Utjecaj uvjeta smrzavanja kiselog tijesta na preživljavanje starter kultura

Balić, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:993588

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
(Prehrambena tehnologija)

Ema Balić

6112/PT

UTJECAJ UVJETA SMRZAVANJA KISELOG TIJESTA NA PREŽIVLJAVANJE STARTER KULTURA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija žitarica
Mentor: doc. dr. sc. *Dubravka Novotni*

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

UTJECAJ UVJETA SMRZAVANJA KISELOG TIJESTA NA PREŽIVLJAVANJE STARTER KULTURA

Ema Balić, 6112/PT

Sažetak:

Kako raste potreba za funkcionalnim pekarskim proizvodima, tako je od iznimne važnosti razvitak tehnologije proizvodnje i čuvanja ječmenog kiselog tijesta. U ovom radu je ispitan utjecaj čuvanja ječmenog kiselog tijesta u uvjetima hladnjaka i zamrzivača na preživljavanje starter kultura. Zamrzavanje je provedeno primjenog visokog tlaka, imerzijom ili strujom brzog zraka u šokeru. Kao starter kultura je korištena heterofermentativna bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus reuteri*. Određen je broj živih stanica laktobacila u svježem kiselom tijestu te nakon čuvanja 7, 14 i 28 dana na +4 ili -18^{o}C. Dobiveni rezultati upućuju na to na nije došlo do značajnih promjena u broju živih laktobacila kod zamrzavanja imerzijom i šokerom, dok se zamrzavanjem visokim tlakom značajno smanjio broj živih stanica u kiselom tijestu.U hladnjaku se nije značajno promijenio broj živih stanica laktobacila te nije došlo do pojave plijesni na kiselom tijestu.

Ključne riječi: ječam, kiselo tijesto, *Lactobacillus reuteri*, zamrzavanje

Rad sadrži: 34 stranice, 6 slika, 7 tablica, 44 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. *Dubravka Novotni*

Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. *Dubravka Novotni*

Rad predan: Rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technlogy and Biotechnology

Undergraduate studies - FoodTechnology

Department of Food Engineering

Laboratoy for Cereal Chemistry and Technology

INFLUENCE OF FREEZING CONDITIONS ON SURVIVAL STARTER CULTURES

Ema Balić, 6112/PT

Abstract:

As the need for functional bakery products grows, it is extremely important to develop production technology and methods of preserving barley sourdough. In this study, it is interrogated how cooling and freezing of sourdough will effect on survival of starter culture. Freezing is performed by applying a high pressure, immersion and with cold air in shocker. As a starter culture is used heterofermentative lactic acid bacterium *Lactobacillus reuteri*. Is determined by the number of living cells of lactobacillus in fresh sourdough and after saving 7, 14 and 28 days at +4 or -18 ° C. The results suggest that the there has been no significant change in the number of live lactobacilli in immersion freezing and shocker, while freezing with high pressure significantly reduce the number of viable cells in sourdough. In refrigerator the number of viable cells of lactobacillus did not change significantly and there was no mold on sourdough.

Keywords: barley, sourdough, *Lactobacillus reuteri*, freezing

Thesis contains: 34 pages, 6 figures, 7 tables, 44 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Libraryof the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Ph.D. Dubravka Novotni, assistant professor*

Technical support and assistance: *Ph.D. Dubravka Novotni, assistant professor*

Thesis delivered: September 2015.

Sadržaj

1.UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1 Ječam 2
2.1.1. Sastav ječma 2
2.1.2. Beta-glukan 4
2.1.3. Zdravstvene prednosti ječma 5
2.2 Kiselo tijesto 6
2.2.1. Mikroflora kiselog tijesta i mehanizam djelovanja kiseljenja tijesta 6
2.2.2. Tehnološki procesi u pripremi kiselog tijesta 10
2.2.3. Prednosti proizvodnje kruha uz dodatak kiselog tijesta 10
2.2.4. Metode čuvanja kiselog tijesta 13
2.2.5. Ječmeno kiselo tijesto 13
2.3. Lactobacillus reuteri 14
2.4. Ksilanaza 14
2.5. Metode hlađenja i zamrzavanja 15
2.5.1. Visoki tlak 15
2.5.2.Princip djelovanja visokog tlaka 16
2.5.2. Imerzija 17
2.5.3. Brzo smrzavanje strujom hladnog zraka 18
3. EKSPERIMENTALNI DIO 19
3.1. Materijali 19
3.2 Metode rada 20
3.2.1. Uzgoj mikrobnih kultura 20
3.2.2. Priprema kiselog tijesta 21
3.2.3. Metode zamrzavanja kiselog tijesta 22
3.2.4. Mikrobiološka analiza uzoraka 22
4. REZULTATI 24
5. RASPRAVA 28
6. ZAKLJUČAK 30
7. LITERATURA 31

1.UVOD

Ječam je žitarica koja je bogata prehrambenim vlaknima. Redovitom konzumacijom beta-glukana iz ječma se može smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti, jer snižava razinu kolesterola. Također,beta-glukan može štititi organizam od sindroma inzulinske rezistencije.

U današnje vrijeme kada je potražnja za funkcionalnim pekarskim proizvodima sve veća, bitno je istraživanje i razvijanje tehnologije pripreme ječmenog kiselog tijesta, kao i metoda čuvanja kiselog tijesta za industrijsku primjenu. Kiselo tijesto povoljno djeluje na pekarske proizvode od ječmenog brašna na način da produljuje trajnost proizvoda, poboljšava teksturu i volumen, i smanjuje mrvljivost proizvoda.

Bakterije mliječne kiseline su iznimno bitne, jer bez njih kiselo tijesto ne može preživjeti. Kao starter kulture u ovom istraživanju korišten je *Lactobacillus reuteri.* To je heterofermentativna bakterija, koja djeluje kao probiotik, a proizvodi i reuterin koji djeluje antibakterijski na druge mikroorganizme.

Metode čuvanja kiselog tijesta i njihov utjecaj na bakterije mliječne kiseline nisu još u potpunosti istražene, a u ovom radu je ispitan utjecaj smrzavanja kiselog tijesta na preživljavanje starter kulture. Uspoređene su tri metode smrzavanja kiselog tijesta: visoki hidrostatski tlak, imerzija i brzo smrzavanje strujom hladnog zraka. Za usporedbu je kiselo tijesto čuvano i u hladnjaku, pri čemu je vizualno praćeno pojavljivanje plijesni i određen je broj preživjelih kolonija laktobacila. Ispitivanje metoda čuvanja kiselog tijesta i njihov razvitak je bitan iz razloga što je metoda osvježivanja zastarjela metoda i nije praktična u industrijskoj proizvodnji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Ječam

Ječam je jedna od najstarijih kultiviranih žitarica i danas se još u nekim dijelovima svijeta konzumira u velikim količinama, primjerice u Tibetu i Maroku. U zapadnim zemljama se najčešće koristi za prehranu, te u proizvodnji alkohola i slada, a njegova potrošnja u ljudskoj prehrani je u porastu zbog visokog udjela prehrambenih vlakana, pogotovo visokog udjela djelomično topljivog β-glukana koji snižava koncentraciju kolesterola u organizmu. Stanične stijenke endosperma u ječmu su otpornije na degradaciju nego one u pšenici i kukuruzu, pa je zato otpuštanje hranjivih tvari u organizam smanjeno.

Najzastupljenija prehrambena vlakna u ječmu su β-glukan i arabinoksilan, koji su zastupljeni 3-11% i 4-7% u suhoj tvari. Postoji velika razlika između udjela prehrambenih vlakana u različitim tipovima ječma. U ječmu koji nema ljusku je njihov udio manji nego u onima koji imaju ljusku i to upravo zbog nedostatka ljuske koja sadrži veliki udio celuloze (30%), arabinoksilana (35%) i lignana (20%) (Salomonsson i sur., 1980). Udio β-glukana također ovisi o tipu ječma. Ječam s visokim udjelom amiloznog škroba ima i veći udio β-glukana od normalnog ječma.

2.1.1. Sastav ječma

Cjelovito zrno ječma sadrži oko 70% škroba, 10-20% proteina, 5-10% β-glukana, 2-3% lipida i otpilike 2,5% minerala (Quinde i sur., 2004) s ukupnih udjelom prehrambenih i topivih vlakana u rasponu od 11 do 34% i 3-20% zasebno (Fastnaught 2001). Sastav ječma ovisi o genetici, vanjskim faktorima i interakciji između dva faktora (Aman i Newman, 1986).

2.1.1.1. Proteini ječma

Ječam je bogat prolaminskim proteinima (hordeini). Ječam sadrži esencijalne aminokiseline, uključujući treonin, valin, lizin i arginin. Esencijalne aminokiseline su aminokiseline koje se ne mogu sintetizirati u ljudskom tijelu ili se ne mogu proizvesti dovoljno brzo, pa se zato te aminokiseline moraju svakodnevno unijeti u organizam hranom pošto su bitne za metaboličke puteve (Sullivan i sur., 2010).

2.1.1.2. Škrob ječma

Škrob ječma ima veći udio amiloze nego amilopektina. Molekule amiloze zbog svoje ravne strukture imaju veći broj vodikovih veza od amilopektina, te je potrebno više energije kako bi se veze pokidale i kako bi došlo do želatinizacije. Iz tog razloga ječmeni škrob retrogradira brže nego pšenični. Udio amiloze u škrobu ječma može varirati. Najčešće kulture ječma sadrže 20-30% amiloze, dok ječam s visokim udjelom amiloze može imati do 45% amiloze.

2.1.1.3. Lipidi ječma

Sastavni dio nepolarnih lipida u ječmu su triacilgliceroli, a ostatak čine sterolni esteri, diacilglicerol, monoacilglicerol i slobodne masne kiseline, dok polarni lipidi sadrže prvenstveno fosfolipide, linolensku kiselinu (50-60%), palmitinsku (20-30%), oleinsku (10-15%) i linolnu kiselinu (4-9%). Škrobni lipidi su prisutni unutar škrobnih granula koje se nalaze u endospermu ječmenog zrna i u svom sastavu sadrže veliki udio palmitinske kiseline (46%) i malu količinu linolenske kiseline (34%).

2.1.1.4. Mineralne tvari ječma

Udio pepela u ječmu je 2-3%, a najzastupljenije mineralne tvari su fosfor, kalij i kalcij, dok se klor, magnezijev sulfat i natrij nalaze u manjim količinama. Prema istraživanju Bhatty-a (1997), fosfor i kalcij su najzastupljeniji minerali u ječmu (0,21% i 0,25%), a također su pronađeni i kalcij (0,02%), sumpor (0,12%), magnezij (0,08%), željezo (49,9 mg/kg), cink (24,4 mg/kg), mangan (13,9 mg/kg) i bakar (12 mg/kg).

2.1.1.5. Prehrambena vlakna ječma

Vlakna su jako bitna za probavljivost hrane. Mogu se podijeliti na topljiva i netopljiva. Topljiva vlakna se definiraju kao „jestivi dijelovi biljka ili slični ugljikohidrati koji su otporni na probavljivost i apsorpciju u tankom crijevu zajedno s kompletnom fermentacijom u debelom crijevu“, pri čemu netopljiva vlakna prolaze kroz probavni trakt bez apsorbcije i probavljanja (AACC, 2001). Nekolicina autora je dokazala da ječam ima od 11 do 20% vlakna (Virkki i sur.,2004).

2.1.2. Beta-glukan

U posljednje vrijeme potencijalno korištenje beta-glukana iz ječma i iz drugih izvora kao funkcionalna hrana je dobilo veću pažnju. Beta-glukan se može definirati kao funkcionalni sastojak koji osigurava poželjna svojstva u hrani kao što je tekstura, a isto tako ima i sposobnost određenih pozitivnih utjecaja na potrošača.

2.1.2.1. Struktura beta-glukana

Beta-glukan je zajedničko ime za (1→3, 1→4)-β-D-glukane. Beta-glukan je sastavljen od homopolimera D-glukopiranozilnih ostataka, obično poveznanih s dva ili tri β-(1→4) veze odvojene s jednom β-(1→3) vezom (Cui i sur., 2000). Molekularna struktura beta-glukana je dobivena analizirajući oligomere dobivene iz probave beta-glukana koristeći specifične enzime koji cijepaju veze između D-glukopiranozne jedinice. Otprilike 90-95% oligosaharida koje se proizvedu tijekom probave su trisaharidi (3-O-β-D-celobiozil-D-glukoza) i tetrasaharidi (3-O-β-D-celotriozil-D-glukoza), a preostalih 5-10% ne sačinjavaju oligosaharidi. Beta-glukani iz različitih žitarica sadrže istu općenitu molekularnu strukuturu, ali mogu varirati u odnosu β-(1→4) i β-(1→3) veza, kako i u omjeru trisaharida i tetrasaharida (Lazaridou, i sur., 2007).

Mehanizam sinteze β-glukana su objasnili Buckeridge i sur. (2004). Sustav uključuje probavne enzime koji koriste barem jedan enzim koji je nalik celuloza-sintazi koji stvara celobiozil i glikoziltransferazu koja dodaje jednu glikozilnu jedinicu više, te na taj način stvara celotriozil.

2.1.2.2. Beta-glukan u ječmu

Ječam obično sadrži 2-10% β-glukana, a postoje i neke sorte koje mogu imati i do 20% β-glukana (Andersson i sur., 1999). U staničnim stijenkama ječmenog endosperma, 75% od ukupnih polisaharida otpada na β-glukan, a ostatak sačinjavaju arabinoksilanaza, celuloza, glukamanaze i proteini. Takav omjer sugerira kako bi konzumacija ječmenog β-glukana mogla utjecati na smanjene kolesterola, na poboljšavanje metabolizma lipida i na smanjenje glikemijskog indeksa hrane na način da tvori viskozni gel koji usporava apsorpciju šećera i kolesterola. Molekularna masa beta-glukana je isto bitan parametar. U načelu, ječam sadrži β-glukan velike molekularne mase. Takav β-glukan koji ima veliku molekularnu masu ima i

veću viskoznost, što poboljšava viskoznost sadržaja crijeva i na taj način doprinosi mnogim fiziološkim aktivnostima. Bez obzira na viskoznost, dodavanje veće količine β-glukana iz ječma je izazov za proizvođače hrane jer se njegova topljivost i molekularna masa mogu promijeniti tijekom procesiranja hrane (Ames i Rhymer, 2008).

2.1.3. Zdravstvene prednosti ječma

Već dugi niz godina su poznate zdravstvene prednosti prehrane s visokim udjelom vlakana, a što se više istraživanja provodi na tom području, vidljivo je da su zdravstvene prednosti konzumacije vlakana višestruke. Ječam i proizvodi koji sadržavaju ječam se mogu navoditi kao proizvodi koji smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti (FDA, 2005;EFSA,2011).

Istraživanje beta-glukana u zobi i ječmu i njihove zdravstvene pogodnosti pokazuju da redovita konzumacija beta-glukana može smanjiti rizik od srčanih bolesti (FDA, 1997 i 2005). Međutim, da bi ova tvrdnja bila istinita, prehrambeni proizvod mora sadržavati najmanje 0,75 g beta-glukana po obroku. Prema FDA-u potrebno je unijeti 3 g ječmenog beta-glukana na dan kao bi se postiglo smanjenje ukupnog kolesterola i LDL kolesterola, koji je jedan od uzročnika ateroskleroze (FDA, 2006). Smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti je povezano sa sposobnošću ječma da smanjuje razinu kolesterola, a to je najvjerojatnije uzrokovano topljivim prehrambenim vlaknima. Potpuni mehanizam djelovanja topljivih vlakana, pogotovo β-glukana u snižavanju kolesterola nije potpuno poznat, ali se u osnovi vjeruje da topljiva vlakna povećavaju viskoznost u tankom crijevu što dovodi do povećanja izlučivanja žučnih kiselina i kolesterola u debelo crijevo. To dovodi do smanjenja povratka žučnih kiselina u jetru, što znači da se nove žučne kiseline trebaju sintetizirati iz kolesterola u krvi, te se tako smanjuje ukupna količina kolesterola u organizmu. Na viskoznost utječu i koncentracija i molekularna masa molekula β-glukana, te su ta dva faktora važna za prehrambeni učinak ječma. Provedeno je nekoliko studija na životinja u kojima se potvrđuje da β-glukan iz ječma utječe na smanjenje kolestoreola.

Neke epidemiološke studije pokazuju da prehrana bogata cjelovitim žitaricama može štititi organizam od sindroma inzulinske rezistencije (Östman i sur., 2006). Također hrana s niskim glikemijskim indeksom (GI) ima zaštitni potencijal i može smanjiti rizik od stvaranja sindroma inzulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2. Stanične stijenke ječma u hrani koja ga sadrži smanjuju otpuštanje hranjivih tvari u gornji probavni trakt. Studije pokazuju da kruh ili kaša koji sadrže vlakna iz ječma ili β-glukan izoliran iz ječma mogu imati niski GI. Smanjenje

GI je u korelaciji sa sadržajem β-glukana u hrani i s fluidnosti, te indeksom probavnih enzima. Kruh i kaša od ječmenog brašna s normalnim sadržajem prehrambenih vlakana, ipak ne pokazuje uvijek značajnu redukciju GI u odnosu na standardni kruh ili kašu. Hrana od ječma s velikim udjelom vlakana ima veću zasitnost od kruha s bijelim brašnom i poboljšanu toleranciju na glukozu.

2.2 Kiselo tijesto

Kiselo tijesto je tijesto čiji se mikroorganizmi (npr. bakterije mliječne kiseline, kvasci) iz kiselog tijesta ili startera kiselih tijesta, nalaze u aktivnom stanju ili se mogu reaktivirati. Oni su sposobni nakon dodatka brašna i vode neprestano stvarati kiseline (definicija prema Pravilniku za kruh i peciva, 2005). Primjena kiselog tijesta smatra se novim pristupom u rješavanju tehnoloških problema nastalih kao posljedica nedostatka glutena u proizvodnji pekarskih proizvoda.

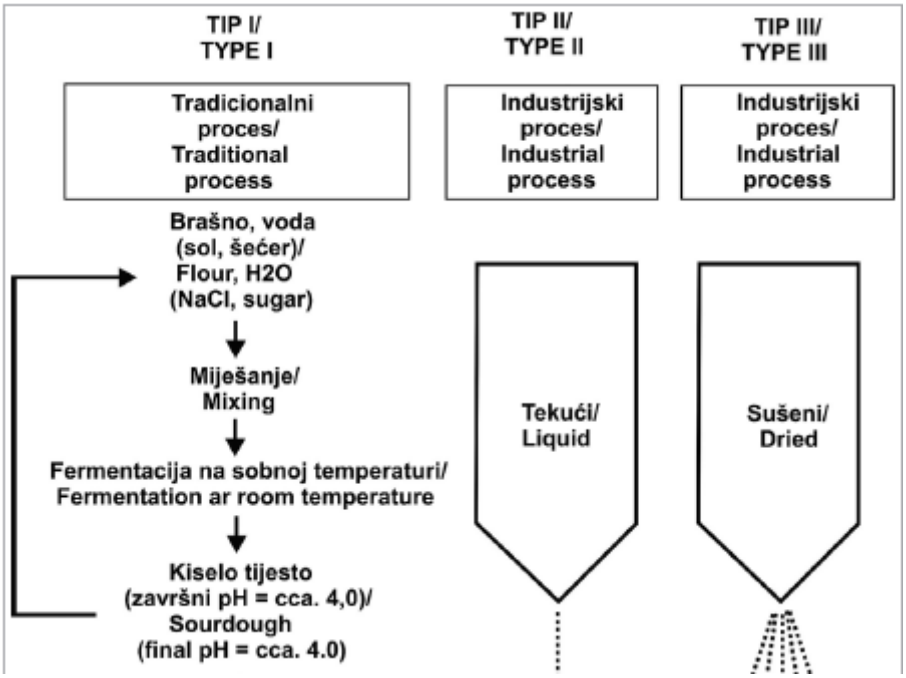
2.2.1. Mikroflora kiselog tijesta i mehanizam djelovanja kiseljenja tijesta

Mikrofloru kiselog tijesta čine bakterije mliječne kiseline (BMK) i kvasci u aktivnom stanju. BMK su dominantni mikroorganizmi u kiselom tijestu (omjer kvasaca/BMK ≈ 1:100) pa reologija, okus i miris te nutritivne karakteristike kruha proizvedenog uz dodatak kiselog tijesta ovise o njihovoj aktivnosti. BMK koje se koriste u kiseljenju tijesta potječu iz samih žitarica, kontaminacije pekarskog kvasca ili same mlinarske i pekarske industrije. Najzastupljenije su vrste iz rodova *Lactobacillus, Pediococcus, Enterococcus, Lactococcus, Weissell*a i *Leuconostoc*. Kao starter kulture u pekarstvu koriste se i homofermentativne i heterofermentativne BMK (Tablica 1). Tijekom fermentacije tijesta BMK proizvode mliječnu i octenu kiselinu te druge metabolite (alkohol, aldehide, estere) što gotovom pekarskom proizvodu daje specifičan kiseli okus i aromu te pozitivno djeluje na tehnološke, mikrobiološke, nutritivne i organoleptičke karakteristike pekarskih proizvoda. Osim BMK u kiselom tijestu može se naći više od 20 vrsta kvasaca, a najdominantniji je pekarski kvasac *S. cerevisiae*. Dizanju tijesta mogu doprinijeti i heterofermentativne BMK pa je posebno bitan stabilan kometabolizam BMK i kvasaca (Gobbetti, 1998). Raznolikost i održivost mikrobnih vrsta u kiselom tijestu znatno ovisi o iskorištenju tijesta (IT=masa tijesta/masa brašna), vrsti brašna i temperaturi, a na osnovu procesa proizvodnje razlikuju se tri vrste kiselog tijesta: Tip

I, Tip II, Tip III (slika1, Bocker i sur., 1995). Fermentacija i kiseljenje u tijestu mogu nastupiti spontano (zbog prirodno prisutnih mikroorganizama u brašnu) ili dodatkom startera kultura. Ovisno o tome razlikuju se prirodna kisela tijesta i definirana kisela tijesta (Spicher i Stephan, 1993).

Tablica 1. Homofermentativne i heterofermentativne BMK (*Corsetti i Settanni, 2007)*

Obligatno heterofermentativne/ Strict heterofermenters		Fakultativno heterofermentativne/ Facultative heterofermenters	Obligatno homofermentativne/ Strict homofermenters
L. acidifarinae	*L. pontis*	*L . plantarum*	*L. amylovorus*
L. brevis	*L. reuteri*	*L. pentosus*	*L. acidophilus*
L. buchneri	*L. rossiae*	*L. alimentarius*	*L. delbrueckii*
L. fermentum	*L. sanfranciscensis*	*L. paralimentarius*	*L. farciminis*
L. fructivorans	*L. siliginis*	*L. casei*	*L. mindesis*
L. frumenti	*L. spicheri*		*L. crispatus*
L. hilgardii	*L. zymae*		*L. johnsonii*
L. panis			*L. amylolyticus*



Slika 1. Vrste kiselog tijesta*(prema Bocker i sur., 1995)*

Tijekom fermentacije, uslijed metaboličke aktivnosti mikroflore kiselog tijesta, događaju se brojne biokemijske promjene ugljikohidrata i proteina brašna, kao i promjene aktivnosti enzima brašna. Brzina i intenzitet ovih promjena direktno utječu na kvalitetu krajnjih pekarskih proizvoda. Mehanizam djelovanja BMK na strukturu tijesta i kruha vrlo je kompleksan i može se podijeliti na primarni i sekundarni učinak zakiseljavanja (Clarke i Arendt, 2005).

A) primarni učinak zakiseljavanja

Vrijednost pH zrelog kiselog tijesta je oko 3,5 – 4,3. Uobičajenim dodatkom oko 20 % kiselog tijesta u glavni zamjes pH vrijednost tijesta smanji se na oko 4,7-5,5 (Collar i sur., 1994), što ima za posljedicu povećanje topljivosti glutena. Naime, Osborne je još 1907. g. dokazao da se topljivost i bubrenje glutena povećava u kiselom mediju zbog prisutnosti velike količine pozitivnog naboja. Ukupni rezultati tih procesa su bitne promjene reoloških svojstava tijesta i posredno volumena kruha i strukture sredine. Povećanje topljivosti glutena ima za posljedicu slabljenje strukture tijesta te lakše i kraće miješanje tijesta, povećanu obradivost i elastičnost tijesta, što omogućuje lakše dizanje tijesta i povećanje volumena kruha. Također je povećana mogućnost vezanja vode što produžuje svježinu kruha.

B) sekundarni učinak zakiseljavanja

Sintezom kiselina tijekom fermentacije odnosno zakiseljavanjem tijesta mijenja se aktivnost enzima prisutnih u brašnu. Smanjenjem pH vrijednosti tijesta povećava se aktivnost proteaza čime se povećava koncentracija slobodnih aminokiselina što povoljno utječe na aromu pekarskih proizvoda. Pri nižem pH povećava se i aktivnost fitaza što povećava biološku dostupnost mineralnih tvari (Lopez i sur., 2001). S druge strane, smanjenjem pH vrijednosti tijesta smanjuje se aktivnost amilaza što povećava svježinu sredine kruha te smanjuje glikemijski indeks pekarskih proizvoda (Ostman i sur., 2002). Ukupni rezultat primarnog i sekundarnog učinka zakiseljavanja tijesta djelovanjem mikroflore kiselog tijesta je povećanje kvalitete kruha i drugih pekarskih proizvoda.

Na fermentaciju kiselog tijesta utječe: vrsta i kvaliteta brašna, vrsta,stanje i količina startera, temperatura, randman tijesta, stupanj razmnožavanja i vrijeme stajanja, prisutnost kvasca, prisutnost kisika, te dodatak hranjivih tvari ili tvari koje inhibiraju proces.

Ti faktori se mogu međusobno kombinirati u različitim odnosima. Ne može se kombinirati proizvoljno, nego treba paziti na međudjelovanje pojedinih faktora.

- Žitni mlinski proizvodi su izvor hrane mikroorganizmima u kiselom tijestu. Mikroorganizmi fermentiraju topljive šećere i na taj način tvore kiseline i aromatične tvari. Tamna brašna sadrže puno topljivih ugljikohidrata i povoljnija su za kiseljenje od svijetlih brašna. Proizvodi od cijelog zrna, prekupe i tamna ražena brašna sadrže više vitamina B_1 (tiamin). On je neophodan za aktivnost bakterije mliječno kiselog vrenja *Lactobacillus safranciscensis* koja daje kisela tijesta najpoželjnijih svojstava.
- Kod umješavanja starter kulture ne vodi se briga samo o unosu poželjnih mikroorganizama. Kultura mora sadržavati dovoljnu količinu bakterija jer inače postoji opasnost od pojave neželjenih mikroorganizama. Naročito pri dugom vođenju kiselog tijesta lako dolazi do izmjene njegove mikroflore. U praksi se za početak vođenja novog kiselog tijesta uzima starter iz zadnjeg stupnja zrelog kiselog tijesta. Nikada se za starter ne uzima dio tijesta iz glavnog tijesta. Starter se može uzgojiti iz relativno male količine svježe starter kulture.
- Broj stupnjeva slijedi u stvari iz izbora vođenja kiselog tijesta. U svakom novom stupnju kiselom tijestu dodaje se ponovno hrana (brašno) i voda. Taj postupak naziva se osvježavanje ili obnova.
- Vrijeme stajanja pojedinog stupnja kiselog tijesta određuje se prema pogonskim potrebama. Kod određivanja vremena stajanja, količina dodanih mlinskih proizvoda, čvrstoća i temperatura kiselog tijesta su promjenjivi.
- Kod određenih vrsta vođenja kiselih tijesta (npr. tučeno ili pjenasto) postiže se ciljano razmnožavanje kvasca. To se događa u pet ili više stupnjeva koji se svi vode vrlo mekano (RT 250). Temperatura kiselog tijesta iznosi 26°C, što je optimalno za uzgoj kvasca. Osim toga, miješanjem se u kiselo tijesto uvodi puno novog kisika što pospješuje razmnožavanje kvasca.
- Randman tijesta određuje čvrstoću kiselog tijesta. To utječe na produkte vrenja i na trajanje kiseljenja. Kisela tijesta s nižim randmanom trebaju fermentirati duže vrijeme. Naprotiv, mekana kisela tijesta zriju brže jer su procesi razgradnje hranjivih tvari, a time i sama fermentacija, ubrzani. Kisela tijesta s nižim randmanom sadrže više octene kiseline. S druge strane, u mekanim kiselim tijestima se stvara više mliječne kiseline.
- Temperatura ima, uz čvrstoću tijesta, veliku utjecaj na aktivnost mikroflore, jer se najveći broj mikroorganizama razmnožava vrlo brzo u toploj okolini. Prema krivulji rasta kiselog tijesta po Böckeru kod viših temperatura se faze odgode postižu u kraćem vremenu. Kod visokih temperatura, mikroorganizmi kiselog tijesta proizvode više

mliječne kiseline, dok se kod nižih temperatura se stvara više octene kiseline. Snižavanjem temperature okoline može se odgoditi vrenje u zrelom kiselom tijestu. Hladnim skladištenjem čak je omogućeno ograničeno držanje zaliha zrelog kiselog tijesta (ali pritom dolazi do izvjesnog naknadnog kiseljenja).

- Zrelost kiselog tijesta se može odrediti mjerenjem kiselinskog stupnja i pH vrijednosti. Krivulja zrelosti kiselog tijesta izgleda slično kao i krivulja rasta, ali ona određuje količinu stvorene kiseline (kiselinski stupanj). U zrelom kiselom tijestu treba se, ovisno o vođenju, postići određeni kiselinski stupanj. Kiselinskim stupnjem izražava se ukupna količina kiseline u kiselom tijestu. Udjeli mliječne i octene kiseline važni su za okus kruha. Povoljan je odnos od 75% do 90% mliječne kiseline prema 25% do 10% octene kiseline. Na skali pH-vrijednosti od 0 do 14, zrelo kiselo tijesto postiže se kod vrijednosti oko 4,5 do 3,2. Kod pH-vrijednosti ispod 3,2 kiselo tijesto je prezrelo.

2.2.2. Tehnološki procesi u pripremi kiselog tijesta

Proces kiseljenja tijesta se može proizvoditi ručno u plastičnim posudama ili posudama za zamjes, ili automatizirano u fermentoru, pri čemu iskorištenje tijesta mora iznositi minimalno 200. Za proizvodnju kiselog tijesta od raženog brašna najviše se primjenjuju višestupanjske metode, od kojih je najčešća trostupanjska, dok se pšenična kisela tijesta proizvode u jednostupanjskom, a vrlo rijetko u dvostupanjskom ili višestupanjskom procesu. Kiselo tijesto može se proizvoditi tradicionalno spontanom fermentacijom ili uz dodatak komercijalnih startera. Komercijalni starteri obavezno sadrže jednu ili više vrsta BMK, a mogu sadržavati i određene vrste kvasaca.

2.2.3. Prednosti proizvodnje kruha uz dodatak kiselog tijesta

Gluten je najvažnija proteinska komponenta pšeničnog brašna koja tijekom pripreme tijesta veže vodu i tvori glutensku mrežu. S obzirom da glutenska mreža ima svojstvo i zadatak da zadržava CO_2 koji nastaje tijekom fermentacije, gluten je direktno odgovoran za teksturu i volumen kruha. Zakiseljavanjem tijesta povećava se topljivost glutena, što znatno mijenja reologiju tijesta. Glutenska mreža je slabija, tijesto je elastičnije i stabilnije te je volumen kruha veći. Ukoliko se proces kiseljenja provede neadekvatno dolazi do pretjerane razgradnje glutena što uzrokuje smanjenje volumena kruha. Kiselo tijesto utječe i na teksturu kruha. Tekstura je općenito označena kao višestruko svojstvo. Najčešća senzorska svojstva teksture

sredine kruha koja se opisuju i kvantificiraju su: elastičnost, čvrstoća, mekoća, ljepljivost, vlažnost i mrvljivost kruha, dok se kod kore kruha najčešće opisuju žilavost i hrskavost. Sredina kruha s kiselim tijestom je čvršća, elastičnija i manje mrvljiva, dok je kora kruha duže vremena hrskavija, zahvaljujući smanjenoj migraciji vode iz sredine prema kori. Zbog smanjene migracije vode kruh s kiselim tijestom zadržava i vlažnost sredine tijekom skladištenja što je povezano s procesom starenja kruha. Naime, pekarski proizvodi imaju vrlo kratko vrijeme trajanja i njihova kvaliteta ovisi o vremenskom periodu između pečenja i konzumacije. U tom periodu odvijaju se brojne fizikalno-kemijske promjene sredine i kore kruha, zajednički nazvane starenje kruha (Gray i Bemiller, 2003). Stoga je uz dodatak kiselog tijesta brzina retrogradacije amilopektina smanjena, a time i brzina starenja kruha (Mrvčić i sur., 2009).

Pojedine BMK kiselog tijesta proizvode razne vrste egzopolisaharida (EPS), glukane (reuteran, dekstran, mutan) i fruktane (levan, inulin) (Bounaix i sur., 2009, Mrvčić i sur., 2010). EPS u tijestu djeluju isto kao i hidrokoloidi (guar guma, ksantan, alginat, pektin) koji su u sastavu aditiva, a koriste se u pekarskoj industriji da bi poboljšali vezanje vode u tijestu, što povoljno utječe na volumen, teksturu, svježinu i rok trajanja kruha.

Drugi pozitivni učinak djelovanja kiselog tijesta na teksturu i starenje kruha zasniva se na sinergističkom djelovanju kiselog tijesta s endogenim i egzogenim enzimima i ostalim sastojcima pekarskih poboljšivača kao što su α-amilaze, proteinaze, pentozani i pentozanaze (Gray i Bemiller, 2003).

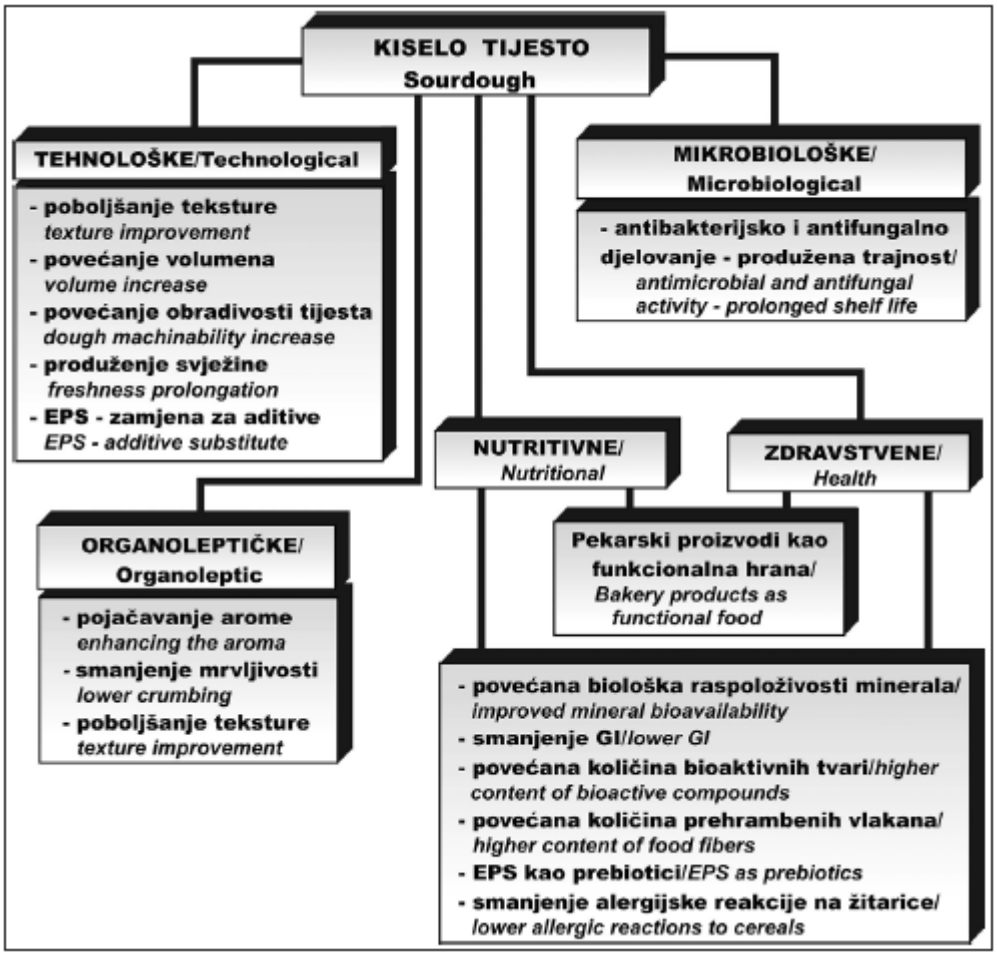
Okus i miris kruha te drugih proizvoda od žitarica glavne su karakteristike u ocjenjivanju njihove kvalitete. Aromu pšeničnog kruha određuje kvaliteta brašna te proces fermentacije i pečenja kruha. Proces pečenja utječe na aromu kore, dok je proces fermentacije odgovoran za aromu sredine kruha. Spojevi koji znatno doprinose aromi kruha su organske kiseline,alkoholi, esteri i karbonilni spojevi. Kruhovi s dodatkom kiselog tijesta iskazuju u usporedbi s direktno proizvedenim kruhovima znatno bolju aromu.

Kruh proizveden uz dodatak kiselog tijesta ima niži glikemijski indeks, povećanu biološku raspoloživost mineralnih tvari, povećanu količinu bioaktivnih komponenti (Liukkonen, 2003), te hidrolizirane frakcije proteina što posredno smanjuje alergijske reakcije na žitarice.

Bioaktivne komponente žitarica, lignani, fenoli, fitosteroli, tokoferoli, tokotrienoli, kao i minerali, smješteni su u ovojnici zrna. Katina i sur. (2007) pokazali su da se kiseljenjem tijesta povećava biološka raspoloživost lignana, ferulinske kiseline te drugih fitokemikalija iz aleuronskog sloja. Kiseljenjem tijesta, zbog niskog pH, stabiliziraju se labilne bioaktivne komponente, posebice β-glukan. BMK koje proizvode EPS mogu zamijeniti hidrokoloide koji

se u sastavu aditiva dodaju za poboljšanje strukture i svježine kruha (Galle, 2011). Sintetizirani egzopolisaharidi, glukani, fruktani te gluko- i frukto - oligosaharidi također mogu djelovati i kao prebiotici. Bakterija *L. sanfranciscensis* proizvodi levan koji pomaže rast bifidobakterija u probavnom traktu, što pozitivno djeluje na zdravlje čovjeka. Također, dekstran može biti razgrađen do propionske kiseline za koju je dokazano da smanjuje razinu kolesterola i triglicerida.

Na slici 2 su prikazane sve prednosti korištenja kiselog tijesta u pekarskoj proizvodnji.



Slika 2. Prednosti korištenja kiselog tijesta (*Mrvčić i sur., 2011)*

2.2.4. Metode čuvanja kiselog tijesta

Metode kojima se kiselo tijesto može čuvati su: osvježivanje, čuvanje u hladnjaku, smrzavanje i sušenje.

Osvježivanje je metoda u kojoj se mala količina iz prethodnog kiselog tijesta uzima i stavlja u novo kako bi se potaknula fermenatacija. Ta metoda je u pekarstvu naporna, te se izbjegava uz pomoć hlađenja, smrzavanja i sušenja.

Lattanzi, Minervini i Gobbetti su 2014. godine proveli eksperiment u kojem su kiselo tijesto (*Lactobacillus plantarum* je korišten kao starter) hladili, smrzavali i sušili kako bi saznali kakve su karakteristike kiselog tijesta nakon reaktivacije. Kiselo tijesto su hladili na 4°C, smrzavali na -20°C (prije smrzavanja na -20°C su tijesto sat vremena hladili na -80°C), a sušili ga na 40°C 20 sati kako bi se postigla relativna vlaga oko 85g/kg. Nakon 7, 30, 60 i 90 dana kiselo tijesto je bilo reaktivirano.

Rezultati su pokazali da nakon 90 dana jedino uzorak koji je bio smrzavan pokazuje djelomičnu očuvanost i aktivnost LAB, dok sušenje i hlađenje pokazuju dobre rezultate do 30 dana čuvanja. Niti jedna metoda nije dala zadovoljavajuće rezultate nakon 60 dana čuvanja.

2.2.5. Ječmeno kiselo tijesto

Ječam je tek neznatno iskorišten od strane pekarske industrije, zbog lošeg učinka na kvalitetu kruha. Primjena kiselog tijesta može biti metoda kojom će se poboljšati kvaliteta ječmenog kruha. Rezultati Maroitti i sur. (2014) pokazali su da se ječmeno kiselo tijesto može koristiti za dobivanje ječmenog kruha s poboljšanom prehrambene vrijednosti. Nadalje, unatoč manjem specifičnom volumenu i gušćim mrvica ječmenog kruha u odnosu na mrvice pšeničnog kruha, nema značajne razlike nakon pečenja i tijekom roka trajanja između te dvije vrste kruha, što potvrđuje mogućnost za uspješno iskorištavanje ječmenog brašna u pekarskoj industriji.

Marklinder i Johansson (1995) su istraživali proizvodnju kiselih tijesta iz ječmenog brašna. Iako je moguće napraviti kiselo tijesto iz ječmenog brašna, tijekom fermentacije se količina β-glukana značajno smanjila, što dovodi do zaključka da se na taj način ne mogu proizvesti kruhovi s velikom koncentracijom β-glukana.

2.3. Lactobacillus reuteri

Lactobacillus reuteri je jedna od bakterija mliječne kiseline koje se nalaze u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja, te se često primjenjuju u probiotičkoj hrani. Može tolerirati nepovoljne ekološke uvjete u probavnom traktu, stvarati kolonije i pomoći epitelnim stanicama da tvore obranu, izbjeći infekciju patogena kompetitivnom isključenosti, i spriječiti određene crijevne smetnje (Lionetti i sur., 2006). Budući da poteškoće crijevnih puteva mogu biti uzrokovane uzimanja antibiotika, te pogrešnim prehrambenim navikama, preporuča se dodatak bakterija mliječne kiseline u prehranu, kako bi poboljšalo zdravlje ljudskog probavnog sustava. *L. reuteri* je obligatni heterofermentativni *lactobacillus* i proizvodi u određenim uvjetima reuterin (ß-hidroksipropionaldehid), antimikrobnu tvar širokog spektra, koja priječi razvoj niza nepoželjnih bakterija, kvasaca, gljiva i protozoa.
Lactobacillus reuteri pokazuje određene pozitivne učinke na zdravlje ljudi te je prepoznat kao probiotik. Međutim, njegova primjena kod smrznute hrane još uvijek nije popularna zbog svoje niskog preživljavanja kod zamrzavanja i skladištenja. Tehnika stanične imobilizacije učinkovito može pokazati učinke na zaštitu mikrobnih stanica kako bi se poboljšala njihova izdržljivost u nepovoljnim uvjetima okoliša, kao i poboljšati njihovu aktivnost i koncentraciju stanica. Stanična imobilizacija koristi za povećanje preživljavanja *L. reuteri* tijekom smrzavanja i skladištenja u cilju razvoja smrznute hrane s probiotičkim učinaka *L. reuteri*, te ona pokazuje potencijal za korištenje *L.reuteri* u smrznutoj hrani.

2.4. Ksilanaza

β-1,4-ksilanoza je sastavni dio hemiceluloze. To je heterogenipolisaharid izgrađen od homopolimerne okosnice koju čine D-ksilopiranoze jedinice povezane β-1,4 vezom i kratki bočni lanci sastavljeni od O-acetila, α-L-arabinofuranozola i α-D.-glukoronilnih ostataka. U hidrolizu polimera ksilanoze je uključeno više enzima poput endoksilanoze, β-ksilozidaze, α-glukuronidaze, α-arabinofuranozidaze i esteraze. No, ključni enzim u hidrolizi okosnice β-1,4-ksilanoze je β-1,4-ksilanaza koja inicira degradaciju kompleksnih polisaharida pomoću mikroorganizama. Provode se mnoga istraživanje vezana za ksilanazu, zbog potencijalne primjene u industriji, i to kao zaseban enzim i u kombinaciji s ostalim enzimima. U životinjskoj prehrambenoj industriji ksilanaza se koristi za povećanje tjelesne mase životinja

na način da prekida arabinoksilanozu na sastojke u hrani, te također smanjuje viskoznost sirovog materijala. Arabinoksilanoza povećava probavnu viskoznost, a smanjuje kontakt probavnih enzima sa supstratima, povećava debljinu sloja slobodne vode koja se nalazi u sluznici, te time smanjuje apsorpciju i djelovanje nutrijenata u piletini.

U zadnjih nekoliko desetljeća se prepoznao tehnološki potencijal ksilanoznih enzima, te se povećala njihova uporaba u pekarstvu. Njihovim korištenjem se poboljšavaju reološka svojstva tijesta, specifični volumen kruha i čvrstoća sredine kruha. Ksilanaza prevodi u vodi netopljivu hemicelulozu u topljivu, čime dolazi do povezivanja vode u tijestu, te se iz tog razloga smanjuje čvrstoća tijesta, a povećava volumen i ujednačava poroznost sredine. To svojstvo ksilanaze je izrazito bitno u industrijskoj proizvodnji, jer se tijesto manje lijepi za strojeve, čime se proizvodnja značajno olakšava.

2.5. Metode hlađenja i zamrzavanja

2.5.1. Visoki tlak

Nagla ekspanzija tehnologije primjene visokih tlakova počela je tijekom 1990–ih, kada tehnologija primjene visokog tlaka postaje jedna od suvremenih tehnika obrade hrane u modernoj prehrambenoj industriji. Konvencionalne toplinske metode obrade kao što su pasterizacija i sterilizacija temelje se isključivo na povećanju mikrobiološke stabilnosti gotovog proizvoda,koji nakon obrade pokazuje osjetna odstupanja u organoleptičkim i senzorskim obilježjima. Obrada hrane visokim tlakovima je nova i vrlo zanimljiva alternativna metoda koja dovodi do minimalnih promjena nutritivnih, senzorskih, organoleptičkih i teksturnih karakteristika tako obrađene hrane. Prednosti utjecaja visokih tlakova uključuju povećanu sigurnost tehnološkog procesa, manji utrošak energije, veću mikrobiološku sigurnost i kao posljedicu toga povećanu dugotrajnost kao i vrijeme skladištenja tako dobivenog visokokvalitetnog gotovog proizvoda.

Potencijal primjene visokog tlaka u komercijalne svrhe je u sljedećim područjima obrade hrane:

- inaktivacija mikroorganizama i enzima
- modifikacija funkcionalnih svojstava biopolimera
- zadržavanje osobina kvalitete (boja, aroma, nutritivna vrijednost)
- postizanje funkcionalnosti prehrambenih proizvoda

Neke od prednosti primjene visokog hidrostatskog tlaka u usporedbi s termičkim tretiranjem su:

- smanjenje utroška toplinske energije, jer se obrada odvija pri sobnoj temperaturi
- eliminiranje utjecaja veličine i geometrije uzorka te skraćivanje vremena tretiranja, jer je širenje tlaka ravnomjerno kroz namirnicu koja se obrađuje
- ne mijenjaju se kovalentne veze, čime ostaju sačuvane komponente arome namirnica
- obrada je ekonomična sa stanovišta potrošnje energije. U trenutku postizanja željenog tlaka, pumpa se zaustavlja, zatvaraju se ventili, a tlak unutar cilindra se održava bez potrebe za daljnjim dovođenjem energije
- postupak obrade je ekološki prihvatljiv, jer koristi samo električnu energiju te nema otpadnih produkata.

Ograničenja primjene ove tehnologije su sljedeća:

- većina hrane obrađene ovom tehnologijom mora se skladištiti i distribuirati na niskoj temperaturi da bi se zadržala organoleptička i nutritivna svojstva
- enzimi iz hrane i bakterijske spore su otporni na djelovanje povišenog tlaka, što zahtijeva primjenu vrlo visokih tlakova za njihovu inaktivaciju (preko 1200 MPa), čime se znatno poskupljuje cjelokupna obrada.

2.5.2.Princip djelovanja visokog tlaka

Postupci obrade hrane visokim hidrostatskim tlakom podrazumijevaju podvrgavanje tekuće ili čvrste hrane, s ambalažom ili bez nje, djelovanju tlaka od 100 do 800 MPa (1200 MPa). Temperatura obrade može se kretati od ispod 0 °C do iznad 100 °C, a vrijeme izloženosti djelovanju tlaka može varirati od nekoliko sekundi do preko 20 minuta.Kao posljedica djelovanja visokog tlaka dolazi do smanjenja obujma sustava na koji se tlak primjenjuje. Sukladno *LeChatelier-Braunovom* zakonu, u uvjetima ravnoteže, zbog djelovanja povišenog tlaka na zatvoreni sustav bit će pospješene one reakcije koje vode smanjenju obujma, dok će nasuprot tome one reakcije koje vode povećanju obujma sustava biti potisnute. Upravo su zbog ovog fenomena nekovalentne kemijske veze (vodikove, ionske i hidrofobne) osjetljive na djelovanje visokog tlaka dok su nasuprot tome kovalentne veze neosjetljive na djelovanje tlaka. Posljedično, komponente hrane velike molekulske mase u kojima je tercijarna struktura

od presudne važnosti za izražavanje funkcionalnih svojstava (npr. bjelančevine, enzimi i polisaharidi) podložne su promjenama konformacije i funkcionalnih svojstava zbog tretiranja visokim tlakom. Nasuprot tome, kao glavna prednost djelovanja visokog tlaka ističe se činjenica da su komponente hrane koje su odgovorne za specifičnu nutritivnu vrijednost i organoleptičke značajke hrane (npr. vitamini i komponente arome), zahvaljujući malom udjelu sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture praktički neosjetljive na djelovanje visokog tlaka.

2.5.2. Imerzija

Ovaj način zamrzavanja je teoretski najefikasniji jer se postiže najbolji kontakt između proizvoda i rashladnog sredstva, odnosno veliki koeficijent prijelaza topline.
Naime, kod takvog zamrzavanja:

- otpor prijenosu topline sveden je na minimum uslijed ostvarenog kontakta proizvoda i rashladnog sredstva
- uslijed velike brzine zamrzavanja pomoću kriogenih tekućina postiže se takva kvaliteta namirnica koja se ne može ostvariti primjenom drugih metoda zamrzavanja.

Rashladna sredstva za zamrzavanje imerzijom mogu se svrstati u dvije kategorije:
1) tekućine s niskom temperaturom koje se hlade indirektnim kontaktom nekim drugim rashladnim sredstvom

- otopine šećera, soli i glicerola. Njihova koncentracija mora biti takva da ostaju tekućine kod –18ºC ili niže temperature.

2) kriogene tekućine (kriogenici)

- To su ukapljeni plinovi s niskim vrelištem. Kao kriogena tekućina se koriste tekući dušik (temperatura vrelišta je -196°C), tekući CO_2 (temperatura vrelišta je -79°C) i freon 12 (temperatura vrelišta je -30°C; nije prikladan za zamrzavanje peciva zbog apsorpcije).

Prednost se zamrzavanja kriogenicima u usporedbi sa zamrzavanjem hladnimzrakom zasniva na boljem prenošenju topline kapljevinama (čak i kad im je temperatura viša od temperature hladnog zraka), što ubrzava postupak i snižava temperaturu. Nedostaci su zamrzavanja kriogenicima u tome što se pritom proizvodi mogu raspucati, pa i raspasti se (osobito u dodiru s kriogenicima vrlo niske temperature). Osim toga, gubici su isparavanjem kriogenika često previsoki za komercijalnu primjenu tih postupaka. Ipak, ti se gubici mogu dovoljno smanjiti

prikladnim mjerama, koje se isplate kad je vrijednost koja se konzervira dovoljno velika. Gubici su to manji što su komadi hrane deblji, što je temperatura hrane na ulazu u aparat za zamrzavanje niža i što je proces u aparatu brži.

2.5.3. Brzo smrzavanje strujom hladnog zraka

Smrzavanje hrane strujom hladnog zraka (šokerom) je metoda gdje se proizvod naglo niskom temperaturom zamrzne, a nakon toga se može čuvati na višim temperaturama od temperature zamrzavanja, te se izbjegnu oštećenja stanice.Nakon odmrzavanja tijesta stanice bakterija su često oštećene ili čak ne prežive odmrzavanje.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za pripremu kiselog tijesta korišteno je integralno ječmeno brašno (Advent, Pula), vodovodna voda, konzumni šećer (Viro, Virovitica), ksilanaza i starter kultura *Lactobacillus reuteri* ((DSM 20016, proizvođač DSMZ, Njemačke).

Za određivanje broja poraslih BMK se koristila MRS agar selektivna podloga. U tablici 2 je prikazan sastav MRS podloge.

Tablica2. Sastav MRS podloge

MRS	
Pepton	10,00 g/L
mesni ekstrakt	10,00 g/L
kvaščev ekstrakt	5,00 g/L
glukoza	20,00 g/L
Dikalij hidrogen fosfat (K_2HPO_4)	2,00 g/L
Natrij acetat	5,00 g/L
Amonij citrat	2,00 g/L
Magnezij sulfat ($MgSO_4$)	0,20 g/L
Mangan sulfat ($MnSO_4$)	0,05 g/L
Tween 80	1 mL

Tablica 3. Reološka svojstva ječmenog brašna

Broj padanja (s)	414
Amilograf (AJ)	1730
Suha tvar (%)	88
Voda (%)	12
Proteini (%)	9,99
Pepeo	

Popis korištene opreme:

- Termostat INB 500 (Memmert, Njemačka)
- Ručni mikser Tefal
- Fermentacijska komora GS1 ED60/40 0600_A-BJDBA (Weisheu, Njemačka)
- Uređaj za brzo smrzavanje ABF 05 (Everlasting, Italija)
- Termostatska cirkulacijska kupelj Huber CC515 (Peter Huber)
- Magnetska mješalica Worke (IKA, Njemačka)
- Centrifuga Rotina 35 (Hetich)
- Vibromikser MS3 basic (IKA, Njemačka)
- pH-elektroda sa zapisivačem podataka (Omega, Stamford, Connecticut, SAD)
- Vaga s analitičkom točnosti 0,01g plb 200-2 (Kern, Njemačka)
- Vodena kupelj SBS40 (Stuart)
- Električno kuhalo (Corona)
- Bunsenov plamenik
- Solarna pipeta (Pipetus)
- Petri ploče
- Jednokratne plastične pipete od 10mL
- Bakto boce 500mL
- Epruvete od 20mL
- Laboratorijske čaše od 150 i 300mL
- Uređaj za smrzavanje imerzijom: OM-CP-QUADTEMP (Four Channel Thermocouple Temperature Recorder, serijski broj P15633)
- ABF05 Everlasting, Italija

3.2 Metode rada

3.2.1. Uzgoj mikrobnih kultura

Kultiviranje bakterija i kvasaca provedeno je u bakto-bocama od 500 mL na 300 mL pripadajuće sterilne podloge (bujona) kroz 48 sati u termostatu pri temperaturi od 30°C. Starter kultura pripremljena je kroz 5 faza. Prvo se u sterilnim uvjetima prenese mala količina

čiste kulture s kosog agara u epruvetu sa sterilnom hranjivom podlogom (10 mL) i inkubirana u termostatu 24 h±2h/ 30±1°C. Zatim je, nakon 24h, sterilnom pipetom uzeto deset kapi sadržaja iz razvijene prve faze u drugu epruvetu sa sterilnom hranjivom podlogom za čistu kulturu (10 mL) i inkubirano u termostatu 24±2h/ 30±1°C. Pet cijelih epruveta druge faze činilo je inokulum za treću fazu (boca sa 300 mL sterilne hranjive podloge), koja je inkubirana u termostatu 48±2h/ 30±1°C. Inkubacija je trajala sveukupno 96 sati a nakon toga cijela količina bujona je centrifugirana 10 minuta na 3000 o/min. Svaka kiveta dva puta je ispirana sa 50 mL sterilne vode i nakon toga je cijela količina dobivene biomase (iz 300 mL bujona) resuspendirana u 100 mL sterilne vode. Stanice su određene u 1 ml inokuluma (biomasa+100 ml SV) na MRS agaru za mikroorganizme iz roda Lactobacillus, a na YM agaru za mikroorganizme iz roda kvasaca.

3.2.2. Priprema kiselog tijesta

Integralno ječmeno brašno pomiješano je s vodom u omjeru 1:1,5, odnosno pomiješano je 700 g brašna i 1050 mL vode. U pojedinim eksperimentima dodan je šećer saharoza u količini od 10% na brašno, i/ili ksilanoza u količini od 20-50 mg/kg na suhu komponentu. Kao starter za pripremu kiselog tijesta korišten je *Lactobacillus reuteri,* u 1 gramu kiselog tijesta se nalazilo 10^{11} živih stanica *Lactobacillus reuteri*. Tijesto je umiješano ručnim mikserom (Tefal,Francuska) na brzini 3 u trajanju od 5 minuta.

Pripremljena su 4 različita zamjesa kiselog tijesta s:

- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus reuteri* + saharoza
- *Lactobacillus reuteri* + ksilanaza
- *Lactobacillus reuteri* + ksilanaza + saharoza

Saharoza se dodaje iz razloga što ona potiče produkciju egzopolisaharida, koji bi mogli biti potencijalna zamjena za hidrokoloide. Ksilanaza se dodaje iz razloga što se smanjuje čvrstoća tijesta, a povećava volumen i tvori ujednačenija struktura sredine kruha.

Tako pripremljena kisela tijesta su stavljena na fermentaciju u fermentacijsku komoru na temperaturu 37°C, a fermentacija je trajala 24 sata.

3.2.3. Metode zamrzavanja kiselog tijesta

Pojedini uzorci fermentiranog kiselog tijesta su stavljeni na čuvanje u hladnjak, te su smrzavani postupkom visokog tlaka, imerzijom i šokerom.

Uzorci koji su smrzavani visokim tlakom su bili smrznuti na -18°C, ali je prethodno temperatura tijesta spuštena na 4°C, a onda je počelo smrzavanje primjenom visokog tlaka. Kao kompresijska tekućina je korištena smjesa glikola i vode, a smrzavanje je trajalo 18 minuta.

Uzorci koji su smrzavani imerzijom su bili smrznuti na -30°C. Kao kompresijska tekućina je korištena smjesa glikola i vode (u omjeru 1:2), a smrzavanje je trajalo 68 minuta.

Uzorci koji su smrzavani u uređaju za brzo smrzavanje su se smrzavali u struji hladnog zraka temperature -37°C. Smrzavanje je trajalo 56 minuta.

Uzorci kiselog tijesta smrznuti visokim tlakom, imerzijom i šokerom, čuvani su u zamrzivaču na -18°C, 14 i 28 dana. Usporedno su uzorci kiselog tijesta čuvani u hladnjaku na 4°C, 7, 14 i 28 dana. Razlog što analiza smrznutih tijesta nije provedena nakon 7 dana je taj što je toprekratki vremenski period pa je ekonomski neisplatljivo.

3.2.4. Mikrobiološka analiza uzoraka

Mikrobiološka analiza uzoraka kiselog tijesta je provedena prema metodi ISO 15214:1998 na slijedeći način: iz 1g kiselog tijesta iz svakog uzorka napravljeno je razrijeđenje s 9mL destilirane vode, te je tako dobiveno prvo razrijeđenje, odnosno 10^{-1}. Potom, iz prvog razrjeđenja, nakon miješanja na vibracijskoj mješalici (vortex), uzeto je 1mL tog uzorka sa sterilnom pipetom i stavljeno u novu epruvetu s 9 mL destilirane vode te je tako dobivenodrugo razrijeđenje, odnosno 10^{-2}. Taj postupak je ponavljan do željenog razrjeđenja, a nakon toga je slijedilo nacjepljivanje uzoraka. Bitno je da se sve odvija u sterilnim uvjetima i da se za svako razrjeđenje uzima nova sterilna pipeta.

Nacjepljivanje je provedeno na način da je 1mL željenog razrjeđenja prenesen u sterilnu Petri ploču. Tako stavljen inokulum je zatim zaliven MRS podlogom, a ploča je zarotirana po ravnoj podlozi kako bi se uzorak ravnomjerno rasporedio. Nakon što se podloga ohladila i skrutnula, stavljen je i drugi sloj podloge iz razloga što *L. reuteri* živi u anaerobnim uvjetima,

pa se dodavanjem drugog sloja pojačavaju anaerobni uvjeti. Prilikom stavljanja podloge je bitno da je temperatura MRS podloge niža od 50°C, kako se ne bi ubile žive stanice *L. reuteri*.

Nakon zalijevanja uzorka s drugim slojem podloge, uzorci su stavljeni u termostat na inkubaciju na temperaturi od 37°C u trajanju od 48 sati.

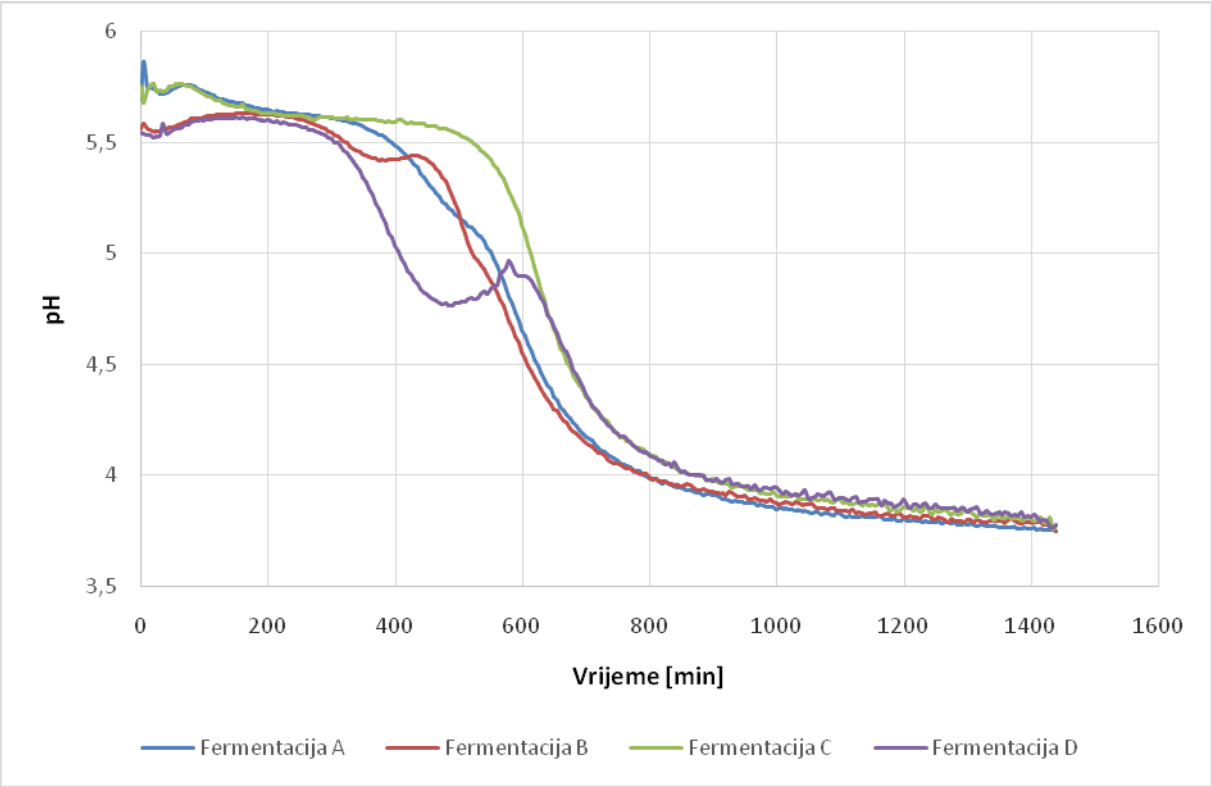
Za svaki uzorak napravljena su dva ponavljanja.

Nakon 48 sati prebrojan je broj poraslih bakterijskih kolonija na pločama. Prebrojane se obje ploče s istim razrjeđenjem, te je izračunata srednja vrijednost.

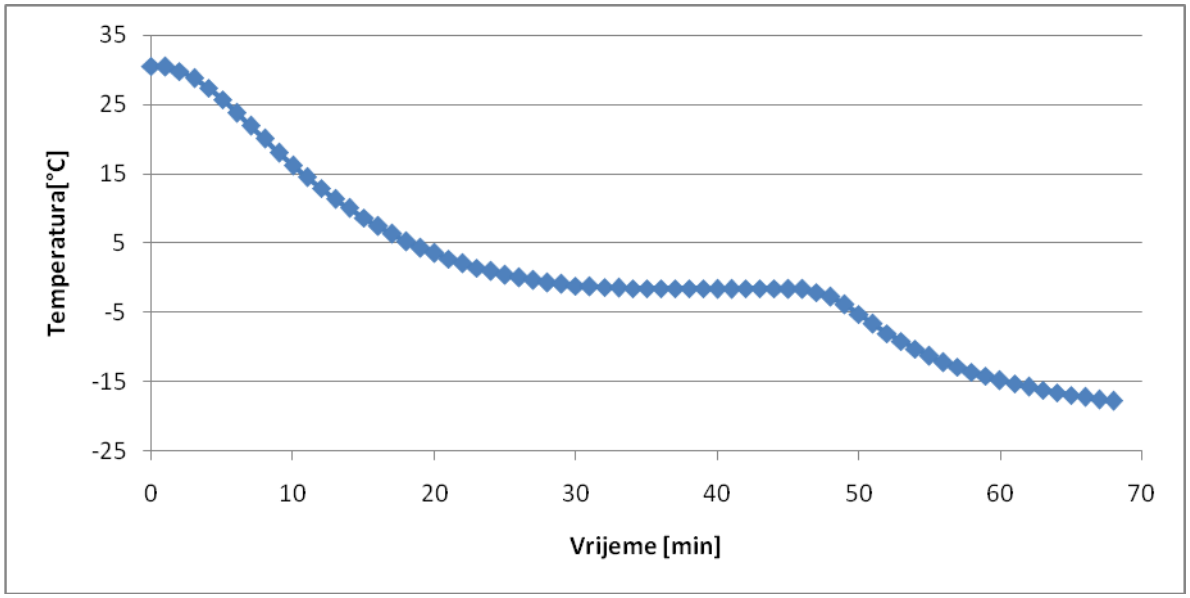
4. REZULTATI

U ovom poglavlju je grafički prikazan pad pH vrijednosti za sva četiri uzorka kiselog tijesta prilikom njihovih fermentacija (slika 3).

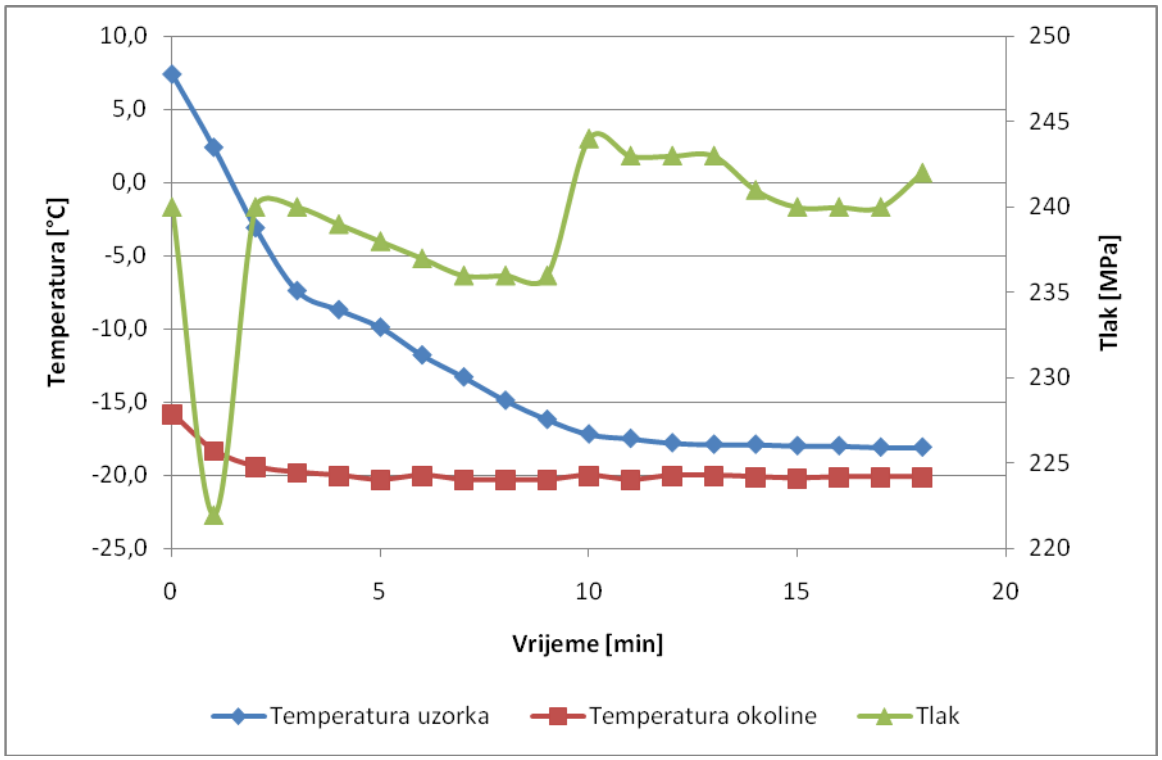
Grafički je prikazana ovisnost temperature smrzavanja o vremenu za različite metode smrzavanja, te su tablično prikazani rezultati određivanja broja živih stanica *Lactobacillus reuteri* prije hlađenja u hladnjaku i smrzavanja, te nakon vađenja iz hladnjaka i odmrzavanja.



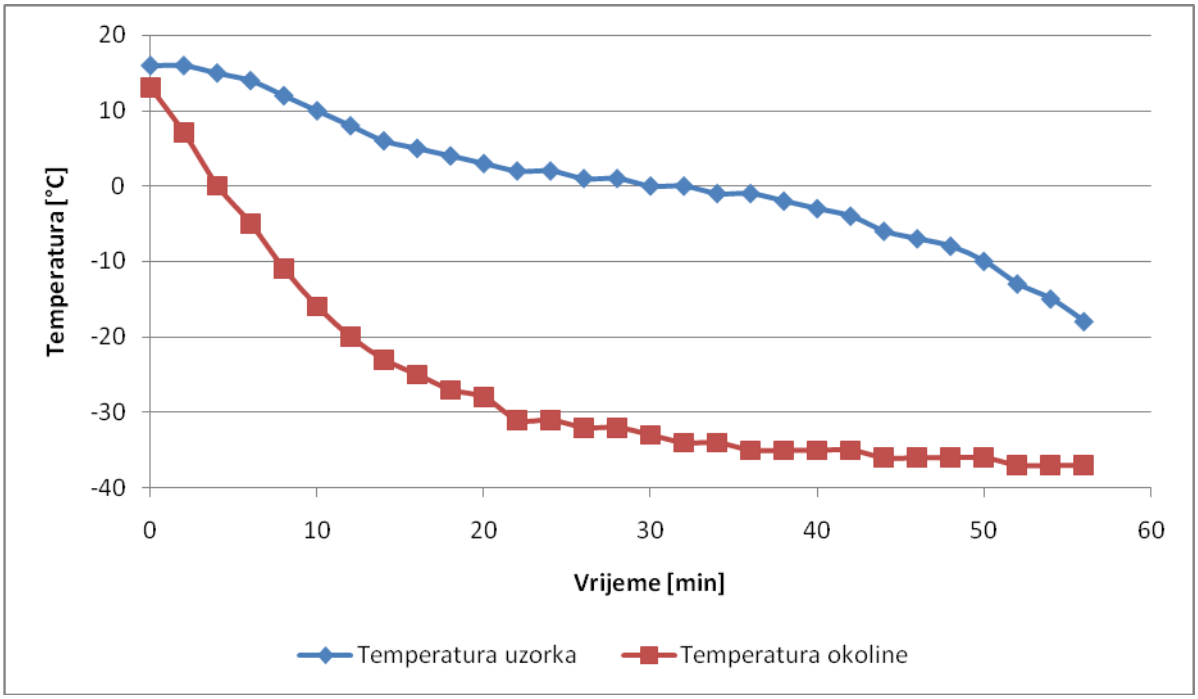
Slika 3. Kinetika kiseljenja tijesta s *L. reuteri* s dodanom saharozom (A), bez dodane saharoze (B), s dodanom ksilanazom (C) te dodanom saharozom i ksilanazom (D)



Slika 4. Tijek postupka zamrzavanja kiselog tijesta imerzijom



Slika 5. Tijek postupka zamrzavanja kiselog tijesta primjenom visokog tlaka



Slika 6. Tijek postupka zamrzavanja kiselog tijesta strujom brzog zraka u šokeru

Tablica 4. Usporedba broja živih stanica u uzorku kiselog tijesta fermentiranog s *L. reuteri* uz dodatak saharoze te čuvanog u hladnjaku ili zamrznutog različitim metodama u odnosu na svježe kiselo tijesto

Vrijeme skladištenja (dani)	**KISELO TIJESTO-UZORAK A**			
0	Početni broj živih stanica $1,7x10^9$			
	Hladnjak +4	Zamrzivač -18		
7	$2,3x10^9$	visoki tlak	šoker	imerzija
14	$1,8x10^9$	$1,8x10^3$	$1,6x10^7$	$2,8x10^7$
28	$1,2x10^9$	$6,5x10^1$	$1,6x10^7$	$5,2x10^7$

Tablica 5. Usporedba broja živih stanica u uzorku kiselog tijesta fermentiranog s *L. reuteri* te čuvanog u hladnjaku ili zamrznutog različitim metodama u odnosu na svježe kiselo tijesto

Vrijeme skladištenja (dani)	**KISELO TIJESTO-UZORAK B**			
0	Početni broj živih stanica $1,9x10^9$			
	Hladnjak +4	Zamrzivač -18		
7	$8,1x10^8$	visoki tlak	šoker	imerzija
14	$1,1x10^9$	$2,1x10^3$	$1,3x10^8$	$1,3x10^8$
28	$7,5x10^8$	$5x10^2$	$1,1x10^8$	$1,3x10^8$

Tablica 6. Usporedba broja živih stanica u uzorku kiselog tijesta fermentiranog s *L. reuteri* uz dodatak ksilanaze te čuvanog u hladnjaku ili zamrznutog različitim metodama u odnosu na svježe kiselo tijesto

Vrijeme skladištenja (dani)	**KISELO TIJESTO-UZORAK C**			
0	Početni broj živih stanica $1,6x10^9$			
	Hladnjak +4	Zamrzivač -18		
7	$1,1x10^9$	visoki tlak	šoker	imerzija
14	$1,1x10^9$	$3,0x10^4$	$6,3x10^7$	$8,8x10^7$
28	$6,2x10^8$	$8,0x10^2$	$5,2x10^7$	$3,7x10^7$

Tablica 7. Usporedba broja živih stanica u uzorku kiselog tijesta fermentiranog s *L. reuteri* uz dodatak saharoze i ksilanaze te čuvanog u hladnjaku ili zamrznutog različitim metodama u odnosu na svježe kiselo tijesto

Vrijeme skladištenja (dani)	**KISELO TIJESTO-UZORAK D**			
0	Početni broj živih stanica $1,56x10^9$			
	Hladnjak +4	Zamrzivač -18		
7	$2,84x10^9$	visoki tlak	šoker	imerzija
14	$1,31x10^9$	$1,47x10^4$	$2,7x10^7$	$4,85x10^7$
28	$8,6x10^7$	$9,5x10^2$	$4,7x10^6$	$1,11x10^7$

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio ispitati kako različiti načini zamrzavanja kiselog tijesta utječu na preživljavanje starter kulture. Kiselo tijesto zamrznuto je metodom visokog tlaka, imerzijom i strujom hladnog zraka (šokerom). Za usporedbu je kiselo tijesto čuvano i u hladnjaku. Uzorci su čuvani 28 dana te je pretpostavka bila da će bakterije preživjeti ove uvjete čuvanja.

Tijekom izvođenja eksperimenta praćena je i potencijalna mogućnost razvitka plijesni na uzorcima koji su se čuvali u hladnjaku.

Lactobacillus reuteri koji je korišten za kiseljenje tijesta je bakterija mliječne kiseline koja ima potencijalno antibakterijsko djelovanje i može tvoriti egzopolisaharide, tako da je uspješnost njegovog preživljavanja poželjna. Na taj način bi se mogli proizvodi funkcionalni kruhovi i ostali pekarski proizvodi. Na slici 3. prikazan je tijek kiseljenja ječmenog tijesta s *L. reuteri* tijekom 24 h na 37°C. U tom vremenu, u svim uzorcima se pH tijesta spustio s početnih 5,9 na krajnjih 3,7. Određena pH vrijednost kiselog tijesta nije se razlikovala ovisno o dodatku saharoze i/ili ksilanaze i tipična je za kisela tijesta (Mariotti i sur., 2014).

Uzorci kiselog tijesta čuvani su u hladnjaku tijekom 28 dana. Tijekom tog perioda došlo je do vrlo blagog pada broja živih stanica laktobacila (tablice 4., 5., 6. i 7.). Kiselo tijesto je bilo zamrznuto na tri različita načina: imerzijom, strujom hladnog zraka i primjenom visokog tlaka. Tijek zamrzavanja kiselog tijesta prikazan je na slikama 4., 5. i 6. Od ispitanih metoda, zamrzavanje imerzijom je bio najsporiji postupak i trajao je 68 minuta da bi se postigla ciljana temperatura od -18 C. Zamrzavanje kiselog tijesta strujom hladnog zraka u šokeru do iste temperature od -18 C postignuto je za 56 minuta. Zamrzavanje kiselog tijesta pomoću uređaja za visoki tlak je bila najbrža metoda - uzorci kiselog tijesta zamrznuti su na -20°C za svega 18 min. Namirnice obrađene visokim tlakovima zadržavaju svoja teksturna i senzorska svojstva jer se obrada vrši pri znatno nižim temperaturama i u vrlo kratkom vremenskom intervalu. Vremenom obrade od samo nekoliko sekundi postiže se minimalna degradacija osnovnih

sastojaka obrađenog proizvoda čime on u potpunosti zadržava svoja funkcionalna svojstva (Bosiljkov i sur., 2010).

Broj živih stanica laktobacila u kiselom tijestu na kraju fermentacije te nakon čuvanja u hladnom i zamrznutom različitim metodama prikazan je u tablicama 4-7. Na kraju fermentacije, u svim uzorcima neovisno o dodatku saharoze i/ili ksilanaze, određen je sličan broj poraslih kolonija laktobacila (10^9). Taj broj živih stanica tipičan je za kiselo tijesto koje ima laktobacile kao starter kulturu (Mariotti i sur., 2014). Čuvanjem kiselog tijesta u hladnjaku na 4°C tijekom 28 dana, došlo je do blagog pada živih stanica laktobacila za jednu potenciju. Uz praćanje broja preživjelih stanica, pratilo se i potencijalni nastanak plijesni. Ni nakon 7, ni 14, ni 28 dana čuvanja tijesta nije došlo do pojave plijesni. Reuterin djeluje kao fungicid (Klantschitsch i sur., 1996) te se pretpostavlja da zbog nastanka reuterina nije došlo do razvoja plijesni.

Uzorci kiselog tijesta koji su bili zamrznuti i čuvani na -18^{o}C su se značajno razlikovali u broju preživjelih stanica. U kiselom tijestu zamrznutom imerzijom ili šokerom, broj živih stanica je bio za 1-2 potencije manji nego li kod svježeg nesmrznutog tijesta. Tijekom 28 dana čuvanja tako zamrznutog kiselog tijesta nije došlo do značajnog pada broja živih stanica. Slični rezultati su dobiveni i u istraživanju Lattanzija i sur. iz 2014. god koji su radilli slično istraživanje u kojem su bakterije mliječne kiseline korištene kao starter kulture, te su sve dobro preživjele odmrzavanje nakon 30 dana (Lattanzi i sur., 2014). Lattanzi i sur. (2014) navode kako se reaktivacija smrznutog kiselog tijesta uspješno može provesti.

S druge strane, zamrzavanje kiselog tijesta primjenom visokog tlaka preživio je znatno manji broj laktobacila (10^3-10^4). Tijekom 28 dana čuvanja tako zamrznutog kiselog tijesta zabilježen je daljni pad broja živih stanica. Visoki tlak se koristi za uništavanje patogenih mikroorganizama i nije primjenjiv za uzorke s probiotičkim BMK, jer učinkovitost mikrobne inaktivacije ovisi i o vrsti mikroorganizma (Stewart i sur., 2006).

6. ZAKLJUČAK

- Fermentacijom integralnom ječmenog brašna s *Lactobacillus reuteri* tijekom 24 h na 37°C, neovisno o dodatku saharoze i/ili ksilanaze, određena je tipična pH vrijednost od 3,7 i broj živih stanica laktobacila od 10^9.
- Od ispitanih metoda, zamrzavanje kiselog tijesta imerzijom je bio najsporiji postupak i trajao je 68 minuta da bi se postigla ciljana temperatura od -18^{o}C. Zamrzavanje kiselog tijesta strujom hladnog zraka u šokeru do iste temperature od -18^{o}C postignuto je za 56 minuta. Zamrzavanje kiselog tijesta pomoću uređaja za visoki tlak je bila najbrža metoda pri čemu su uzorci kiselog tijesta zamrznuti na -20°C za svega 18 min.
- Smrzavanje kiselog tijesta imerzijom i strujom hladnom zraka te njegovo skladištenje tijekom 28 dana u smrznutom se pokazalo zadovoljavajućim, jer je odumiranje laktobacila bilo malo (za jednu potenciju).
- Primjena visokog hidrostatskog tlaka kao metoda zamrzavanja kiselog tijesta se pokazala neprimjenjivom, jer je samo mali broj laktobacila preživio (10^3-10^4).

- Čuvanjem uzoraka kiselog tijesta u hladnjaku nije došlo do pojave plijesni, te se može zaključiti da je *Lactobacillus reuteri* proizveo reuterin, koji djeluje kao fungicid, te je spriječio razvitak plijesni. Nastanak reuterina je bitan, jer zbog njegovog nastanka se kiselo tijesto koje sadrži *Lactobacillus reuteri* kao starter može koristiti za proizvodnju funkcionalnih pekarskih proizvoda.

7. LITERATURA

- AACC. (2001) The definition of dietary fiber, *Cereal Foods World*, **46(3),** 112-126.

- Åman, P., & Newman, C. W. (1986) Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, USA, *J Cereal Sci*, **4**,133-141.

- Ames, N. P., & Rhymer, C. R. (2008) Issues surrounding health claims for barley, *J Nutr*, **138(6)**, 1237-1243.

- Andersson, A. A. M., Andersson, R., Autio, K., & Aman, P. (1999) Chemical composition and microstructure of two naked waxy barleys, *J Cereal Sci*, **30**, 183-191.

- Bhatty, R. S., & Rossnagel, B. G. (1997) Zero amylose lines of hullless barley, *Cereal Chem*, **74**, 190-191.

- Buckeridge, M. S., Rayon, C., Urbanowicz, B., Tine, M. A. S., & Carpita, N. (2004) Mixed linkage (1 / 3),(1 / 4)-β-D-glucans of grasses, *Cereal Chem*, **81(1)**, 115-127.

- Bocker G., Stolz P., Hammes W.P. (1995) NeueErkenntnisse zum Okosystem Sauerteig und zur Physiologiedes sauerteigtypischen Stamme *L. sanfrancisco* und *L. points*.*Getreide Mehl und Brot*, **49**, 370-374.

- Bosiljkov T., Tripalo B., Ježek D., Brnčić M., Karlović S. (2010), Princip rada i primjena visokih tlakova u prehrambenoj industriji, *Kem. Ind.* **59** (11) 539–545

- Bounaix M.S., Gabriel V., Morel S., Robert H., Rabier P.,Remaud-Simeon M., Gabriel B., Fontagne-Faucher C. (2009), Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose bysourdough lactic acid bacteria,*J. Agr. Food. Chem*,**22**, 89-97

- Clarke C., Schober T.J., Arendt E.K. (2002) Effect of singlestrain and traditional mixed strain starter cultures in rheologicalproperties of wheat dough and bread quality. *Cereal Chem*,**79**, 640-647.

- Cui, W., Wood, P. J., Blackwell, B., & Nikiforuk, J. (2000) Physiochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat b-D-glucans, *Carbohydrate Polymers*, **41(3)**, 249-258

- Drobac L. (2011) Primjena mješovitih starter kultura u pripravi kiselog tijesta, Stručni rad

- Elgharbi F., Hmida-Sayari A., Zaafouri Y., Bejar S. (2015) Expression of an A. niger xylanase in yeast: application in breadmaking and In vitro digestion, *International Journal of Biological Macromolecules*

- Fastnaught, C. E. (2001) Barley fibre. U: S. Cho, & M. Dreher (ured.), Handbook of dietary fibre (str. 519-542). New York: Marcell Dekker.

- FDA (Food and Drug Administration) (2005) FDA allows barley products to claim reduction in risk of coronary heart disease, *Federal Register*, 7**0**, 76150–76162.

.

- FDA. (2006) Barley beta-fiber and coronary heart disease. Available at http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06p0393/06p-0393- cp00001-002-vol1.pdf.

- Galle S., Schwab C., Arendt E. K., Ganzle M.G.(2011) Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheatand sorghum sourdough. *Food Microbiology*, Article in Press.

- Gobbetti M. (1998) The sourdough microflora: Interactionsacid bacteria and yeasts.*Trends in Food Science andTechnology*, **9**, 267-274.

- Goering, K. J., Eslick, R., & DeHaas, B. W. (1973) Barley starch: a comparison of the properties of waxy Campana barley starch with the starches of its parents, *Cereal Chem*, **50**, 322-328

- Gray J.A., Bemiller J.N. (2003) Bread staling, Molecularbasis and control Comprehensive Reviews in Food Science andFood Safety, **2**, 1-21.

- Hamaker B.R (2008) Technology od Functional cereal products. U: . Andersson A. A. H i Åman P., Functional barley products (str. 261-281). Westwood

- Katina K., Liukkonen K.H., Kaukovirta-Norja A.,Adlercreutz H., Heinonen S.M., Lampi A.M., Pihlava J.M., Poutanen K. (2007) Fermentation-induced changes in thenutritional value of native or germinated rye, *J Cereal Sci*, **46**, 348-355.

- Lattanzi A.,Minervini F., Gobbetti M. (2014) Assessment of comparative methods for storing type-I wheat sourdough, LWT - *Food Science and Technology*, **59**, 948-955

- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., & Izydorczyk, M. S. (2007, Cereal b-glucans: structures, physical properties and physiological functions. U:. Biliaderis C. G i Izydorczyk M. S. (ured.), Functional food carbohydrates (str. 1-72). Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group

- Liukkonen K.H., Katina K., Wilhelmson A., MyllymakiO., Lampi A.M., Kariluoto S., Piironen V., Heinonen S.M.,Nurmi T., Adlercreutz H., Peltoketo A., Pihlava J.M., Hietaniemi V., Poutanen K. (2003) Process-induced changeson bioactive compounds in whole grain rye. *Proceedings of theNutrition Society*, **62**, 117–122.

- Lopez H. W., Krespine V., Guy C., Messager A., Demigne C., Remesy C. (2001) Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *J. Agr. Food. Chem,* **49**,2657-62.

- Lovrić, T.(2003) Procesi u prehrambenoj industriji. U: Procesi konzerviranja (str. 133-178)

- Marklinder I, Haglund Å and Johansson L (1996) Effects of flour from different barleyvarieties on barley sour dough bread, *Food Qual Pref,* **7**(3/4), 275–284.

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

- Mrvčić J., Krunoslav M., Križanović S., Stanzer D.,Mladen B., Grba S., Stehlik-Tomas V. (2009) Influence ofpreferment on wheat bread fresshness and quality // *5th International Congress and 7th <<Croatian Congress ofCereal Tehnologists: "Flour - Bread"* / Ugarčić Hardi Ž.(ur.),Osijek: Faculty of Food Technology Osijek. *Departmen ofCereal Processing Technologies*, 93-93.

- Mrvčić J., Hrsto O., Stanzer D., Grba S., Stehlik-TomasV. (2010) Proizvodnja i primjena bakterijskih egzopolisaharidau pekarstvu//XIII Ružičkini dani. *"Danas znanost-sutraindustrija"-zbornik sažetaka,* Drago Šubarić (ur.). Vukovar,xx-xx.

- Mrvčić J., Mikelec K., Stanzer D., Križanović S., Bačun-Dužina V., Stehlik-Tomas V. (2011) Sourdough - Traditional Methods for Improving Quality of Bakery Products, Croatian Journal of Food technology, Biotechnology and Nutrition, **6 (3-4**), 89-99

- Ostman, E., Rossi, E., Larsson, H., Brighenri, F., Björck, I. (2006) Glucose and insulin responses in healthy men to barley bread with different levels of (1 →3;1 → 4)-β-glucans; predictions using fluidity measurements of in vitro enzyme digests, *J Cereal Sci*, **43**, 230-235.

- Ostman E.M., Liljeberg H.G. M., Bjorck E., Bjorck I.M.E. (2002) Barley Bread Containing Lactic Acid ImprovesGlucose Tolerance at a Subsequent Meal in Healthy Men andWomen. *Journal of Nutrition,* **132**,1173-1175.

- Quinde, Z., Ullrich, S. E., & Baik, B. K. (2004) Genotypic variation in colour and discolouration potential of barley-based food products, *Cereal Chem*, **81**, 752-758.

- Salomonsson A C, Theander O and Åman P (1980) Composition of normal and highlysine barleys, *Swedish J Agric Res*, **10**, 11–16.

- Schünemann C., Treu G. (2012) Tehnologije proizvodnje pekarskih i slastičarskih proizvoda, (str. 138-159)

- Spicher, H. Stephan (Eds.), Handbuch Sauerteig: Biologie,Biochemie. *Technologie* (pp 35-60). Hamburg: Behr′s Verlag.Thiele C. (2003) Hydrolysis of gluten and the formationof flavor precursors during sourdough fermentation. *T.U.M.*,93-111.

- Stewart D. I., Kelly A. L.,. Guinee T. P,. Beresford T. P, Highpressure processing: Review of application to cheese manufactureand ripening, Austr. *J. Dairy Technol*. **61** (2006) 170–178.

- Sullivan, P., O'Flaherty, J., Brunton, N., Gee, V. L., Arendt, E., & Gallagher, E. (2010) Chemical composition and microstructure of milled barley fractions, *Eur Food Res Technol*, **230(4)**, 579-595.

- Sullivan, P., Arendt E., Gallagher E. (2012) The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods, *Trends food sci tech,* 1-12

- Virkki, L., Johansson, L., Ylinen, M., Manau, S., & Ekholm, P. (2004), Structural characterization of water-insoluble non-starchy polysaccharides of oats and barley, *Carbohydrate Polymers*, **59**, 357-366.