako, studija Ercolinia i sur., (2013) koja je proučavala kisela tijesta pripremljena s dva tipa pšeničnog brašna i raženim brašnom navodi broj kvasca u tom redu veličine. Nakon prvog dana fermentacije, broj stanica kvasca kod uzoraka kiselih tijesta pripremljenih s pšeničnim tipovima brašna je veći od broja kvaščevih stanica prisutnih u kiselom tijestu pripremljenom s raženim brašnom.

Rezultati brojnih istraživanja pokazuju kretanje broja stanica mikroorganizama kiselog tijesta u redu veličine 10^8 CFU/g koja je svojstvena za broj stanica bakterija odnosno 10^6 CFU/g za broj kvaščevih stanica. Broj stanica mikroorganizama koji je pokazatelj zrelog kiselog tijesta, Mrvčić i sur. (2011) navode u granicama 10^8 – 10^9 CFU/g za bakterije mliječne kiseline te 10^6 – 10^7 CFU/g za stanice kvasca. Iz navedenog je vidljivo da je broj stanica bakterija veći za dva ili tri decimalna razrjeđenja od broja kvaščevih stanica što je i pokazano dobivenim rezultatima u tablici 11. Nulti, sedmi i četrnaesti dan vođenja broj bakterijskih stanica je bio u navedenom intervalu. Nakon prve fermentacije od 18 sati (nulti dan vođenja) broj bakterijskih stanica je veći za dva decimalna razrjeđenja u odnosu na broj kvaščevih stanica, bez obzira na tip brašna. Nakon sedam i četrnaest dana vođenja uzoraka kiselog tijesta, razlika u broju bakterijskih i

kavščevih stanica je ponovo za dva decimalna razrjeđenja, s očekivano većim brojem poraslih bakterijskih stanica. Ovakav rezultat su također pokazala oba uzorka kiselog tijesta, neovisno o tipu pšeničnog brašna.

Omjer broja bakterija i kvasaca u kiselom tijestu može se odrediti okvirno na temelju usporedbe broja poraslih kolonija na pripadajućim pločama. Slika 21 prikazuje razliku u omjeru broja bakterija i kvasaca (≈ 20:1) kod uzorka kiselog tijesta s brašnom T-850 nakon nultog dana vođenja. Nakon četrnaestog dana vođenja taj omjer se smanjuje te okvirno iznosi 5:1. Prvi dan fermentacije (nulti dan vođenja) omjer bakterija i kvasaca kod oba kisela tijesta je veći u odnosu na uzorak s T-550 nakon 7 dana vođenja i uzorak T-850 nakon 14 dana vođenja. Ovakav rezultat je u skladu s očekivanjima, budući da su uzorci od nultog dana pripremljeni direktnim dodatkom starter kulture koja uz prirodnu mikrofloru brašna čini ukupnu mikrobnu populaciju kiselog tijesta. S druge strane, u uzorcima nakon 7 i 14 dana vođenja je kao inokulum korišteno već fermentirano kiselo tijesto, stoga je omjer 5:1 opravdan. Dobiveni rezultati potvrđuju teoriju Gobbettia i Gänzlea (2012) koja navodi da su bakterije mliječne kiseline dominantni mikroorganizmi u kiselom tijestu.



Slika 21. Razlika u omjeru poraslih kolonija bakterija i kvasaca kod uzorka kiselog tijesta s brašnom T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) nakon prve fermentacije (nultog dana vođenja)

Nadalje, održivost broja bakterije *Lpb. plantarum* te kvasca *S. cerevisiae* na razini početnog broja unatoč 14-dnevnom razrjeđivanju kulture dnevnim prihranjivanjem odnosno osvježavanjem kulture, pokazuje robusnost kulture i upućuje da je odabranim načinom vođenja sa zadržavanjem 10 % kiselog tijesta (na brašno) moguće održavati kulturu aktivnom kroz 14 dana prihranjivanja.

4.3. ODREĐIVANJE FERMENTACIJSKIH KARAKTERISTIKA KISELOG TIJESTA

Fermentacijske karakteristike svih uzoraka kiseloga tijesta ispitane su kroz određivanje pH vrijednosti, ukupne titracijske kiselosti (TTA) i koncentracije metabolita.

4.3.1. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost koja predstavlja jakost kiselina u kiselom tijestu, izmjerena je pH-metrom nakon fermentacije kiselog tijesta od 18 sati pri različitim temperaturama. Mjerenje je provedeno direktno u uzorcima kiseloga tijesta te u suspenzijama dobivenima homogenizacijom kiselog tijesta s destiliranom vodom. Dobiveni rezultati za uzorke s različitim tipom pšeničnog brašna (T-550 i T-850), omjerom brašno:voda (1:1 i 1:2) odnosno prinosom tijesta (DY 200 i DY 300) te temperaturom fermentacije (25, 30 i 40 °C) su prikazani u tablicama 12 i 13.

Tablica 12. pH vrijednosti kiselih tijesta (KT) s pšeničnim brašnom T-550

OPIS UZORKA (T-550)		pH KT	pH SUSPENZIJE KT
1:1 DY (200)	25 °C	4,48	4,60
	30 °C	3,98	4,32
	40 °C	4,64	4,81
1:2 DY (300)	25 °C	4,34	4,60
	30 °C	3,94	4,19
	40 °C	4,53	4,68

Tablica 13. pH vrijednosti kiselih tijesta (KT) s pšeničnim brašnom T-850

OPIS UZORKA (T-850)		pH KT	pH SUSPENZIJE KT
1:1 DY (200)	25 °C	4,76	4,83
	30 °C	3,96	4,16
	40 °C	5,03	5,08
1:2 DY (300)	25 °C	4,60	4,79
	30 °C	3,92	4,22
	40 °C	4,41	4,60

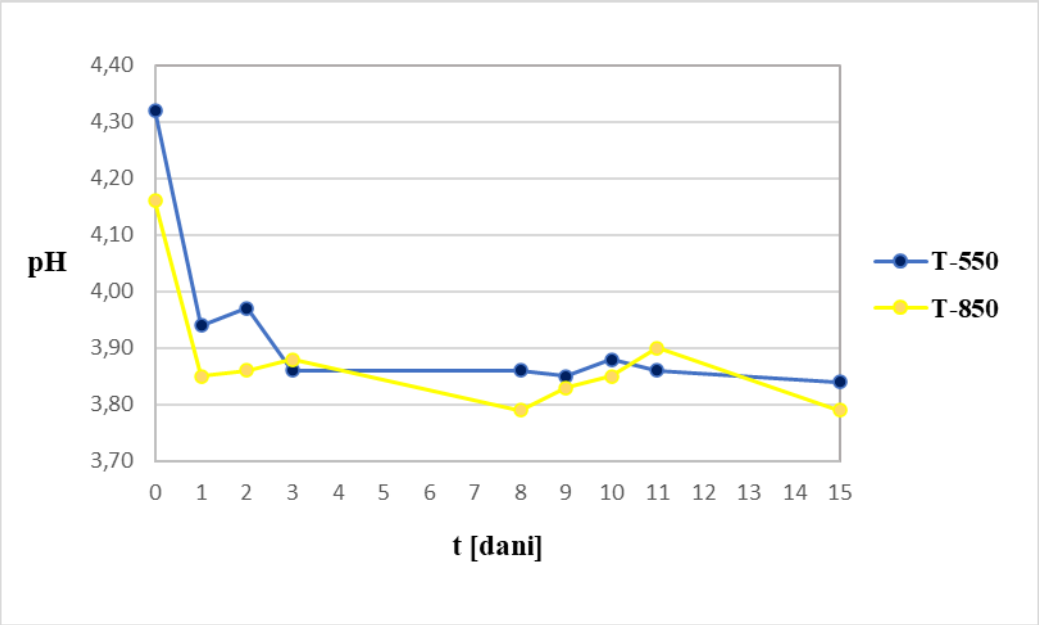
Izmjerene pH vrijednosti u orginalnim uzorcima kiselog tijesta su manje, ali ne značajno u odnosu na one u suspenzijama gdje su veće vrijednosti i očekivane zbog razrjeđenja destiliranom vodom. pH vrijednosti u uzorcima s brašnom T-550 su također neznatno niže u usporedbi s uzorcima pripremljenim s brašnom T-850. S druge strane, različite temperature fermentacije bilježe promjene pH vrijednosti kiselog tijesta na skali od 3,92 do 5,08.

Jedan od parametara koji utječe na proces fermentacije je temperatura. Neovisno o korištenom tipu pšeničnog brašna i prinosu tijesta, uzorci koji su fermentirani na 30 °C se izdvajaju od drugih uzoraka zbog nižih pH vrijednosti (kako u direktno izmjerenim uzorcima tako i u suspenzijama). U usporedbi s literaturnim podacima, granice u kojima se nalaze izmjerene pH vrijednosti pokazatelji su da je dobiveno tijesto kiselo. Općenito, pH vrijednosti između 3,5 i 4,3 smatraju se pokazateljima dobro razvijene fermentacije kiselog tijesta (Gobbetti i Gänzle, 2012). Brojne studije vezane uz kisela tijesta, a pogotovo usko vezane uz parametre fermentacije kiselog tijesta naglašavaju temperaturu fermentacije od 30 °C optimalnom, a onda i najčešće odabranom za proizvodnju kiselog tijesta. Podloga za to se može naći u literaturinim navodima Gobbettia i Gänzlea (2012). Naime, BMK su dokazano najbrojnija mikrobna populacija kiselog tijesta koja je odgovorna za snižavanje pH vrijednosti zbog sposobnosti zakiseljavanja. Pripadaju mezofilima čija je optimalna temperatura rasta između 30-35 °C. S druge strane, termofilne bakterije ne pokazuju mogućnost rasta na temperaturama manjima od 40 °C iz čega je opravdan naglasak optimalne temperature fermentacije kiselog tijesta u rasponu od 25 do 30 °C (Gobbetti i Gänzle, 2012). Iz navedenoga, može se zaključiti pozitivna korelacija između temperature fermentacije i pH vrijednosti kiselog tijesta kao vrlo važnih parametara fermentacije.

Uspoređujući dobivene rezultate mjerenja pH vrijednosti s obzirom na tip korištenog pšeničnog brašna za pripremu kiselog tijesta, može se zaključiti da su razlike u pH vrijednostima minimalne. U prilog tome može se navesti studija Ercolini i sur. (2013) u kojoj su proučavana kisela tijesta s raženim brašnom te dvije vrste pšeničnog brašna, s vrstom pšenice *Triticum durum* i *Triticum aestivum*. Nakon fermentacije od 5 sati pri 25 °C, postignute pH vrijednosti kiselih tijesta pripremljenih s pšeničnim brašnima bile su gotovo identične te s vrlo malom razlikom prema pH vrijednosti kiselog tijesta s raženim brašnom.

Također, različiti prinos tijesta (DY) u ovom radu nije pokazao značajan utjecaj na pH vrijednost nakon 18 sati ferementacije. Odstupanje od navedenog primjećeno je kod oba uzorka kiselog tijesta pripremljenog s brašnom T-850 i temperaturom fermentacije 40 °C gdje kiselo tijesto s DY 200 ima veću pH vrijednost u odnosu na razrjeđeni uzorak čiji je DY 300. Dobiveni rezultat se može povezati s mogućom povećanom proteolitičkom aktivnošću mikroorganizama kiselog tijesta zbog većeg volumena vode (Hernández-Parada i sur., 2023). Pri odabiru omjera brašna i vode za pripremu kiselog tijesta potrebno je s visokom pažnjom proučiti specifičnosti koje svaka sirovina donosi u dobiveno kiselo tijesto. Zbog tehnoloških i analitičkih prednosti, struka sve češće naglašava upotrebu kiselih tijesta s DY između 200 i 300 u industrijskoj primjeni (Falciano i sur., 2022).

Laboratorijski preliminarni pokusi pokazali su temperaturu fermentacije od 30 °C i DY 200 kao optimalnim parametrima za ispitavanje robusnosti starter kulture. Upravo iz tog razloga, kisela tijesta s navedenim karakteristikama i različitim tipom pšeničnog brašna, T-550 i T-850 odabrana su za tehniku vođenja odnosno prihranjivanja tijekom 14 dana. I ovdje su pH vrijednosti izmjerene direktno u uzorcima te u suspenzijama kiselog tijesta. pH svih direktno mjerenih uzoraka nije prelazio vrijednost 4 koja je svaki dan rada bila potvrda dobre aktivnosti starter kulture te da se vođenje može nastaviti. pH profil kiselih tijesta s različitim tipom brašna, T-550 i T-850 prikazan je kroz pH vrijednosti suspenzija, a dobiveni rezultati kroz 14 dana prikazani su na slici 22.



Slika 22. pH profil uzoraka kiselih tijesta pripremljenih s brašnom T-550 i T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) tijekom 14 dana vođenja

Početne pH vrijednosti u T-550 i T-850 kiselom tijestu, ujedno i vrijednosti dobivene nakon prve fermentacije pri 30 °C ili nultog dana vođenja su najviše zabilježene u odnosu na ostale dane vođenja. Idućom fermentacijom vrijednosti naglo opadaju, dok daljnjim ferementacijama pH vrijednosti oba uzoraka slabo variraju i osciliraju, ostajući do kraja vođenja u granicama 3,79-3,97.

Na proces fermentacije kiselog tijesta utječu mnogi unutranji i vanjski čimbenici, a jedan od njih je i sama mikroflora kiselog tijesta (Hernández-Parada i sur., 2023). Tijekom fermentacije mijenjaju se fizikalno-kemijski parametri i to uglavnom zbog mikrobnog metabolizma (Falciano i sur., 2022). pH profil oba analizirana kisela tijesta pokazuje opadanje pH vrijednosti s vremenom vođenja uz neznatne oscilacije. Isto tako, oba uzorka pokazuju najveću pH vrijednost nultog dana vođenja, a najmanju nakon četrnaest dana vođenja. Razlike u pH vrijednostima kiselog tijesta s obzirom na tip brašna nisu značajne te prosječna konačna vrijednost nakon četrnaest dana vođenja iznosi 3,82.

Važnost snižavanja pH vrijednosti tijekom ferementacije, Clarke i sur. (2004) povezuju s reološkim karakteristikama gotovog proizvoda pripremljenog s kiselim tijestom. Naime, smanjenje pH vrijednosti utječe na povećanje topljivosti glutena što u konačnici rezultira povećanjem elastičnosti tijesta i volumena gotovog proizvoda. Isto tako, kiseli medij aktivira cerealne proteaze i peptidaze čime se oslobađaju i nakupljaju slobodne aminokiseline tijekom

fermentacije, koje su važni prekursori arome kruha (Mietton i sur., 2022). Pri nižim pH vrijednostima aktiviraju se i fitaze što rezultira većom biološkom raspoloživošću minerala.

4.3.2. Titracijsko određivanje ukupne kiselosti (TTA)

Ukupna kiselost kiselog tijesta predstavlja mjeru za ukupnu količinu kiselina u kiselom tijestu, a određuje se titracijom s NaOH (Mutak, 2018). Ukupna titracijska kiselost određena je u uzorcima kiselog tijesta homogeniziranim s destiliranom vodom. Uzorcima su izmjerene početne pH vrijednosti, a rezultati TTA su izraženi kao volumen 0,1 mol/L NaOH utrošenog za titraciju do pH 8,5. Dobiveni rezultati za uzorke s različitim tipom pšeničnog brašna (T-550 i T-850), omjerom brašno:voda (1:1 i 1:2) odnosno prinosom tijesta (DY 200 i DY 300) te temperaturom fermentacije (25, 30 i 40 °C) su prikazani u tablicama 14 i 15.

Tablica 14. Ukupna titracijska kiselost kiselih tijesta (KT) s pšeničnim brašnom T-550

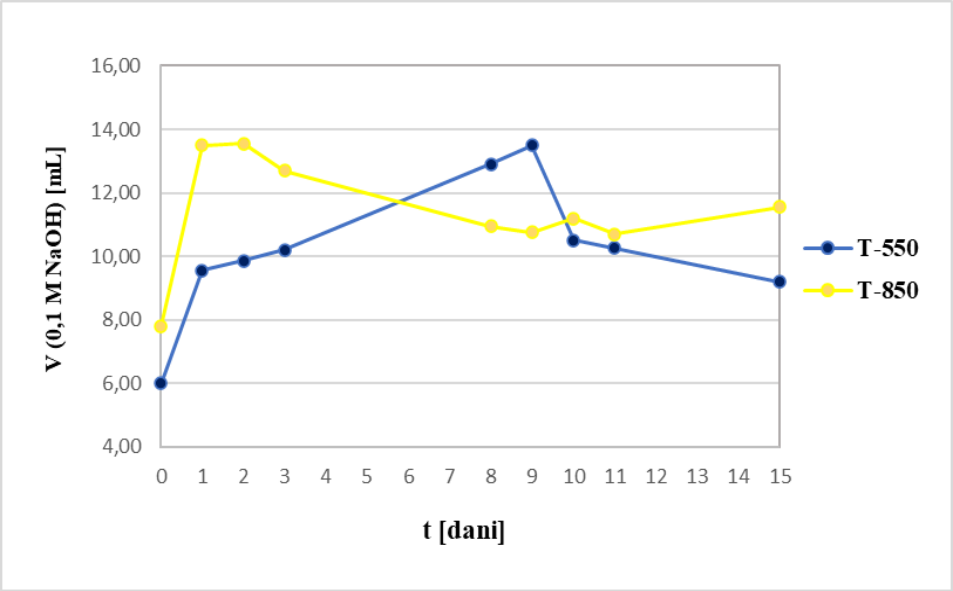
OPIS UZORKA (T-550)		PARAMETAR	
		pH POČETNI	V (0,1 mol/L NaOH) [mL]
1:1 DY (200)	25 °C	4,60	4,00
	30 °C	4,32	6,00
	40 °C	4,81	5,25
1:2 DY (300)	25 °C	4,60	3,40
	30 °C	4,19	4,65
	40 °C	4,68	4,25

Tablica 15. Ukupna titracijska kiselost kiselih tijesta (KT) s pšeničnim brašnom T-850

OPIS UZORKA (T-850)		PARAMETAR	
		pH POČETNI	V (0,1 mol/L NaOH) [mL]
1:1 DY (200)	25 °C	4,83	4,70
	30 °C	4,16	7,80
	40 °C	5,08	5,00
1:2 DY (300)	25 °C	4,79	4,00
	30 °C	4,22	6,00
	40 °C	4,60	5,25

Formiranje organskih kiselina tijekom fermentacije rezultat je metabolizma bakterija mliječne kiseline, naročito vrste *Lpb. plantarum*, ali i dostupnosti fermentabilnih šećera u brašnu (Moore i sur., 2008). S druge strane, kvasci ne pokazuju značajan utjecaj na TTA vrijednosti, budući da organske kiseline nisu primarni produkti alkoholne fermentacije (Ferazz i sur., 2021). Iz rezultata u tablici 15 je vidljivo da je za titraciju uzoraka s brašnom T-850, DY 200 i temperaturom fermentacije pri 30 °C utrošena najveća količina NaOH. Vrlo sličan rezultat dobili su Robert i sur. (2006) koji su provodili feremntaciju kiselih tijesta pri gotovo istim uvjetima. Četiri uzorka kiselog tijesta s različitim starter kulturama (dva soja *Lpb. plantarum* i dva soja *Leuconostc* sp.) fermentirana su pri 28 °C kroz 20 sati. Titracijom uzoraka do pH 8,5 ukupna kiselost iznosila je 7,30 mL za uzorke s *Lpb. plantarum*, dok je za oba uzoraka s *Leuconostc* sp. ta vrijednost bila manja, 7,00 mL. Prema prikazanim rezultatima u tablicama 14 i 15, uzorci koji se isto tako ističu većom potrošnjom NaOH za neutralizaciju kiselina su uzorak s brašnom T-850, DY 300 i temperaturom fermentacije pri 30 °C te s brašnom T-550, DY 200 i temperaturom fermentacije pri 30 °C, dok svi uzorci čija se fermentacija odvijala pri 25 °C imaju najmanju ukupnu kiselost. Mantzourani i sur. (2019) su u svom istraživanju koristili glatko bijelo brašni i starter kulturu, soj *Lacticaseibacillus paracasei* K5, izoliran iz grčkog feta sira. Nakon 24 sata fermentacije pri 30 °C, izmjerena pH vrijednost kiselog tijesta je 3,80, a TTA vrijednost 13,10 mL, što je manja odnosno veća vrijednost s obzirom na dobivene u ovom radu. Razlog odstupanja rezultata može se se pronaći u studiji Giannou i Tizia, (2007) koja navodi da kiselost tijesta ovisi o nekoliko faktora; količini i stanju dodane starter kulture, vrsti i kvaliteti brašna, prinosu tijesta, temperaturi, prisutnosti kisika, stupnju razmnožavanja, dodatku inhibitora fermentacije ili hranjivih stvari.

Ukupna kiselost vođenih uzoraka kroz 14 dana prikazana je na slici 23.



Slika 23. Ukupna titracijska kiselost uzoraka kiselih tijesta pripremljenih s brašnom T-550 i T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) tijekom 14 dana vođenja

Iz priloženog grafičkog prikaza ukupne titarcijske kiselosti, vidljiva je razlika u kretanju TTA vrijednosti analiziranih uzoraka s brašnom T-550 i T-850 kroz 14 dana. Za oba uzorka su karakteristične manje vrijednosti ukupne titracijske kiselosti nultog dana vođenja, a veće nakon 14 dana, s različitom dinamikom između. Ukupna titracijska kiselost uzoraka s brašnom T-550 raste stupnjevito od nultog dana do perioda nakon sedam dana vođenja, nakon čega dolazi do pada koji se nastavlja i nakon 14 dana. Vođeni uzorci s brašnom T-850 pokazuju trend rasta kroz svega nekoliko fermentacija u kojima se i bilježi najveća vrijednost ukupne titracijske kiselosti, a zatim slijedi pad vrijednosti. Ukupna titracijska kiselost za oba uzorka se razvija od nultog dana kada je u rasponu od 6 do 8 mL, preko vrijednosti od 10,95 do 12,90 mL koje se postižu nakon 7 dana, do konačnih u granicama od 9,20 do 11,55 mL nakon 14 dana vođenja. Unatoč tome što nisu uočene značajne razlike između pH vrijednosti vođenih uzoraka s različitim tipom brašna, uzorci s brašnom T-850 u prosjeku imaju veću ukupnu titracijsku kiselost.

Kao i profil pH vrijednosti, profil ukupne titracijske kiselosti se isto tako povezuje s djelovanjem mikroflore kiselog tijesta, točnije BMK s obzirom da kvasci ne pokazuju značajan utjecaj u ovom segmentu. Djelovanje BMK se manifestira kroz njihov rast i sintezu metabolita. BMK za svoj rast i razvoj trebaju niz mineralnih tvari koje dolaze iz korištene sirovine, brašna, pa se povećanje ukupne titracijske kiselosti može pozitivno povezati i s tehnikom vođenja. Također, brašna s većim udjelom pepela, u ovom slučaju je to brašno T-850, pogodovati će intenzivnijem rastu BMK, ali i kvasca te stvaranju metabolita ferementacije (Mrvčić i sur.,

2011). S druge strane, smanjenje TTA vrijednosti se između ostalog može povezati s tehnikom osvježenja kiselog tijesta kroz 14 dana vođenja koja može djelovati kao faktor razrjeđenja kiselog tijesta (Falciano i sur., 2022).

Relativna količina ukupno sintetiziranih organskih kiselina tijekom fermentacije (s naglaskom na količinu mliječne i octene kiselinu) je naročito bitna, s obzirom da ukupna titracijska kiselost predstavlja mjeru istih. Iako je važnost mikroflore kiselog tijesta već navedena, prilikom određivanja ukupne titracijske kiselosti vođenih uzoraka potrebno je uzeti u obzir i robusnost starter kulture.

4.3.3. Određivanje koncentracije metabolita UPLC metodom

Koncentracije odabranih metabolita u uzorcima kiselog tijesta određene su tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (UPLC). Tijekom fermentacije kiselog tijesta odvijaju se brojne biokemijske reakcije povezane s metabolizmom BMK i kvasaca, a produkti tih kataboličkih reakcija su alkoholi, organske kiseline, karbonilni spojevi te spojevi arome. Ciljani metaboliti čije su koncentracije određene u ovom radu su etanol, glicerol, mliječna i octena kiselina. Dobiveni rezultati za uzorke s različitim tipom pšeničnog brašna (T-550 i T-850), omjerom brašno:voda (1:1 i 1:2) odnosno prinosom tijesta (DY 200 i DY 300) te temperaturom fermentacije (25, 30 i 40 °C) su prikazani u tablicama 16 i 17.

Tablica 16. Koncentracije ciljanih metabolita određene u uzrocima kiselih tijesta (KT) s pšeničnim brašnom T-550

OPIS UZORKA (T-550)		METABOLIT			
		g MLIJEČNA KISELINA [mg/g]	g OCTENA KISELINA [mg/g]	φ ETANOL [mL/g]	g GLICEROL [mg/g]
1:1 DY (200)	25 °C	6,908	5,914	1,015	+
	30 °C	8,500	3,565	1,040	+
	40 °C	6,390	4,002	1,009	+
1:2 DY (300)	25 °C	8,687	1,777	0,721	+
	30 °C	8,488	2,586	0,818	+
	40 °C	5,057	7,359	0,838	+

*+ - u tragovima ispod limita detekcije

Tablica 17. Koncentracije ciljanih metabolita određene u uzrocima kiselih tijesta (KT) s pšeničnim brašnom T-850

OPIS UZORKA (T-850)		METABOLIT			
		g MLIJEČNA KISELINA [mg/g]	g OCTENA KISELINA [mg/g]	φ ETANOL [mL/g]	g GLICEROL [mg/g]
1:1 DY (200)	25 °C	5,757	3,321	0,732	+
	30 °C	11,749	3,310	1,064	+
	40 °C	4,271	6,398	1,116	+
1:2 DY (300)	25 °C	5,004	3,482	0,741	+
	30 °C	8,555	3,299	0,834	+
	40 °C	5,613	3,306	1,085	+

*+ - u tragovima ispod limita detekcije

Glavni proizvod metabolizma ugljikohidrata homofermentativnih i heterofermentativnih BMK je mliječna kiselina (Martín-Garcia i sur., 2023). Navedenu teoriju potvrđuju i rezultati prikazani u tablicama 16 i 17, gdje su koncentracije mliječne kiseline veće od koncentracija ostalih metabolita za sve uzorke kiselog tijesta. Jedan od glavnih parametara koji utječe na fermentaciju kiselog tijesta je temperatura, budući da većina BMK i kvasaca kiselog tijesta raste u temperaturnom rasponu od 25-37 °C. S obzirom na optimalnu temperaturu razmnožavanja BMK kiselog tijesta između 30 i 35 °C, svi uzorci čija se fermentacija provodila pri 30 °C očekivano imaju najveću koncentraciju mliječne kiseline. Uzorak koji se ističe najvećom koncentracijom pripremljen je s brašnom T-850 uz DY 200, dok je koncentracija mliječne kiseline ostalih uzoraka fermentiranih na 30 °C približno ista. Nastavno na navedeno, u skladu s očekivanjima je i da uzorci ferementirani pri nižim odnosno višim temperaturama od 30 °C imaju niže koncentracije mliječne kiseline. Uzorak T-550 s temperaturom fermentacije 25 °C i DY 300 pokazuje odstupanje koje se može shvatiti kao utjecaj većeg udjela vode na ubrzano nastajanje kiselina (Mrvčić i sur., 2011).

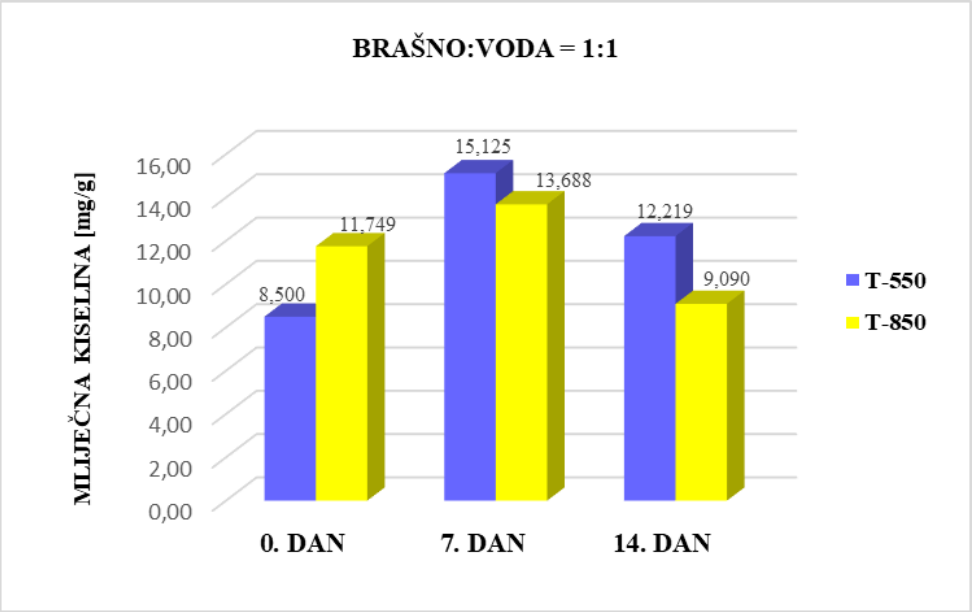
Dok su homofermentativne BMK isključivo zadužene za produkciju mliječne kiseline, metabolizam heterofermentativnih BMK uz 50 % proizvodnje mliječne kiseline, obuhvaća i proizvodnju hlapivih kiselina poput octene kiseline, nehlapivih kiselina, karbonilnih spojeva, etanola i CO_2 (Martín-Garcia i sur., 2023). Prema rezultatima UPLC analize prikazanima u tablicama 16 i 17, vidljivo je da većina uzoraka kiselog tijesta ima niže koncentracije octene kiseline u odnosu na zabilježene koncentracije mliječne kiseline. Isto tako, dobiveni rezultati pokazuju da BMK proizvode najmanje octene kiseline pri temperaturi od 30 °C kada proizvode najviše mliječne kiseline. Ovakav omjer proizvedene mliječne i octene kiseline povezan je s vrstom BMK (homofermentativne ili heterofermentativne) koje dominiraju tijekom

ferementacije, a onda i s njihovim načinom previranja šećera. Naime, rezultati identifikacije korištene starter kulture u ovom radu su pokazali prisutnost *Lpb*. *plantarum*, pa je ova fakultativno heterofermentativna BMK dominantna vrsta BMK u analiziranim kiselim tijestima. Ovu vrstu bakterija karakterizira razgradnja heksoza gotovo u potpunosti do mliječne kiseline (kao i homofermentativne BMK), uz mogućnost razgradnje pentoza također do mliječne kiseline i etanola bez proizvodnje CO_2. S druge strane, obligatno heterofermentativne BMK kiselog tijesta uz mliječnu kiselinu proizvode i octenu kiselinu te etanol i CO_2. Shodno tome, dominantne vrste BMK tijekom fermentacije kiselog tijesta određuju različite koncentracije mliječne odnosno octene kiseline u kiselom tijestu. U prilog dobivenim rezultatima idu navodi Martín-Garcia i sur. (2023) koji ističu vrstu *Lpb*. *plantarum* kao jednu od dominantnih vrsta BMK tijekom fermentacije kiselog tijesta na 30 °C.

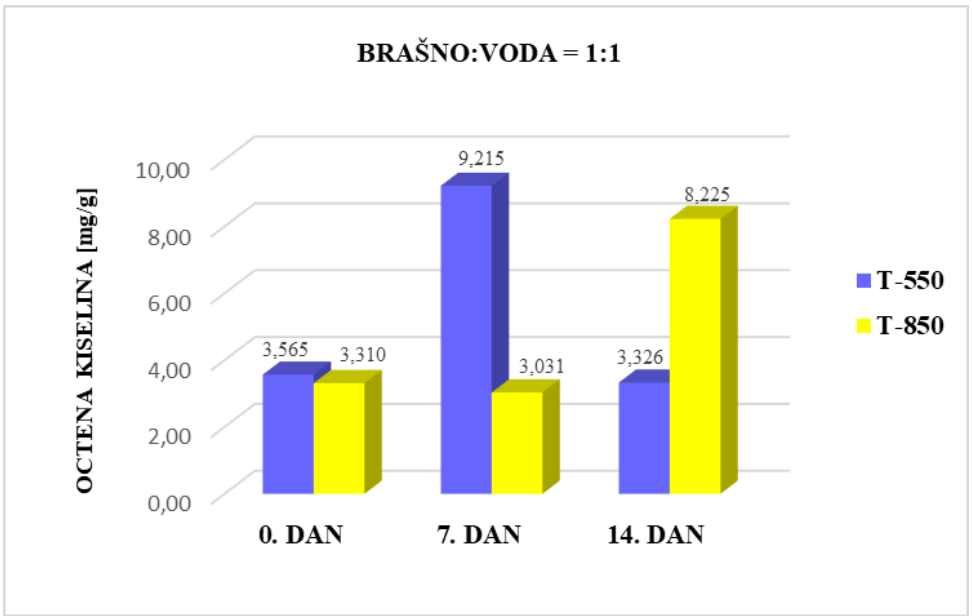
Koncentracija etanola u uzorcima kiselog tijesta primarno je rezultat metabolizma kvasaca, a onda i heterofermentativnih BMK. Iz prikazanih rezultata je vidljiva manja volumna koncentracija etanola u odnosu na masene koncentracije kiselina što je u skladu s brojnim istraživanjima koja navode dominaciju BMK u mikroflori kiselog tijesta. Za razliku od BMK, temperatura fermentacije ne pokazuje značajan utjecaj na metabolizam kvasaca i proizvodnju etanola. Rezultati u tablici 16 i 17 pokazuju da koncentracija etanola blago raste s temperaturom pa uzorci koji su fermentirani pri 40 °C imaju najveću koncentraciju etanola s neznačajnom razlikom prema uzorcima fermentiranim na 30 °C.

Prisutnost trovalentnog alkohola glicerola u kiselom tijestu povezana je s metabolizmom kvasaca. Primarni produkt metabolizma kvasaca u kiselom tijestu je alkohol etanol, dok je koncentracija glicerola zabiljžena u tragovima. Dobivene negativne vrijednosti koncentracija UPLC analizom upućuju na koncentraciju metabolita koja je ispod limita detekcije pa je kod svih uzoraka kiselih tijesta glicerol prisutan u tragovima.

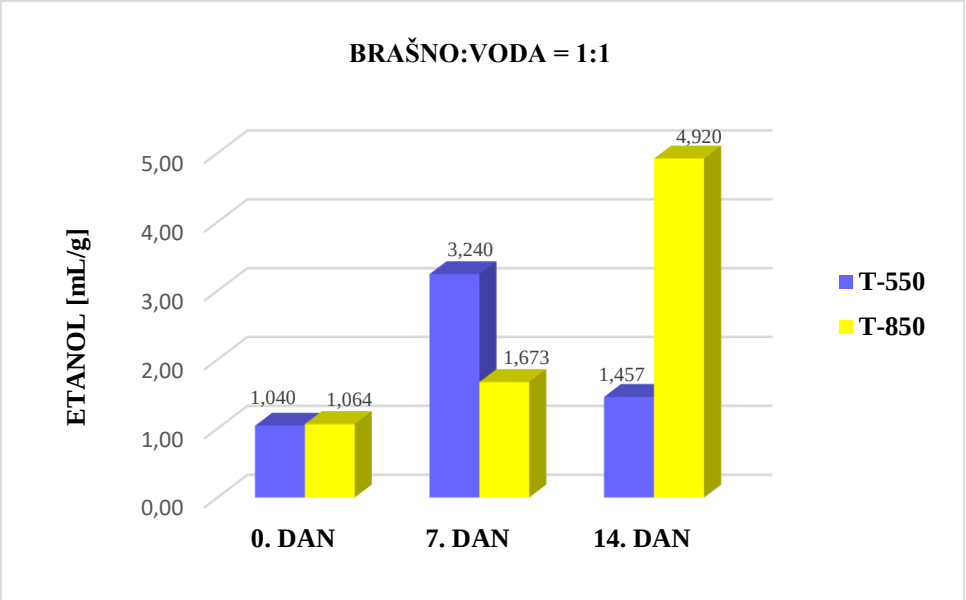
Promjena koncentracija ciljanih metabolita vođenih uzoraka kroz 14 dana prikazana je na slikama 24, 25 i 26.



Slika 24. Promjena koncentracije mliječne kiseline u uzorcima kiselih tijesta pripremljenih s brašnom T-550 i T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) tijekom 14 dana vođenja



Slika 25. Promjena koncentracije octene kiseline u uzorcima kiselih tijesta pripremljenih s brašnom T-550 i T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) tijekom 14 dana vođenja



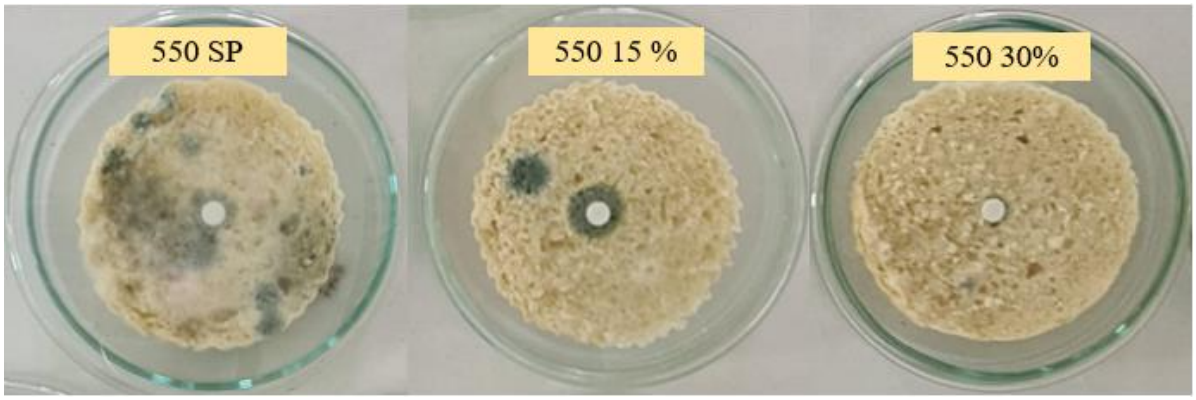
Slika 26. Promjena koncentracije etanola u uzorcima kiselih tijesta pripremljenih s brašnom T-550 i T-850 (DY 200, temperatura fermentacije = 30 °C) tijekom 14 dana vođenja

Jedan od parametara koji utječe na mikrobni ekosustav kiselog tijesta, a onda i na metabolizam BMK i kvasaca je broj koraka fermentacije. S povećanjem broja koraka ferementacije, ovi mikroorganizmi sve više postaju prilagođeni okolišnim uvjetima kiselog tijesta, sve dok ne postanu dominantni u zrelom kiselom tijestu. Prema navodima Ercolini i sur. (2013) zrelo kiselo tijesto se može postići u okviru 5 do 7 dana, ovisno o vrsti korištenog brašna. Nakon nultog dana vođenja kod oba uzorka nema značajne razlike u koncentraciji ciljanih metabolita, dok nakon 7 i 14 dana razlika u koncentracijama odabranih metabolita postaje izraženija. Iz dobivenih rezultata prikazanima na slikama 24-26 je vidljivo da uzorak kiselog tijesta s brašnom T-550 nakon sedam dana vođenja ima najveće koncentracije svih metabolita, od kojih se ističe mliječna kiselina s 15,125 mg/g kiselog tijesta. Uzorak kiselog tijesta pripremljen s brašnom T-850 nakon sedam dana vođenja također bilježi najveću koncentraciju metabolita mliječne kiseline, 13,688 mg/g kiselog tijesta koja je nešto nižu u odnosu na uzorak T-550. Koncentracije ostalih metabolita za vođeni uzorak s T-850 najveće vrijednosti pokazuju nakon 14 dana vođenja. Tako koncentracija etanola u uzorku T-850 raste s brojem koraka fermentacije te najveću vrijednost ima nakon 14 dana. S druge strane, u uzorku T-550 koncentracija sintetiziranog etanola nakon 14 dana približno je jednaka koncentraciji nakon nultog dana te je manja od koncentracije nakon 7 dana kada je zabilježena najviša koncentracije. Naime, obligatne heterofermentativne bakterije kiselog tijesta sintetiziraju octenu kiselinu tijekom heterolaktične fermentacije. U kasnijim koracima ferementacije kada je postignuta pH

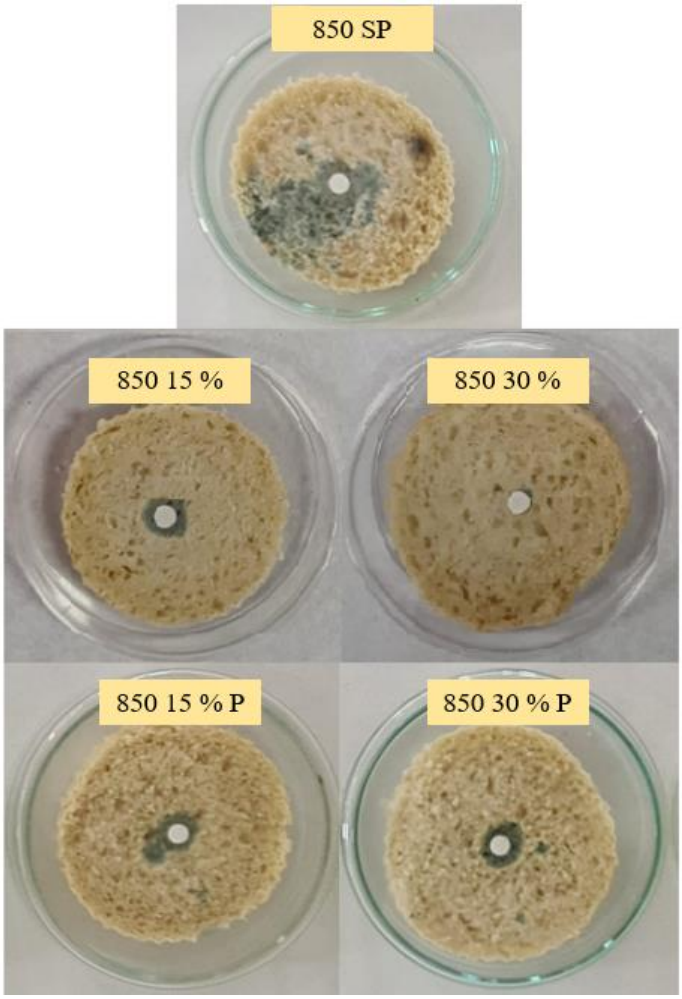
vrijednost oko 4 (slika 22), većina octene kiseline je u nedisociranom obliku čime joj je omogućen prolaz kroz citoplazmatsku membranu u stanicu. Ulaskom u stanicu može doći do inhibicije rasta nekih sojeva kvasca *S. cerevisiae* te smanjenja sinteze etanola i glicerola (Minervini i sur., 2014). U prilog tome idu i rezultati u tablicama 16 i 17 koji nisu brojčano definirani za glicerol zbog njegove koncentracije u tragovima. Ovakav rezultat se mogao i predvidjeti, budući da je ovdje glicerol isključivo produkt kvaščevog metabolizma.

4.4. ANTIFUNGALNA AKTIVNOST KISELOG TIJESTA

Najčešći problemi pekarske industrije današnjice su starenje kruha, kontaminacija plijesnima i nitavo bakterijsko kvarenje. Rezultat mikrobnog rasta očituje se u boji, teksturi, okusu i nutritivnoj vrijednosti kruha i drugih pekarskih proizvoda. Glavni ograničavajući čimbenik njihove trajnosti su plijesni čija proizvodnja mikotoksina može učiniti proizvode nesigurnima za konzumaciju (Sadeghi i sur., 2019, Mrvčić i sur., 2011). U znanstvenim krugovima, veliku pozornost privlače kisela tijesta te njihovo antibakterijsko i antifungalno djelovanje kao pouzdan biološki način za sprječavanje kvarenja kruha. Shodno tome, u ovom istraživanju je ispitana antifungalna aktivnost kiselih tijesta pomoću disk difuzijske metode. Ispitivanje je provedeno sa sporama plijesni *Penicillium* sp. uz vizualni pregled krušnih presjeka na dnevnoj bazi. Ispitavani uzorci su se razlikovali po tipu korištenog pšeničnog brašna (T-550 i T-850) i postotku dodatnog kiselog tijesta (15 i 30 %) u zamjes za pečenje, dok je slijepa proba priređena bez dodatka kiselog tijesta. Korištena kisela tijesta su feremntirana 18 sati na 30 °C. U svrhu ispitivanja antifungalne aktivnosti kiselog tijesta vođenog kroz 14 dana, pripremljena su još dva dodatna uzorka s dodatkom 15 i 30 % kiselog tijesta koje je prihranjivano 14 dana. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 27 i 28.



Slika 27. Razvijena plijesan na horizontalnim krušnim presjecima s brašnom T-550 (oznake: 550 SP - bez kiselog tijesta (KT), 550 15 % - s 15 % KT fermentiranog 18 h, 550 30% - s 30 % KT fermentiranog 18 h)



Slika 28. Razvijena plijesan na horizontalnim krušnim presjecima s brašnom T-850 (oznake: 850 SP - bez kiselog tijesta, 850 15 % - s 15 % kiselog tijesta fermentiranog 18 h, 850 30 % - s 30 % kiselog tijesta fermentiranog 18 h, P - kiselo tijesto vođeno 14 dana)

Antifungalno djelovanje kiselog tijesta proizlazi iz BMK koje tijekom fermentacije produciraju široki spektar metabolita s inhibicijskim djelovanjem na rast plijesni. Količina i vrsta proizvedenih antifungalnih spojeva ovisi o vrsti odnosno soju BMK prisutne u kiselom tijestu. *Lpb*. *plantarum* koja se nalazi u sastavu korištenog startera kojim su pripremljeni svi uzorci kiselog tijesta za analizu, već dugi niz godina pokazuje dominantnost u području istraživanja antifungalne aktivnosti, pa su kao glavni spojevi odgovorni za antifungalni učinak zabilježene mliječna, octena, mravlja, fenil-mliječna i 4-hidroksi-fenil-mliječna kiselina te plantaricin (Russo i sur., 2017; Siepmann i sur., 2018).

Vizualnim pregledom utvrđeno ja da su se plijesni razvile na svim krušnim presjecima nakon 5 dana inkubacije u termostatu pri 30 °C s razlikom u širini zone kontaminacije. Kao što je i vidljivo na slikama 27 i 28, najveću zonu kontaminacije imaju slijepe probe, budući da je u tim

uzorcima izostavljen dodatak kiselog tijesta. Neovisno o tipu brašna, uzorci s dodatkom 15 % kiselog tijesta imaju značajno manji promjer kontaminirane zone u odnosu na slijepe probe, dok oni s 30 % kiselog tijesta pokazuju vrlo slabu kontaminaciju u neposrednoj blizini diska. S obirom na antifungalno djelovanje BMK u kiselom tijestu, s naglaskom na *Lpb*. *plantarum*, dobiveni rezultati su očekivani i u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja. Fenil-mliječna kiselina koju proizvodi *Lpb*. *plantarum* ima široki spektar antifungalnog djelovanja te inhibira rast većinu plijesni. Slično su pokazali i Lavermicocca i sur. (2000) u svom istraživanju gdje su ispitivali antifungalnu aktivnost kiselog tijesta fermentiranog s izolatom *Lpb. plantarum* 21B kao starter kulturom. Rezultati su pokazali pozitivan učinak primjene odabrane starter kulture na odgodu rasta svih najčešćih vrsta plijesni koje kontaminiraju pekarske proizvode, a samim time i na produljenje roka trajanja istih. Isto tako, Russo i sur. (2017) su u svojoj studiji istaknuli važnost *Lpb*. *plantarum* kao prirodnog zaštitnog sredstva protiv plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, and *Cladosporium* koje su najčešće odgovorne za kvarenje proizvoda od žitarica.

Iz slike 28 se može vidjeti da je promjer kontaminacije kod dva uzorka s kiselim tijestom vođenima kroz 14 dana također manja u odnosu na slijepe probe. Uzorak s 30 % kiselog tijesta koje je prihranjivano kroz 14 dana ima nešto veći promjer kontaminacije u odnosu na uzorak s 30 % kiselog tijesta koje je fermentrano 18 sati. Ovakav rezultat se može povezati sa smanjenom sintezom metabolita za antifungalno djelovanje s vremenom vođenja. Iz rezultata prikazanih u potpoglavlju 4.3.3., slika 24, koji se odnose na vođeni uzorak s brašnom T-850, vidljiv je pad koncentracije mliječne kiseline, jednog od spoja koji inhibira rast plijesni, nakon 14 dana vođenja u odnosu na nulti dan vođenja. S druge strane, kao razlog odstupanja rezultata Lavermicocca i sur. (2000) navode različite antifungalne mogućosti BMK u kiselom tijestu koje ne ovise o proizvodnji kiselina. To bi značilo da su možda prisutne i druge supstance koje inhibiraju rast plijesni, ali u nedovoljno visokoj koncentraciji da bi njihovo antifungalno djelovanje bilo učinkovito bez prisutnosti određene koncentracije kiselina.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Kisela tijesta proizvedena su pomoću komercijalne starter kulture, a identifikacija mikrobnih vrsta pokazala je da se kultura sastoji od bakterije mliječne kiseline *Lactiplantibacillus plantarum* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Bakterije mliječne kiseline su dominantni mikroorganizmi kiselog tijesta. Nulti, sedmi i četrnaesti dan vođenja kiselog tijesta broj bakterijskih stanica je bio veći za dva decimalna razrjeđenja u odnosu na broj kvaščevih stanica, neovisno o tipu korištenog pšeničnog brašna.
3. Nakon 14 dana *vođenja* kiselog tijesta, broj poraslih bakterijskih stanica je manji za jedno decimalno razrjeđenje, ali su stanice još uvijek prisutne u velikom broju, oko 10^8 stanica/g kiselog tijesta. Navedeno upućuje na robusnost primijenjene komercijalne starter kulture, ali i na prihvatljivu tehniku *vođenja* kojom je zadržavanjem 10 % kiselog tijesta (na brašno) kao inokuluma za slijedeću fermentaciju moguće održati starter kulturu aktivnom kroz 14 dana prihranjivanja.
4. Fermentacija pri 30 °C pokazala se optimalnom za razvoj zrelog kiselog tijesta s pH vrijednošću oko 4 nakon 18 sati fermentacije.
5. U usporedbi s ostalim metabolitima određenih UPLC metodom, uzorci od obje vrste brašna (T-550 i T-850) kroz 14 dana uzastopnih fermentacija pokazuju najveće koncentracije mliječne kiseline, što proizlazi iz činjenice da je dominantna BMK uzoraka kiselih tijesta fakultativno heterofermentativna BMK *Lpb. plantarum*.
6. Kruščići koji su pripremljeni s dodatkom kiselog tijesta imali su manje zone kontaminacije u odnosu na kruščiće proizvedene bez kiselog tijesta. Dodatak svježe pripremljenog kiselog tijesta u kruh, kao i dodatak kiselog tijesta kontinuirano osvježavanog kroz 14 dana, u iznosu od 15 % odnosno 30 % na brašno, pokazao se kao učinkovita prirodna zaštita za inhibiciju rasta plijesni *Penicillium* sp. s obzirom na sposobnost *Lpb. plantarum* da sintetizira široki spektar spojeva s antifungalnim djelovanjem.
7. Korištenje komercijalne starter kulture olakšava uvođenje kiselog tijesta u proizvodnju kruha u usporedbi sa složenijim procesom razvoja vlastitog startera te njegovim čuvanjem.

6. LITERATURA

1. Akamine IT, Mansoldo FRP, Vermelho AB (2023) Probiotics in the Sourdough Bread Fermentation: Current Status. *Fermentation* **9**, 90. https://doi.org/10.3390/fermentation9020090
2. Aspri M, Tsaltas D (2023) Sourdough Innovations, CRC Press, Boca Raton
3. Bintsis T (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *Microbiol* **4**, 665-684. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665
4. Boreczek J, Litwinek D, Zylinska-Urban J, Izak D, Buksa K, Gawor J, i sur. (2020) Bacterial community dynamics in spontaneous sourdoughs made from wheat, spelt, and rye wholemeal flour. *Microbiologyopen* **9**, e1009. https://doi.org/10.1002/mbo3.1009
5. Boyaci-Gunduz CP, Erten H (2020) Predominant yeasts in the sourdoughs collected from some parts of Turkey. *Yeast* **37**, 449-466. https://doi.org/10.1002/yea.3500
6. Boyaci-Gunduz CP, Agirman B, Gaglio R, Franciosi E, Francesca N, Settanni L, i sur. (2022) Evaluation of the variations in chemical and microbiological properties of the sourdoughs produced with selected lactic acid bacteria strains during fermentation. *Food Chem X* **14**, 100357. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100357
7. Calvert MD, Madden AA, Nichols LM, Haddad NM, Lahne J, Dunn RR, i sur. (2021) A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ* **9**, 11389. https://doi.org/10.7717/peerj.11389
8. Cappelle S, Guylane L, Gänzle M, Gobbetti M (2013) History and Social Aspects of Sourdough. U: Gobbetti M, Gänzle M (ured.) Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 1-10.
9. Carbonetto B, Nidelet T, Guezenec S, Perez M, Segond D, Sicard D (2020) Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough. *Microorganisms* **8**, 240. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020240
10. Clarke CI, Schober TJ, Dockery P, O'Sullivan K, Arendt EK (2004) Wheat Sourdough Fermentation: Effects of Time and Acidification on Fundamental Rheological Properties. *Cereal Chem*, **81**, 409-417. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.3.409
11. Corsetti A, Settanni L (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res Int* **40**, 539-558. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001

12. Corsetti A (2013) Technology of Sourdough Fermentation and Sourdough Application. U: Gobbetti M, Gänzle M (ured.) Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 85-103.
13. De Vero L, Iosca G, Gullo M, Pulvirenti A (2021) Functional and Healthy Features of Conventional and Non-Conventional Sourdoughs. *Appl Sci* **11**, 3694. https://doi.org/10.3390/app11083694
14. Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W (2005) Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 15. izd., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
15. Ercolini D, Pontonio E, De Filippis F, Minervini F, La Storia A, Gobbetti M, i sur. (2013) Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Appl Environ Microbiol* **79**: 7827-7836. https://doi.org/10.1128/AEM.02955-13
16. Falciano A, Romano A, García Almendárez BE, Regalado-Gónzalez C, Di Pierro P, Masi P (2022) Effect of the refreshment on the liquid sourdough preparation. *Ital J Food Sci* **34**, 99-104. https://doi.org/10.15586/ijfs.v34i3.2217
17. Ferraz R, Hickman Flores S, Frazzon J, Cruz Silveira Thys R (2021) The Effect of co-Fermentation on Sourdough Breadmaking using Different Viable Cell Concentrations of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* as Starter Cultures, *J Culin Sci Technol* **19**, 1-17. https://doi.org/10.1080/15428052.2019.1680472
18. Gaglio R, Alfonzo A, Polizzotto N, Corona O, Francesca N, Russo G, i sur. (2018) Performances of Different Metabolic *Lactobacillus* Groups During the Fermentation of Pizza Doughs Processed from Semolina. *Fermentation* **4**, 61. https://doi.org/10.3390/fermentation4030061
19. Gänzle MG, Vermeulen N, Vogel RF (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol* **24**, 128-138. https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.006
20. Giannou V, Tzia C (2007). Frozen dough bread : Quality and textural behavior during prolonged storage-Prediction of final product characteristics. *J Food Eng* **79**, 929-934. http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.03.013
21. Gobbetti M (1998) The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci Technol* **9**, 267-274. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00053-3
22. Gobbetti M, Gänzle M (2012) Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer, New York

23. Gobbetti M, Rizzello CG, Di Cagno R, De Angelis M (2014) How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiol* **37**, 30-40. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.012
24. Goyal RK (1999) Biochemistry of fermentation. U: Joshi VK, Pandey A (ured.) Biotechnology: Food fermentation, Educational Publishers & Distributors, New Delhi, str. 383-426.
25. Graça C, Lima A, Raymundo A, Sousa I (2021) Sourdough Fermentation as a Tool to Improve the Nutritional and Health-Promoting Properties of Its Derived-Products. *Fermentation* **7**, 246. https://doi.org/10.3390/fermentation70402467
26. Grba S (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, Plejada, Zagreb
27. Hanousek Čiča K, Stanzer D, Markov K, Frece J, Mrvčić J (2015) Mikrobiološka kvaliteta komercijalnog pekarskog kvasca na hrvatskom tržištu. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 95-100. Preuzeto s: https://hrcak.srce.hr/file/228165. Pristupljeno 2. listopada 2023.
28. Hansen A, Schieberle P (2005) Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci Technol* **16**, 85-94. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.007
29. Harth H, Van Kerrebroeck S, De Vuyst L (2016) Community Dynamics and Metabolite Target Analysis of Spontaneous, Backslopped Barley Sourdough Fermentations under Laboratory and Bakery Conditions. *Int J Food Microbiol* **228**, 22-32. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.011
30. Hernández-Parada N, González-Ríos O, Suárez-Quiroz ML, Hernández-Estrada ZJ, Figueroa-Hernández CY, Figueroa-Cárdenas JdD, i sur. (2023) Exploiting the Native Microorganisms from Different Food Matrices to Formulate Starter Cultures for Sourdough Bread Production. *Microorganisms* **11**, 109. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010109
31. Hugenholtz J, Smid EJ (2002) Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 497-507. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00367-1
32. Huys G, Daniel HM, De Vuyst L (2013) Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. U: Gobbetti M, Gänzle M (ured.) Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer, New York/Heidelberg/Dordrecht/London, str. 105-154.

33. Lahue C, Madden AA, Dunn RR, Smukowski Heil C (2020) History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. *Front Genet* **11**. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.584718
34. Lau SW, Chong AQ, Chin NL, Talib RA, Basha RK (2021) Sourdough Microbiome Comparison and Benefits. *Microorganisms* **9**, 1355. https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355
35. Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol* **66** 4084-4090. https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000
36. Mantzourani I, Plessas S, Odatzidou M, Alexopoulos A, Galanis A, Bezirtzoglou E, i sur. (2019) Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. *Food Chem* **271**, 259-265. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.183
37. Martín-Garcia A, Riu-Aumatell M, López-Tamames E (2023) Influence of Process Parameters on Sourdough Microbiota, Physical Properties and Sensory Profile. *Food Rev Int* **39**, 334-348. https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1906698
38. Martinez-Anaya MA (2003) Associations and interactions of microorganisms in dough fermentations: Effects on dough and bread characteristics. U: Kulp K, Lorenz K (ured.) Handbook of Dough Fermentations, Marcel Dekker Inc., New York/Basel, str. 62-96.
39. Mietton L, Samson M-F, Marlin T, Godet T, Nolleau V, Guezenec S, i sur. (2022) Impact of Leavening Agent and Wheat Variety on Bread Organoleptic and Nutritional Quality. *Microorganisms* **10**, 1416. https://doi.org/10.3390/microorganisms10071416
40. Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Gobetti M (2014) Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int J Food Microbiol* **171**, 136-146. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021
41. Moore MM, Bello FD, Arendt EK (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. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0659-z
42. Mrvčić J, Mikelec K, Stanzer D, Križanović S, Grba S, Bačun-Družina V, i sur. (2011). Sourdough-Traditional Methods for Improving Quality of Bakery Products. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **6**, 89-99. Preuzeto s: https://hrcak.srce.hr/76214. Pristupljeno 6. srpnja 2023
43. Mutak N (2018) Primjena rogačevog kiselog tijesta u proizvodnji pekarskih proizvoda (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

44. Pérez-Alvarado O, Zepeda-Hernández A, Garcia-Amezquita LE, Requena T, Vinderol G, García-Cayuela T (2022) Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits. *Front Microbiol* **13**, 969460. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969460
45. Poščić A, Karagić K (2023) Kiselo tijesto - zlatni standard u pekarstvu. http://info.timzip.hr/info.asp?info=103&pages=40. Pristupljeno 27. listopada 2023.
46. Poutanen K, Flander L, Katina K (2009) Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiol* **26**, 693-699. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.011
47. Pozo-Bayón MA, Guichard E, Cayot N (2006) Flavor Control in Baked Cereal Products. *Food Rev Int* **22**, 335-379. https://doi.org/10.1080/87559120600864829
48. Robert H, Gabriel V, Lefebvre D, Rabier P, Vayssier Y, i sur. (2006) Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT Food Sci Technol* **39**, 256-265. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.01.013
49. Russo P, Arena MP, Fiocco D, Capozzi V, Drider D, Spano G (2017) *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int J Food Microbiol* **247**, 48-54. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027
50. Sadeghi A, Ebrahimi M, Ali Mortazavi S, Abedfar A (2019) Application of the selected antifungal LAB isolate as a protective starter culture in pan whole-wheat sourdough bread. *Food Control* **95**, 298-307. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.013
51. Sakandar HA, Hussain R, Kubow S, Sadiq FA, Huang W, Imran M (2019) Sourdough bread: A contemporary cereal fermented product. *J Food Process Preserv* **43**, 13883. https://doi.org/10.1111/jfpp.13883
52. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Vancanneyt M, De Vuyst L, Vandamm P, i sur. (2007) Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid 28 bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6262-6269. https://doi.org/10.1128/AEM.00894-07
53. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M (2014) Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **52**, 1089-1097. doi: https://doi.org/10.1128/jcm.02399-13

54. Settanni L, Moschetti G (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol* **27**, 691-697. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023
55. Siepmann FB, Ripari V, Waszczynskyj N, Spier MR (2018) Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. *Food Bioprocess Technol* **11**, 242-270. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1968-2
56. Sieuwerts S, Bron PA, Smid EJ (2018) Mutually Stimulating Interactions between Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces Cerevisiae* in Sourdough Fermentation. *LWT* **90,** 201-206. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.022
57. Stanzer D, Ivanuša I, Kazazić S, Hanousek Čiča K, Mrvčić J (2017) Diversity of lactic acid bacteria on organic flours and application of isolates in sourdough fermentation. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **12,** 44-51. Preuzeto s https://hrcak.srce.hr/189313. Pristupljeno 28. listopada 2023.
58. Thiele C, Gänzle MG, Vogel RF (2002) Contribution of Sourdough Lactobacilli, Yeast, and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for Bread Flavor. *Cereal Chem* **79**, 45-51. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.45
59. Ventimiglia G, Alfonzo A, Galluzzo P, Corona O, Francesca N, Caracappa S, i sur. (2015) Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria duringsourdough fermentation. *Food Microbiol* **51**, 57-68. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.011
60. Venturi M, Guerrini S, Vincenzini M (2012) Stable and non-competitive association of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Candida Miller*i and *Lactobacillus Sanfranciscensis* during manufacture of two traditional sourdough baked goods. *Food Microbiol* **31**, 107-115. https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.011
61. Warburton A, Silcock P, Eyres GT (2022) Impact of sourdough culture on the volatile compounds in wholemeal sourdough bread. *Food Res Int* **161**, 111885. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111885
62. Zhang J, Liu W, Sun Z, Bao Q, Wang F, Yu J, i sur. (2011). Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in inner mongolia of china. *Food Control* **22**, 767-774. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.012

63. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, i sur. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **70**, 2782-2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Helena Kantoci izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Helena Kantoci

_____

Vlastoručni potpis