

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ana Pinčar

6805/PT

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI
BEZGLUTENSKOG KISELOG TIJESTA I KRUHA
DPPH METODOM**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Primjena vakuumske hladnje u proizvodnji hrane produljene trajnosti i svježine, HRZZ 09.01/279

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Krpan

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI BEZGLUTENSKOG KISELOG TIJESTA I KRUHA DPPH METODOM

Ana Pinčar, 0058204253

Sažetak: Celijakija kao kronična bolest modernog doba zahvaća sve veću populaciju ljudi te se stoga danas teži povećanju nutritivne vrijednosti i kvalitete bezglutenskih proizvoda. Osobe oboljele od celijakije ne podnose gluten, protein koji značajno utječe na kvalitetu pekarskih proizvoda. U proizvodnji bezglutenskog kruha sve je popularniji dodatak brašna mahunarki, a također je i sve veći interes za upotrebu kiselog tijesta, budući da povećava prehrambenu vrijednost, kvalitetu, ali i trajnost takvih proizvoda. Cilj ovog završnog rada bio je pomoću DPPH metode odrediti antioksidativnu aktivnost uzoraka bezglutenskog kiselog tijesta i kruha pripremljenog sa i bez dodatka brašna žutog graška te uz kiseljenje s različitim sojevima bakterija mliječne kiseline. Na temelju dobivenih rezultata, utvrđeno je da proces kiseljenja pomoću bakterija mliječne kiseline povećava antioksidativnu aktivnost tijesta i kruha, dok je dodatak brašna žutog graška smanjuje.

Ključne riječi: antioksidativna aktivnost, bezglutenski kruh, brašno žutog graška, DPPH, kiselo tijesto

Rad sadrži: 26 stranica, 8 slika, 2 tablice, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag. ing.

Rad predan: 19. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF GLUTEN FREE SOURDOUGH AND BREAD WITH DPPH METHOD

Ana Pinčar, 0058204253

Abstract: Coeliac disease as a modern life chronic disease, affects higher number of today's population, so there is need to increase nutritive value and quality of gluten-free products. People who suffer from coeliac disease do not tolerate gluten, protein that highly affects the quality of baker's products. In the production of gluten-free bread, there is increasing popularity of adding legume flours, and there is even more interest in use of sourdough, since it increases nutritional value and sustainability of these products. The main aim of this thesis was to determine antioxidative activity with DPPH method in samples of gluten-free sourdough and bread prepared with or without addition of yellow pea flour with acidification from various types of lactic acid bacteria. Based on obtained results, it is found that acidification with lactic acid bacteria increases antioxidative activity of sourdough and bread, meanwhile addition of yellow pea flour it decreases.

Keywords: antioxidativity, coeliac disease, DPPH, gluten, sourdough

Thesis contains: 26 pages, 8 figures, 2 tables, 39 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Marina Krpan, PhD

Technical support and assistance: Saša Drakula, BSc

Defence date: September 19th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Celijakija	2
2.2. Bezglutenski kruh	3
2.2.1. Poboljšanja kvalitete bezglutenskog kruha	3
2.2.2.1. Hidrokoloidi	3
2.2.2.2. Enzimi	4
2.2.2.3. Proteini bjelanjka	4
2.2.2.4. Upotreba kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskog kruha	4
2.3. Kiselo tijesto	5
2.4. Bakterije mliječne kiseline	7
2.4.1. <i>Lactobacillus brevis</i>	7
2.4.2. <i>Lactobacillus reuteri</i>	8
2.4.3. <i>Lactobacillus fermentum</i>	8
2.4.4. Antifungalna aktivnost kiselih tijesta	9
2.5. Mahunarke	9
2.6. Oksidativni stres i prevencija	10
2.7. Antioksidansi	12
2.7.1. Prirodni antioksidansi - polifenoli	13
2.8. Mjerenje antioksidativne aktivnosti	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode rada	17
3.3. Obrada podataka	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	24

1. UVOD

Bezglutenska prehrana danas se koristi kao jedina adekvatna prehrana za osobe oboljele od celijakije, kronične bolesti koja uzrokuje imunološku reakciju organizma na gluten. Posljedica takve reakcije je oštećenje resica tankog crijeva. Obzirom na sve veći broj osoba koje boluju od navedene bolesti, rastu zahtjevi za povećanom proizvodnjom, ali i poboljšanim nutritivnim svojstvima te teksturom takvih proizvoda. Gluten je osnova koja utječe na kohezivnost i elastičnost tijesta pri proizvodnji kruha.

Sukladno zahtjevima koje moraju zadovoljiti bezglutenski proizvodi, ispituje se primjena brašna mahunarki koja su najveći izvor proteina, nakon namirnica životinjskog podrijetla. Jedno od brašna mahunarki je i brašno žutog graška, koje uz veliki udio proteina, sadrži i mineralne tvari te vlakna.

Proces kiseljenja tijesta uz dodatak starter kultura bakterija mliječne kiseline (BMK) utječe na nutritivni profil, organoleptička svojstva gotovog proizvoda te se smatra jednim od važnih koraka u proizvodnji kruha koji, osim poboljšanje teksture, mirisa i okusa, utječe i na produljenu trajnost gotovog proizvoda.

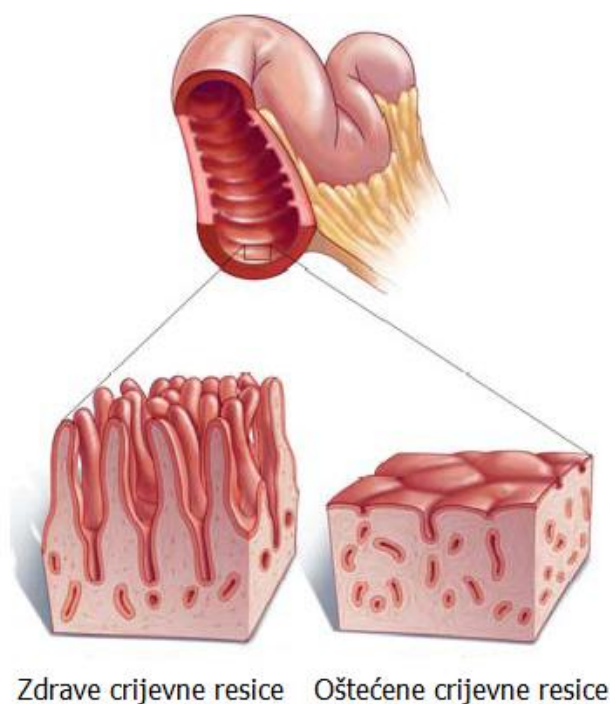
Redovita konzumacija proizvoda koji sadrže prirodne antioksidanse može pomoći u suzbijanju raznih degenerativnih i kroničnih bolesti kojima je današnja svjetska populacija sve više podložna, a posljedica su užurbanog načina života te velike razine stresa. To sve pogoduje nastajanju slobodnih radikala, molekula koje izazivaju specifične imunološke reakcije u našem organizmu, dok su antioksidansi, jedine molekule koje mogu suzbiti njihovo štetno djelovanje.

Stoga je cilj ovog rada bio eksperimentalno odrediti antioksidativnu aktivnost u uzrocima bezglutenskog kiselog tijesta i kruha pomoću DPPH metode te utvrditi utječu li različiti uvjeti kiseljenja i dodatak brašna žutog graška na povećanje antioksidativne aktivnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Celijakija

Celijakija je kronična (dugoročna) bolest probave koja uzrokuje upalu ili iritaciju tankog crijeva kod pacijenata. Do upale u tankom cijevu dolazi kada pacijent s celijakijom konzumira hranu koja sadrži gluten. Glutenom se nazivaju određene vrste proteina koje se nalaze u pšenici, ječmu, raži i drugim srodnim žitaricama. Kada hrana koja sadrži gluten dođe do tankog crijeva, imunološki sustav započinje reakciju protiv glutena koja za posljedicu ima upalu stijenke tankog crijeva. Stijenka tankog crijeva pokrivena je s milijunima crijevnih resica, koje služe za povećanje površine unutarnjeg dijela tankog crijeva, čime se postiže veća apsorpcija nutrijenata. Pri upali stijenke tankog crijeva dolazi do oštećenja crijevnih resica, što za posljedicu ima manju apsorpciju nutrijenata iz hrane (Loftus i Murray, 2003). Slika 1. prikazuje zdrave i oštećene crijevne resice tankog crijeva.



Slika 1. Zdrave i oštećene crijevne resice tankog crijeva (Loftus i Murray, 2003)

Terapija za celijakiju je prehrana koja je bazirana isključivo na bezglutenskoj hrani, međutim kod 30 % pacijenata se unatoč tome i dalje povremeno pojavljuju simptomi celijakije (Green i Cellier, 2007).

2.2. Bezglutenski kruh

Bezglutenski kruh koji danas nalazimo na policama supermarketa prilično je loše kvalitete zbog nedostatka glutena kao ključne komponente koja omogućava svojstva kruha s kakvima smo inače upoznati. Pri tome su gliadini odgovorni za kohezivnost, a glutenini za održivost elastičnosti tijesta. Kombinacijom navedenih proteina nastaje kompleks gluten, koji utječe na viskoelastična svojstva te zadržavanje plinova koji nastaju tijekom fermentacije, što u konačnici rezultira kruhom izrazito dobre kvalitete. Ono što predstavlja problem je da takva svojstva nisu nađena u brašnu koji se koristi za proizvodnju bezglutenskog kruha. Do danas je zadržana upotreba polimernih sastojaka, kao što su ksantan guma i drugi, koji oponašaju svojstva glutena (Renzetti i sur., 2008).

Kod miješanja tijesta s vodom, gluten veže vodu, bubri i stvara tzv. glutensku mrežu. Nasuprot tome, žitarice koje ne sadrže proteine glutena imaju polutekuću konzistenciju te je nastali kruh zbijene i mrvljive strukture, i ne može stvoriti organoleptička svojstva kao kruh koji sadrži gluten (Arendt i sur., 2002). Zbog navedenih nedostataka počeo je razvoj tehnologije proizvodnje bezglutenskog kruha s ciljem poboljšanja njegove kvalitete, a to se postiže upotrebom zamjenskih brašna (kukuruz, riža, proso, amarant, kvinoja) uz dodatak škroba, enzima, hidrokoloida te proteina (mliječni, sojini, proteini bjelanjka). Zamjenom brašna koja sadrže gluten s navedenim sastojcima stvaraju se recepture za proizvodnju visokokvalitetnog bezglutenskog kruha koji je bogat proteinima, vitaminima i mineralnim tvarima te njegova senzorska svojstva ne odstupaju značajno od onih kod kruha s glutenom.

2.2.1. Poboljšanja kvalitete bezglutenskog kruha

Kako bi se izbjegli nedostaci bezglutenskog kruha, znanstvenici su otkrili rješenja kojima se svojstva bezglutenskog kruha približavaju svojstvima kruha s glutenom.

2.2.2.1. Hidrokoloidi

Hidrokoloidi se smatraju esencijalnim sastojcima u formiranju bezglutenskog kruha. Riječ je o molekulama s hidrofilnim dugim lancem, velike molekulske mase s koloidalnim svojstvima koje u vodenom okruženju proizvode gelove, odnosno viskozne suspenzije. Imaju dvije osnovne funkcije, a to su stabilizacija i poboljšanje teksture bezglutenskog kruha tijekom tehnološke proizvodnje budući da bubrenjem povećavaju i zadržavaju volumen tijesta. Nedostatak glutena rezultira više tekućom strukturom bezglutenskog tijesta u odnosu na tijesto proizvedeno od pšeničnog brašna.

Najpoznatiji predstavnici ove skupine su ksantan guma, pektin, guar guma, hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) i karboksimetilceluloza (CMC) (Klas, 2015).

2.2.2.2. Enzimi

Enzimi također mogu utjecati na poboljšanje kvalitete bezglutenskog kruha. Prirodno su prisutni te se mogu ukloniti inaktivacijom. Riječ je o skupini enzima u koju spadaju amilaze, proteaze, hemicelulaze te oksidaze koje utječu na proces pečenja. Enzimi prvenstveno utječu na boju tijesta, povećanje volumena i teksture te produljuju trajnost kruha (Hozova i sur., 2002).

2.2.2.3. Proteini bjelanjka

Proteini bjelanjka jajeta utječu na povećanje nutritivne vrijednosti kruha, pjenjenje, koagulaciju, emulgiranje te poboljšanje okusa proizvoda, a posebice doprinose strukturi sredine bezglutenskog kruha (Mine, 2002). Bjelanjak jajeta sadrži od 15,7 % do 16,6 % proteina, a kao dominantni protein ističe se ovalbumin, koji uzrokuje stvaranja gela. Bjelanjak koagulira pri temperaturi od 62 °C, što dovodi do povećanja viskoznosti te prelaska iz tekuće/polutekuće strukture u čvrstu i netopljivu strukturu. Drugi protein u jajetu je albumin te on utječe na stabilizaciju mjehurića plina nastalih tijekom fermentacije (Jonagh i sur., 1968).

2.2.2.4. Upotreba kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskog kruha

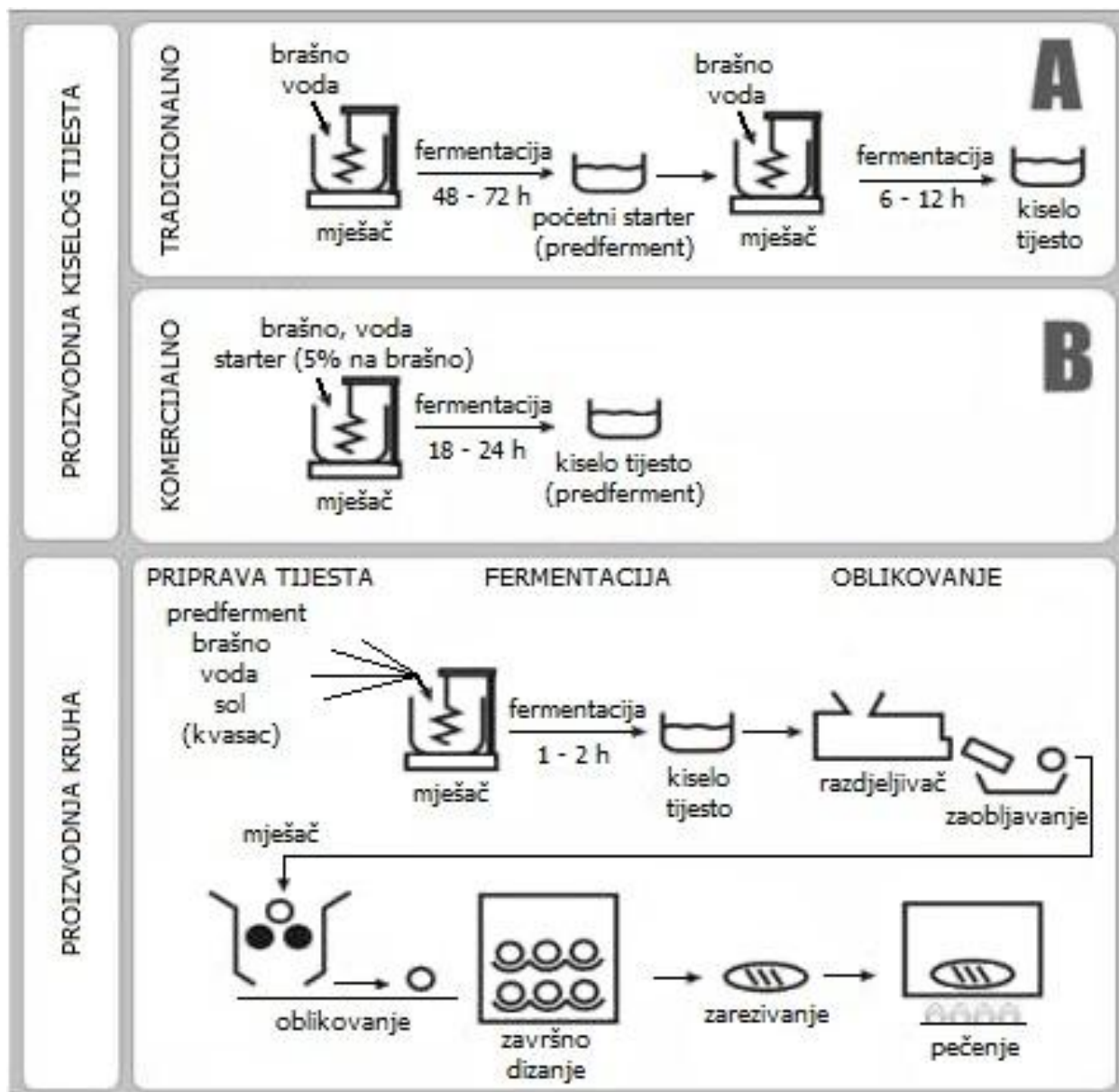
Obzirom da, kako je već navedeno, bezglutenska brašna ne sadrže glutensku mrežu odgovornu za vezanje vode i zadržavanje plinova, korištenje kiselog tijesta povećava ulogu pentozana koji su odgovorni za topljivost i bubrenje. U kiselom tijestu se također smanjuje aktivnost amilaza, što umanjuje ljepljivost sredine i povećava volumen kruha (Hammes i Gazle, 1998). U navedenom istraživanju (Hammes i Gazle, 1998) zaključeno je da starter kulture koje se koriste za pripremu kiselog tijesta oslobađaju organske kiseline i aminokiseline koje utječu na poboljšanje arome, što istovremeno rezultira smanjenjem potrebe za korištenjem aditiva i kemijskih sredstava.

2.3. Kiselo tijesto

Proizvodnja kruha od kiselog tijesta seže još u antička vremena. Danas je kruh jedan od uobičajenih proizvoda u europskoj prehrani, međutim povezan je s kulturološkim i geografskim karakteristikama pojedinog područja. Proizvodnja beskvasnog kruha nezamisliva je bez upotrebe kiselih tijesta koja omogućuju izradu raznih pekarskih proizvoda produljene svježine i trajnosti. U Italiji se kisela tijesta koriste u proizvodnji više od 30 % pekarskih proizvoda, a uključuju nekoliko vrsta kruha, tradicionalne talijanske pizze i slično (Ottogalli i sur., 1996).

Kiselo tijesto je mješavina brašna i vode na kojoj se provodi fermentacija pomoću bakterija mliječne kiseline, pretežno heterofermentativnih vrsta koje proizvode mliječnu i octenu kiselinu te specifične spojeve arome. Kiselo tijesto utječe na nutritivni profil i organoleptička svojstva (hrskavu strukturu, volumen) te je međukorak u proizvodnji kruha koji sadrže aktivne mikroorganizme. Mikrobna populacija ovisna je o endogenim (kemijski i mikrobiološki sastav tijesta) i egzogenim faktorima (temperatura i redoks potencijal). Procesni parametri su relativna vlažnost, dodatak soli, sastav starter kulture, broj propagacijskih koraka te vrijeme fermentacije. Na osnovu toga provodi se izbor najboljeg mikroorganizma, pri čemu se inhibira rast drugih mikroorganizama i potencijalnih kontaminanata. Selekcija kultura koje se koriste za fermentaciju temelji se na rasteznim deformacijama, kiseljenju, proteolizi i sintezi promjenjivih komponenti tijekom procesa. Mikrofloru kiselog tijesta čine bakterije mliječne kiseline i kvasci u aktivnom stanju. Bakterije mliječne kiseline su dominantni mikroorganizmi u kiselom tijestu (omjer kvasaca i BMK \approx 1:100) te reologija, okus, miris i nutritivne karakteristike kruha proizvedenog uz dodatak kiselog tijesta, ovise o njihovoj aktivnosti (Vuyst i Neysens, 2005).

Metabolizam bakterija u kiselom tijestu i aktivnost enzima su međusobno ovisni. Kiseljenje utječe na aktivnost enzima, kao i na topljivost supstrata, prvenstveno glutena i fitata. Heterofermentativne BMK koriste široki raspon sastojaka kao akceptore elektrona kako bi mogli regenerirati kofaktore. Njihov metabolizam utječe na aktivnost enzima tako što dovodi do smanjenja oksido-redukcijskog potencijala kiselog tijesta te akumuliranja tiolnih komponenata male molekulske mase. Nasuprot tome, enzimi osiguravaju supstrat za rast bakterija. Pšenica i raž sadrže oko 70 % škroba koji je odgovoran za retrogradaciju amilopektina te za "mrvičastu" strukturu. Degradacijom škroba osiguravaju se supstrati za fermentaciju ugljikohidrata i reduciranih šećera (Gänzle, 2013). Na slici 2. prikazan je proces proizvodnje kiselog tijesta i kruha s kiselim tijestom.



Slika 2. Proizvodnja kiselog tijesta i kruha s kiselim tijestom (Mrvčić, 2014)

Neuspjeh u fermentacijskom procesu može biti posljedica kvarenja ili preživljavanja patogena koji stvaraju rizik za ljudsku upotrebu, povećavaju mogućnost stvaranja nepoželjnih organskih kiselina te piruvata i oksalata koji mogu utjecati na promjenu arome kruha. Fermentacija kiselog tijesta dovodi do promjene sastava te gustoće tijesta. Aktivnost mikroorganizama ima za posljedicu nakupljanje CO₂ te smanjenje pH vrijednosti, što je u korelaciji s organskim kiselinama koje nastaju tijekom fermentacije. Proizvodnja kruha od kiselog tijesta zahtjeva složenije procese u cilju proizvodnje proizvoda povećane trajnosti, specifične arome te poboljšane teksture.

2.4. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline povijesno se mogu definirati kao grupa mikroaerofilnih, gram-pozitivnih organizama koje provode fermentaciju heksoza kako bi stvorile krajnji produkt - mliječnu kiselinu (Makarova i sur., 2006).

Klasifikacija industrijskih mikroorganizama dijeli BMK na sojeve *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* te *Lactobacillus*. Od izrazite je važnosti njihova upotreba u prehrambenoj industriji, gdje sudjeluju u biokonverziji mliječnih proizvoda te fermentirane hrane, proizvodnji kakaovca, kiselog tijesta, vina i kave. Međutim, bakterije mliječne kiseline prirodno su prisutne i u probavnom sustavu životinja. Metabolizam BMK sadrži dva osnovna puta za konverziju glukoze. Prvi metabolički put je homofermentativni u kojem je mliječna kiselina primarni produkt, a drugi je heterofermentativni u kojem nastaju CO₂, mliječna kiselina i/ili etanol (Makarova i sur., 2006).

Rod *Lactobacillus* skupina je štapićastih nespороgenih bakterija koji metaboliziraju šećere do mliječne kiseline (Vlainić, 2010). Prema Calasso i Gobetti (2011) ovaj rod sadrži 168 poznatih vrsta bakterija. Bakterije roda *Lactobacillus* se smatraju "izbirljivim" mikroorganizmima koji za svoj rast zahtijevaju egzogeni izvor dušika koji može potjecati iz aminokiselina ili peptida, npr. dušik koji nastaje proteolizom kazeina. Mliječno-kisela fermentacija fakultativnih i oligatno heterofermentativnih vrsta provodi se po tzv. Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) metaboličkom putu kojim iz heksoza nastaju L(+) i D(-) mliječna kiselina. U uvjetima kada nema dostupne glukoze, fermentacija se provodi do mliječne kiseline, etanola i metanske kiseline (Calasso i Gobetti, 2011).

2.4.1. *Lactobacillus brevis*

U prošlosti je ovaj soj bio poznat pod nazivom *Beta Bacterium Breve*, a može se izolirati iz mliječnih proizvoda, probavnog trakta životinja te je prirodno prisutan u fecesu. To je štapićasta, heterofermentativna bakterija koja se filogenetički svrstava u razred *Lactobacillales*, u grupu *Lactobacillus casei* (Wood i Holzapfel, 1995). Pojavljuje se kao samostalna i kratka štapićasta struktura sa zaobljenim krajevima koja raste pri 15 °C. *Lactobacillus brevis* zbog svoje katalitičke aktivnosti može ukloniti vodikov peroksid (Calasso i Gobetti, 2011). Navedena bakterija ima veliku primjenu u fermentaciji sireva i vina. Međutim, ne koristi se kao probiotička kultura zbog nesposobnosti formiranja simbiotske zajednice s eukariotima te je jedan od najčešćih uzročnika kvarenja piva u pivarstvu. Određeni sojevi ove bakterije proizvode bakteriocine (Vlainić, 2010).

2.4.2. *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri naziv je dobio prema njemačkom bakteriologu Reuteriu. Navedene bakterije su obligatni heterofermentativi štapićaste strukture širine od 0,7 do 1 µm i visine od 2 do 5 µm te mogu postojati kao zasebne, u parovima ili u malim grozdovima. Sojevi mogu biti izolirani iz fecesa ljudi i životinja, mesnih proizvoda i kiselog tijesta (Wood i Holzapfel, 1995). Bakterija može tolerirati nepovoljne ekološke uvjete u probavnom traktu, stvarati kolonije te pomoći epitelnim stanicama u stvaranju obrane, izbjeći infekciju patogena te spriječiti određene crijevne smetnje (Lionetti i sur., 2006). *Lactobacillus reuteri* koristi se i kao probiotik u svrhu poboljšanja rada probavnog sustava i obnavljanja crijevne mikroflore nakon terapije antibioticima. Navedena bakterija u određenim uvjetima proizvodi reuterin (β-hidroksipropionaldehid), antimikrobnu tvar širokog spektra koja sprječava razvoj niza nepoželjnih bakterija, kvasaca, gljivica i protoza.

2.4.3. *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum je heterofermentativna bakterija mliječne kiseline. Filogenetski pripada grupi *Lactobacillus casei* - *Pediococcus*. Ima mogućnost upotrebe arabinoze, celobioze, galaktoze, maltoze, manoze i rafinoze kao izvora ugljikohidrata za fermentaciju. Optimalna temperatura rasta ove bakterije je 45 °C (Wood i Holzapfel, 1995).

Proizvodne značajke bakterija mliječne kiseline odnose se na njihovu sposobnost proizvodnje komponenti koje imaju antifungalna i antibakterijska djelovanja. Pritom se misli na produljenje trajnosti gotovog proizvoda od kiselog tijesta, degradaciju fitinske kiseline koja ima mogućnost stvaranja kompleksa s fosforom i prema De Angelisu (2003) omogućava se bioiskoristivnost važnih sastojaka proizvoda, kao što su mineralne tvari. Djelovanje bakterija mliječne kiseline utječe na proizvodnju važne bioaktivne komponente γ-aminobutanske kiseline (GABA), koja je po sastavu neproteinska aminokiselina s izrazito povoljnim učincima na ljudski organizam kao neurotransmiter u mozgu (Meldrum, 2000).

Villegas i suradnici (2016) utvrdili su da određene bakterije mliječne kiseline u proizvodnji kiselog tijesta imaju mogućnost tijekom fermentacijskog procesa dovesti do konverzije u aminobutansku kiselinu. Od izrazite je važnosti antifungalna karakteristika bakterija mliječne kiseline koja umanjuje ekonomske gubitke kruha koji je kvarljiva namirnica, a proizvodi se u velikim količinama. Antifungalna aktivnost osigurava da učinak mikotoksina bude sveden na minimum (Demirbas i sur., 2017).

Bakterije mliječne kiseline iz kiselih tijesta mogu inhibirati nepoželjne mikroorganizme proizvodnjom bakteriocina i mnogih drugih spojeva. Primjerice, za *Lactobacillus reuteri* Hòltzel i sur. (2000) otkrili su da proizvodi antibiotik niske molekularne mase reutericiklin. Nadalje, potvrđeno je da svi navedeni antibiotici i bakteriocini sadrže termo i acido rezistenciju te su se neki pokazali učinkovitima pri sprječavanju rasta poznatih patogenih sojeva *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Listeria spp* (Corsetti i sur., 2004).

2.4.4. Antifungalna aktivnost kiselih tijesta

Zahvaljujući velikoj potražnji potrošača za minimalno procesiranom hranom, do danas postoji veliki broj istraživanja o utjecaju antifungalne aktivnosti bakterija mliječne kiseline iz kiselog tijesta. Bakterije mliječne kiseline proizvode kapronsku, mliječnu, octenu, mravlju i izobuternu kiselinu, koje sinergistički djeluju i inaktiviraju poznate uzročnike kvarenja hrane poput sojeva *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* i *Monilia* (Corsetti i sur., 1998).

2.5. Mahunarke

Istraživanja su pokazala da su mahunarke, nakon namirnica životinjskog porijekla najbogatiji izvor proteina te su najvećim dijelom u upotrebi u zemljama slabijeg socioekonomskog statusa. Obzirom da sve veća populacija ljudi pokazuje osjetljivost na proteine pšenice, razvila se potreba za upotrebom zamjenskih brašna koja bi nadopunila energetske i nutritivni sastav bezglutenskog kruha. Žuti grašak (*Pisum sativum L.*) sve više dobiva na prepoznatljivosti u svijetu kao sastojak koji može pridonijeti nutritivnoj vrijednosti namirnica te služi i kao prevencija od razvoja bolesti, npr. dijabetesa tipa II te kardiovaskularnih bolesti. Izvor je proteina, vlakana, vitamina B, vitamina C te mineralnih tvari (kalcij, željezo) (Vankosky i sur., 2011).

Grašak je nedovoljno iskorišten, smatra se, zbog manje količine aminokiselina bogatih sumporom i triptofanom, male probavljivosti proteina u usporedbi sa životinjskim proteinima te prisustva antinutritivnih sastojaka kao što su inhibitor tripsina, lektini, glikozidi i kondenzirani tanini. Međutim, mahunarke su bogate lizinom čija je koncentracija čak veća nego u žitaricama, stoga su mahunarke i žitarice nutritivno komplementarne. Mogućnost zajedničke suplementacije ipak ovisi o drugoj ograničavajućoj aminokiselini (treonin u žitaricama, odnosno triptofan u mahunarkama), ali svakako kombinacija žitarica i mahunarki doprinosi uravnoteženoj prehrani (Duranti i Gius, 1997).

Zamjena više od 10 % pšeničnog brašna s brašnom mahunarki uzrokuje probleme tijekom proizvodnje kruha, kao što su stabilnost tijesta te mrvljenje kruha. Upotreba brašna žutog graška dovodi do povećane apsorpcije vode kod tijesta koja su dopunjena s neprokljanim brašnom graška nasuprot onog s prokljanim brašnom. Međutim, utjecaj tipa graška na vrijeme proizvodnje kruha nije istražen (Mandor i sur., 2014).

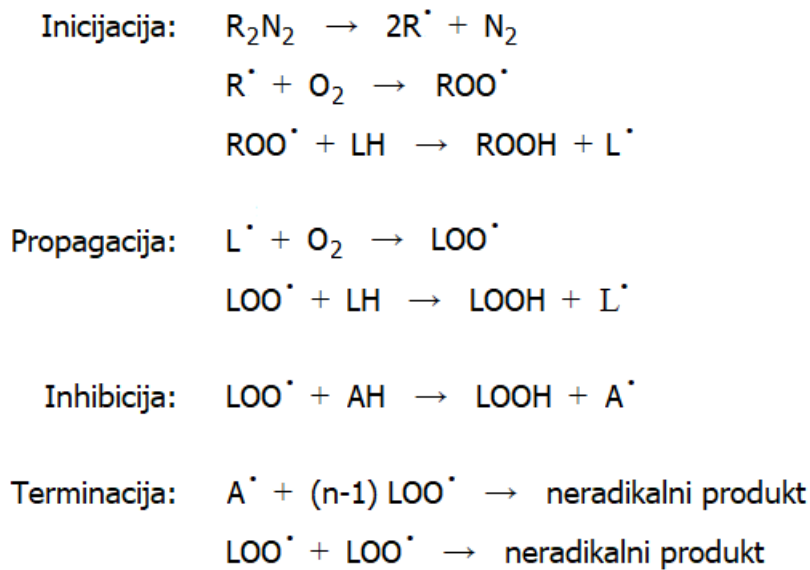
Procesiranjem graška, od kojih je najvažnije istaknuti toplinsku obradu zbog termolabilnosti komponenata, dolazi do povećanja probavljivosti i okusa, već i do porasta dostupnosti važnih bioaktivnih komponenata. Proteini graška se klasificiraju na osnovi njihove topljivosti. Albumini su topljivi u vodi, globulini su topljivi u otopini alkohola i vode te su oni definirani kao skladišni proteini. Važnost ove dvije skupine proteina očituje se kroz njihove povoljne učinke na ljudsko zdravlje (antikancerogeni, hipoglikemijski te mnogi drugi) (Duranti, 2006).

Mikrobna fermentacija ispitivana je na mahunarkama te je rezultirala djelomičnom eliminacijom alfa-galaktozidaze, tanina te je došlo do djelovanja tripsin inhibitora za vrijeme spontane fermentacije. Za postupak je korištena kultura *Lactobacillus plantarum* koja je povećala aktivnost tripsin inhibitora te smanjila razinu fitinske kiseline.

2.6. Oksidativni stres i prevencija

Oksidativni stres može se definirati kao pomak ravnoteže u smjeru oksidacije u staničnim oksido-redukcijskim reakcijama. U tim reakcijama dolazi do povećanog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu posljedično dolazi do neuravnoteženosti stanice i nemogućnosti da ih stanica ukloni. Nagomilavanje slobodnih radikala dovodi do oštećenja stanica u stanju smanjene antioksidativne zaštite organizma.

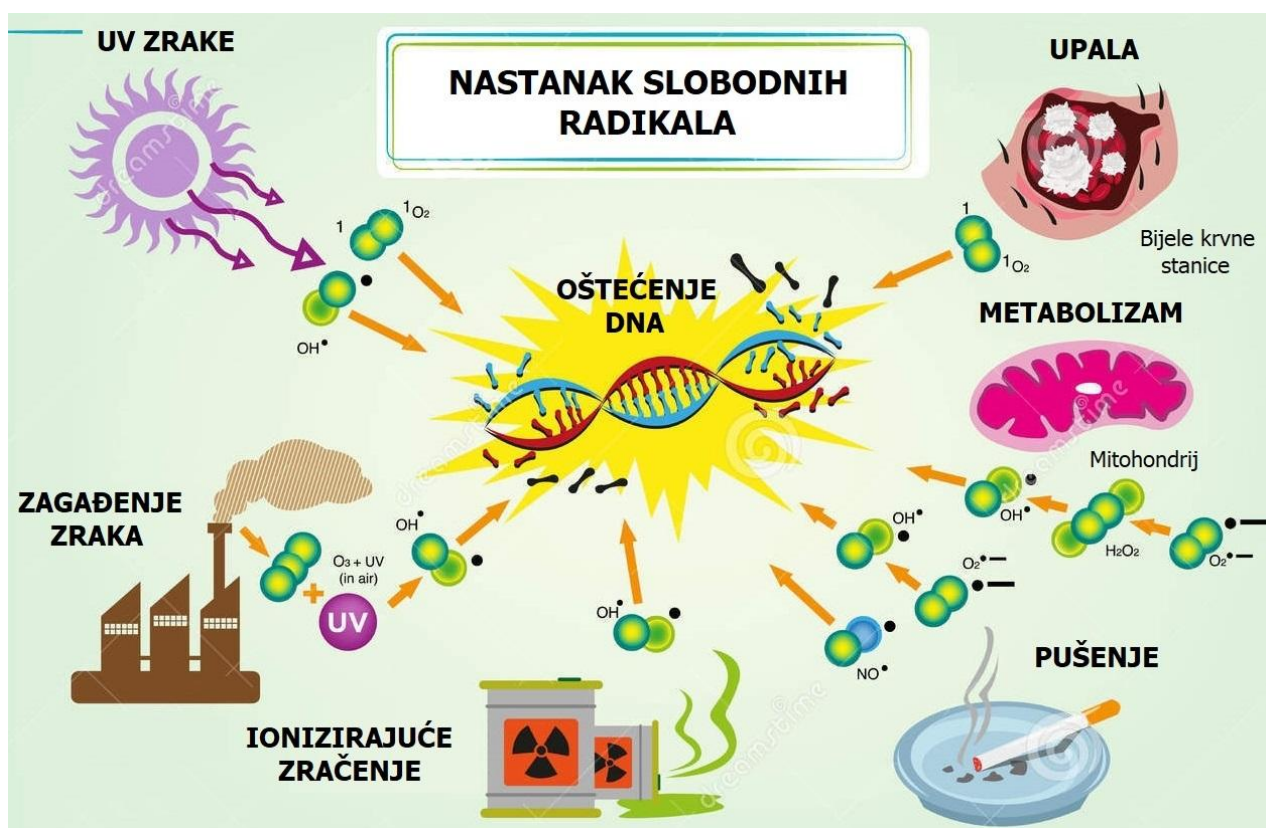
Prema Čakarić (2009), oksidativni stres se može definirati kao oštećenje organizma uvjetovano poremećajem ravnoteže prooksidativnog i antioksidativnog sustava. Pri tome su prooksidansi tvari koje induciraju oksidacijske procese na nukleinskim kiselinama, lipidima te proteinima. Antioksidansi pak djeluju na način da inhibiraju reakcije slobodnih radikala tako što im predaju vodikov atom, što dovodi do stabilizacije odnosno stvaranja produkata koji nisu toksični i ne stvaraju oštećenja. Slika 3. prikazuje nastanak slobodnih radikala.



Slika 3. Nastanak slobodnih radikala (Čakarić, 2009)

Oksidativni stres smatra se ključnim i za razne patofiziološke poremećaje organizma, kao što su bolesti imunološkog sustava (autoimune bolesti), kardiovaskularne i gastrointestinalne poremećaje te uzrokuje i fiziološki proces starenja (Vrhovac i sur., 2003).

Slobodni radikali su molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali (Ghodbane i sur., 2013). Obzirom na svoju visoku reaktivnost i nestabilnost uzrokuju lančane reakcije s brojnim molekulama te tako uvjetuju da novonastali radikali imaju slična svojstva kao i slobodni radikali. Prema porijeklu dijele se na egzogene (zagađenje zraka, smog, metali, lijekovi, zračenja, industrijski otpad) te endogene (proces starenja, mentalni stres, infekcije te razna patološka stanja). Na slici 4. prikazani su uzroci nastanka slobodnih radikala.



Slika 4. Uzroci nastanka slobodnih radikala (Anonymous)

2.7. Antioksidansi

Antioksidansi su molekule koje mogu uspješno neutralizirati lančane reakcije slobodnih radikala te štite organizam od štetnog djelovanja prooksidanasa i sprječavaju nastanak bolesti koje su posljedica oksidativnog stresa. To su molekule koje nastaju u stanici ili se mogu unositi putem hrane koja je veliki izvor prirodnih antioksidansa, kao što su karotenoidi, tokoferoli, razni fenolni spojevi te askorbinska kiselina. Osnovna funkcija im je uništavanje u organizmu već stvorenih radikala ili popravak oštećenih stanica (Wotton-Beard i Ryan, 2011).

Huang i suradnici (2005) klasificirali su antioksidanse na primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni, tzv. preventivni, sprječavaju nastanak slobodnih radikala. Sekundarni imaju sposobnost uklanjanja nastalih slobodnih radikala (enzimi, karotenoidi, flavonoidi, askorbinska kiselina). Tercijarni antioksidansi djeluju kao "enzimi popravka", jer popravljaju nastala oštećenja ili uklanjaju biomolekule oštećene radikalima.

2.7.1. Prirodni antioksidansi - polifenoli

Polifenoli su organski spojevi koji su prisutni u hrani, rasprostranjeni u voću, povrću, žitaricama, mahunarkama, čokoladi, vinu te kavi. Obzirom na svoje povoljne učinke na zdravlje, posljednjih godina postali su tema od interesa za nutricioniste. Glavni razlog interesa su svakako raznovrsnost polifenola te složenost njihove kemijske strukture. Polifenoli kao antioksidansi štite stanice od oksidativnog stresa te tako umanjuju mogućnost nastajanja degenerativnih bolesti (Anonymus).

S druge strane, istraživanja koja su provedena pokazala su da polifenoli mogu provoditi inhibiciju nekih enzima kao što su lipooksigenaze, telomeraze, ciklooksigenaze te ući u interakcije s nekim metaboličkim putevima i staničnim receptorima. Osnove strukture polifenola su hidroksilne skupine na aromatskom prstenu, ali također to mogu biti i molekule s jednim fenolnim prstenom (fenolne kiseline i alkoholi). Polifenoli su podijeljeni u nekoliko skupina na osnovu fenolnih prstenova koje sadrže i strukturnih elemenata koji povezuju te prstenove. Glavne skupine polifenola su: flavonoidi, fenolne kiseline, fenolni alkoholi, stilberini i lignani (D'Archivio i sur., 2007).

Za područje interesa ovog istraživanja važne su ferulinska i galna kiselina, koje spadaju u skupinu fenolnih kiselina. Razlog tome je što se one nalaze u žitaricama te su prisutne u malim koncentracijama, a udjel im iznosi od 0,8 do 2 g/kg suhe tvari, što predstavlja čak 90 % ukupnih polifenola (Sosulski i sur., 1982).

Također, kvercetin kao predstavnik flavonola je jedan od najčešće istraživanih polifenola, prisutan u mahunarkama, voću te također u žitaricama. Biosinteza flavonola događa se pod utjecajem sunčeva svjetla, te su oni prirodno prisutni u vanjskim tkivima biljaka.

2.8. Mjerenje antioksidativne aktivnosti

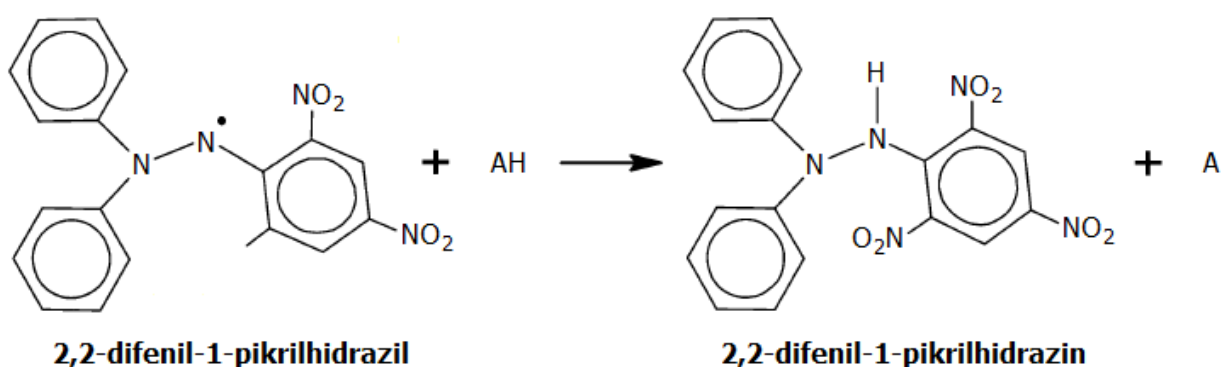
Slobodni radikali imaju sposobnost uzrokovati različita oštećenja stanica, kao i ubrzano starenje te različite bolesti, stoga se stvorio interes za istraživanjem komponenti hrane koje imaju sposobnost "hvatati" slobodne radikale, odnosno djelovati kao antioksidansi. Antioksidativna aktivnost koristi se kao pojam za identifikaciju sastojaka koji imaju sposobnost štititi biološke sustave od oksidacije (Pyrzynska i Pekal, 2013).

Poznato je nekoliko metoda koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti u biljnim ekstraktima:

- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity),
- FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power),
- CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity),
- 2,2-azinobis(3-etil-benzotiazoline-6-sulfonate) radikal kation (ABTS+), i
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH).

Zajednička karakteristika svih navedenih metoda je kromogena komponenta radikalne prirode koja u prisustvu antioksidansa nestaje, a popraćena je spektrometrijskim mjerenjem (Pyrzynska i Pekal, 2013).

DPPH metoda jedna je od najčešće korištenih metoda kojom se ispituje sposobnost komponenata da se ponašaju kao "hvatači" radikala ili donori vodika te rade procjene antioksidativne aktivnosti. DPPH radikal je organski dušikov radikal ljubičaste boje te je komercijalno dostupan. Kada se otopina koja sadrži DPPH radikal pomiješa s otopinom koja sadrži komponentu koja je reducirajuća (antioksidans), dolazi do promjene boje iz ljubičaste u svijetlo žutu odgovarajućeg hidrazina. Redukcijska moć DPPH radikala može se mjeriti apsorbancijom na valnim duljinama od 515 do 528 nm. Metoda se provodi tako što se mjeri koncentracija DPPH na početku reakcije te nakon određenog vremena inkubacije (vrijeme inkubacije je 30 minuta) (Pyrzynska i Pekal, 2013). Slika 5. prikazuje kemijsku strukturu DPPH radikala.



Slika 5. Kemijska struktura DPPH radikala (Pyrzynska i Pekal, 2013)

U početku se smatralo da se ovom metodom odvija prijenos vodika, međutim Foti i sur. (2015) su predložili drugačiji mehanizam. Po njima se početni prijenos elektrona događa vrlo brzo, a sljedeći prijenos vodika puno sporije te ovisi o vodikovoj vezi u prisutnoj otopini metanola ili etanola.

Uspješnost provođenja reakcije ovisi o:

- vrsti otapala – neki antioksidansi zahtjevaju polarna otapala (metanol i etanol), dok se za lipofilne ekstrakte koriste kloroform ili etil-acetat,
- stupnju ekstrakcije – Pérez i sur. su zaključili kako je potrebno provesti barem dva kruga ekstrakcije za biljne ekstrakte s adekvatnim organskim otapalima različitih polarnosti kako bi se omogućila ekstrakcija komponenata različitih kemijskih struktura, i
- pH uzorka – najbolji efekt postignut je dodatkom limunske kiseline u vodu, pri čemu je izmjerena pH vrijednost iznosila 3,28 (Pyrzynska i Pekał, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Osnovni ciljevi eksperimentalnog dijela ovog završnog rada bili su odrediti antioksidativnu aktivnost u uzorcima bezglutenskog kiselog tijesta i kruha DPPH metodom te utvrditi utječu li dodatak brašna žutog graška i različiti uvjeti pripreme kiselog tijesta na povećanje antioksidativne aktivnosti.

3.1. Materijali

Za potrebe provođenja eksperimenta korišteni su ekstrakti uzoraka kiselog tijesta i kruha. Neki od uzoraka bili su obogaćeni brašnom žutog graška (*Pisum sativum*) te fermentirani uz pomoć različitih bakterija mliječne kiseline – *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* ili *Lactobacillus brevis*. Analizirano je ukupno 8 uzoraka s različitim načinom pripreme. Priprema svakog uzorka i ekstrakcija su ponovljene dva puta. U tablici 1. prikazane su oznake uzoraka kiselog tijesta (KT) i kruha koji su korišteni za ispitivanje.

Tablica 1. Oznake uzoraka kiselog tijesta i kruha

Oznaka	Opis
0 ± G KT 0 ± G KRUH	Uzorak bez procesa kiseljenja, sa/bez brašna žutog graška
LR ± G KT LR ± G KRUH	Priprema kiselog tijesta s <i>L. reuteri</i> , sa/bez brašna žutog graška
LB ± G KT LB ± G KRUH	Priprema kiselog tijesta s <i>L. brevis</i> , sa/bez brašna žutog graška
LF ± G KT LF ± G KRUH	Priprema kiselog tijesta s <i>L. fermentum</i> , sa/bez brašna žutog graška

Za eksperiment je korištena sljedeća laboratorijska oprema:

- tikvica od 100 mL,
- stakleni lijevak,
- metalne žličice,
- boca od tamnog stakla 200 mL,
- pipetmani,

- nastavci za pipetman,
- plastične kivete,
- analitička vaga Kern ALS 200-4N, i
- UV-Vis spektrofotometar UNICAM HEAIOS β , Ujedinjeno Kraljevstvo.

Za eksperiment su korištene sljedeće kemikalije:

- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) 97%, Sigma-Aldrich, Rusija,
- DPPH, Sigma-Aldrich, Rusija, i
- Metanol, HPLC Grade, J.T. Baker, Nizozemska.

3.2. Metode rada

Za određivanje antioksidativne aktivnosti spojeva prisutnih u uzorcima korištena je DPPH metoda. Za analizu je korišten DPPH reagens molarne koncentracije 0,06 mM. Odvagano je 2,37 mg na analitičkoj vagi, preneseno u tikvicu od 100 mL te nadopunjeno metanolom do oznake. Otopina je zatim promućkana. Tikvica je obložena aluminijskom folijom kako ne bi došlo do reakcije oksidacije na svjetlu.

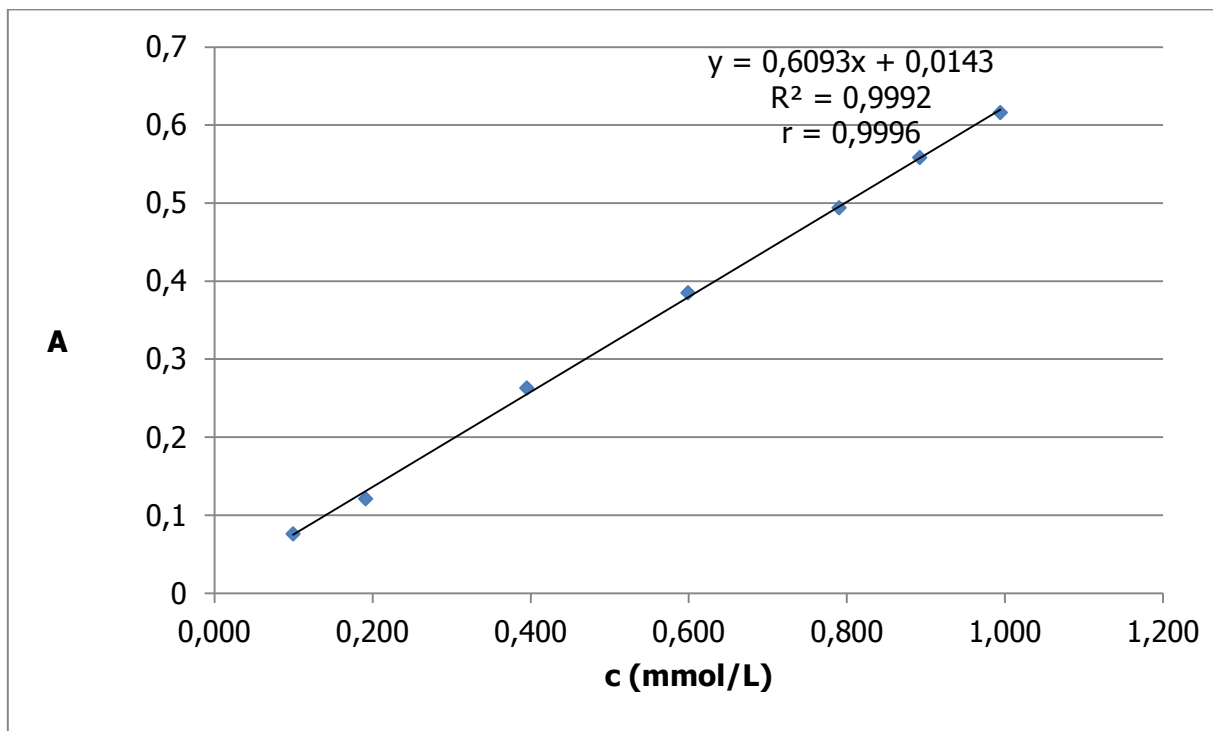
U mikrokivete je otpipetirano 25 μ L prethodno pripremljenog ekstrakta uzorka i 0,95 mL DPPH reagensa. Nakon toga je otopina promućkana i nakon 30 minuta stajanja u mraku je izmjerena apsorbanacija pri valnoj duljini od 517 nm. U ovisnosti o količini prisutnih antioksidansa u uzorku, došlo je do određenog stupnja redukcije DPPH radikala te i time do promjene boje otopine. Proporcionalno koncentraciji antioksidansa, otopina je poprimala boje od svjetložute do ljubičaste. Također, za svako mjerenje potrebno je bilo napraviti slijepu probu koja je sadržavala 25 μ L metanola, umjesto ekstrakta.

3.3. Obrada podataka

Rezultati eksperimenta obrađeni su u programskom paketu Microsoft Excel 2007. Izračunata je srednja vrijednost, standardna devijacija te relativna standardna devijacija svih provedenih mjerenja. Trolox ekvivalent je jedna od metoda s kojom se kvantificira antioksidativna aktivnost. Konačni rezultati prikazani su kao množina ekvivalenata Troloxa (TE) s obzirom na suhu tvar uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

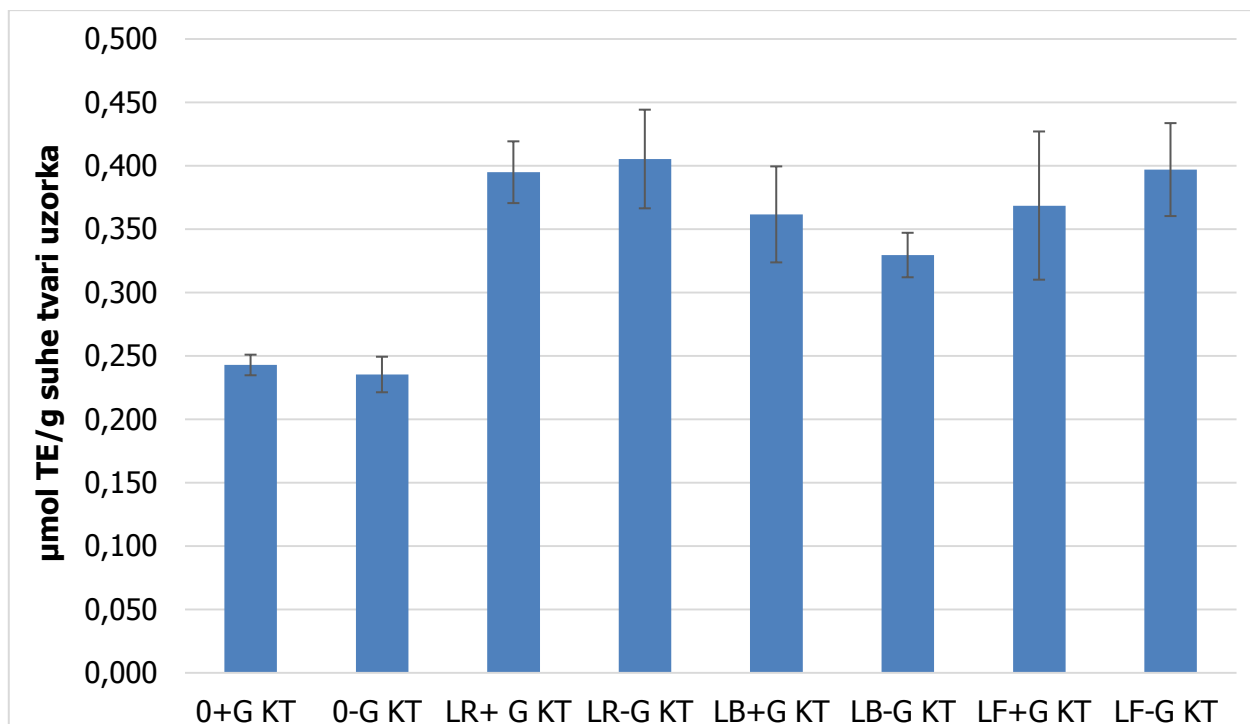
Baždarni dijagram izrađen je pomoću izmjerenih apsorbancija i poznatih koncentracija Troloxa na 7 koncentracijskih razina. Na slici 6. grafički je prikaz ovisnosti apsorbancije (A) o množinskoj koncentraciji (c) za Trolox.



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije (A) o množinskoj koncentraciji (c) za Trolox

Jednadžba pravca glasi: $Y = 0,6093 X + 0,0143$, gdje je X koncentracija Trolox ekvivalenta izražena u mmol/L, a Y izmjerena apsorbancija. Koeficijent determinacije R^2 iznosi 0,9992, dok koeficijent korelacije iznosi 0,9996, što znači da je pozitivna korelacija te da apsorbancija raste proporcionalno s povećanjem molarne koncentracije.

Slika 7. prikazuje rezultate određivanja antioksidativne aktivnosti uzoraka kiselog tijesta izraženih kao $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari uzorka.



Slika 7. Antioksidativna aktivnost uzoraka kiselog tijesta

Uzorak tijesta bez kiseljena s dodatkom brašna graška ima 3 % veću antioksidativnu aktivnost od uzorka bez dodatka brašna graška (slika 7). Uzorak kiselog tijesta s BMK *L. reuteri* te bez brašna graška ima 2,5 % veću antioksidativnu aktivnost nego isti uzorak s dodatkom brašna graška. Tijesto s dodatkom BMK *L. brevis* i dodatkom brašna graška ima 8 % veću antioksidativnu aktivnost od uzorka bez dodatka brašna graška. Kiselo tijesto s dodatkom BMK *L. fermentum* bez dodatka brašna graška ima 7 % veću antioksidativnu aktivnost od istog uzorka s dodatkom brašna graška (slika 7). S obzirom na dobivene rezultate utvrđeno je da dodatak brašna graška dovodi do smanjene antioksidativne aktivnosti kiselog tijesta.

Kiseljenje uz dodatak različitih BMK utjecalo je na povećanje antioksidativne aktivnosti kiselog tijesta. Antioksidativna aktivnost kiselog tijesta s *L. reuteri* te bez dodatka brašna graška veća je za 42 % od antioksidativne aktivnosti tijesta koje nije kiseljeno i koje ne sadrži brašno graška. Kiseljenje tijesta s dodatkom bakterije *L. brevis* bez dodatka brašna graška dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti za 28 %, a s dodatkom *L. fermentum* za 40 %, u odnosu na tijesto bez kiseljenja te bez dodatka brašna graška (slika 7).

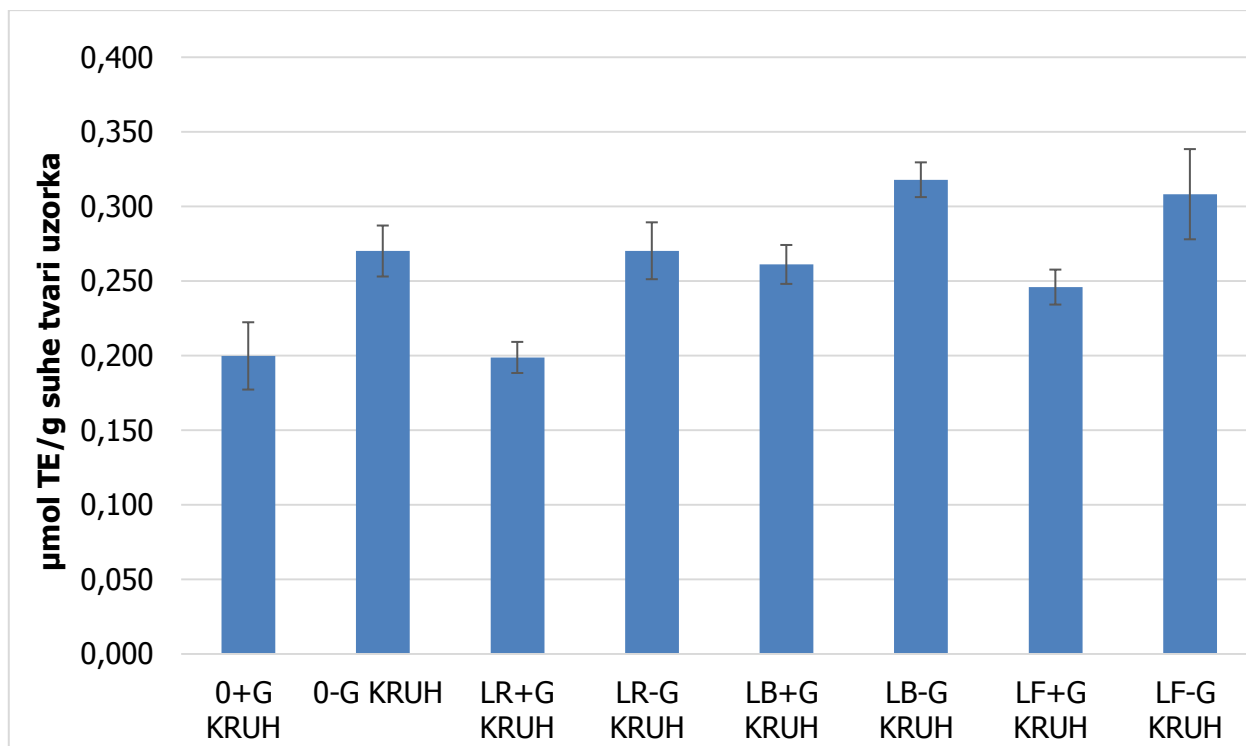
Na slici 7. su također vidljive i razlike u antioksidativnim aktivnostima kiselog tijesta ovisno o primijenjenoj bakteriji mliječne kiseline te bez dodatka brašna graška, pri čemu je kiselo tijesto s

dodatkom *L. reuteri* i bez dodatka graška imalo najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti (za 19 % veću vrijednost u odnosu na *L. brevis*, odnosno za 3 % veću u odnosu na *L. fermentum*).

Od svih uzoraka kiselog tijesta, najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje uzorak pripremljen s BMK *L. reuteri* (slika 7) te bez dodatka brašna graška (0,405 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari), dok najmanju uzorak tijesta koji nije kiseljen uz bakterije mliječne kiseline te bez dodatka brašna graška (0,235 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari).

Tijekom kiseljenja tijesta dolazi do povećanja dostupnosti bioaktivnih komponenata (Coda i sur., 2011). Prema Dulf i sur. (2005) razlog tome je fermentacija kod koje dolazi do kidanja veza između fenolnih spojeva i drugih komponenata u konjugiranim molekulama u tzv. slobodnu formu pri čemu dolazi do povećanja antioksidativne aktivnosti, a sve to je posljedica enzima koji izlučuju bakterije tijekom fermentacije. Bioaktivne komponente nalaze se u klici biljke te ovisno o tipu korištene starter kulture kao i o samom materijalu (biljci) ovisi stupanj promjena tijekom fermentacijskog procesa. U istraživanju Katine i sur. (2007) fermentacijski proces kombiniran je s klijanjem (prilikom čega se također događaju određene biokemijske promjene u biljci) te rezultiraju većim udjelom dostupnih fenolnih spojeva koji utječu na povećanje antioksidativne aktivnosti.

Na slici 8. je prikaz rezultata određivanja antioksidativne aktivnosti uzoraka kruha izraženih kao $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari uzorka.



Slika 8. Antioksidativna aktivnost uzoraka kruha

Uzorak kruha bez kiseljenja te bez dodatka brašna graška ima 26 % veću antioksidativnu aktivnost od uzorka s dodatkom brašna graška. Uzorak kruha koji je prošao proces kiseljenja s BMK *L. reuteri* bez dodatka brašna graška ima 26 % veću antioksidativnu aktivnost od uzorka s dodatkom brašna graška. Kruh pripremljen kiseljenjem s BMK *L. brevis* bez dodatka brašna graška ima 17 % veću antioksidativnu aktivnost od uzorka kruha s dodatkom brašna graška. Uzorak kruha kiseljen s BMK *L. fermentum* bez dodatka brašna graška ima 20 % veću antioksidativnu aktivnost od uzorka kruha s dodatkom brašna graška. Kod svih uzoraka, dodatak brašna graška doveo je do smanjenja antioksidativne aktivnosti (slika 8).

Proces kiseljenja kruha uz dodatak BMK te bez dodatka brašna graška pokazao je veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti: za 1 % veću s *L. reuteri*, odnosno za 15 % s *L. brevis* te 12 % veću s *L. fermentum* u odnosu na kruh koji nije prošao proces kiseljenja te koji ne sadrži brašno graška (slika 8).

Najveća vrijednost antioksidativne aktivnosti kako je prikazano na slici 8., uspoređujući kiseljene uzorke koji sadrže bakterije mliječne kiseline bez dodatka brašna graška, postignuta je za uzorke s kulturom *L. brevis* koja je za 15 % veća u odnosu na kruh s *L. reuteri* te za 3 % veća u odnosu na *L. fermentum* (slika 8).

Od svih uzorak kruha, najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti imao je kruh s dodatkom kulture *L. brevis* te bez dodatka brašna graška (0,318 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari) dok je najmanja vrijednost (0,199 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari) dobivena za uzorak kruha s *L. reuteri* i dodatkom brašna graška (slika 8).

Uspoređujući vrijednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka kruha i tijesta, koje je kiseleno s dodanim kulturama bakterija mliječne kiseline koje su provele fermentaciju, bez dodatka brašna graška (slike 7 i 8) *L. reuteri* za uzorak kiselog tijesta ima 35 % veću antioksidativnu aktivnost od istog uzorka za kruh, odnosno *L. brevis* 3 % veću te *L. fermentum* 22 % veću vrijednost od uzorka kruha.

Antioksidativne vrijednosti uzoraka kruha i tijesta kiselenog s BMK i brašnom graška također se mogu usporediti te je uzorak kiselog tijesta s *L. reuteri* i brašnom graška imao 50 % veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti nego isti uzorak kruha. Kiselo tijesto s BMK *L. brevis* i brašnom graška imalo je 28 % veću, dok je kiselo tijesto s *L. fermentum* imalo 34 % veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na iste uzorke kruha (slike 7 i 8).

Usporedbom rezultata koji su dobiveni za kiselo tijesto (slika 7) te za kruh (slika 8) koji nisu prošli proces kiseljenja, ali s dodatkom brašna graška, utvrđeno je da je kiselo tijesto imalo za 18 % veću vrijednost antioksidativne aktivnosti u odnosu na isti uzorak kruha. Uzorak tijesta bez kiseljenja te bez dodatka brašna graška imao je za 13 % manju vrijednost antioksidativne aktivnosti u odnosu na isti uzorak kruha. Na osnovu dobivenih rezultata, sve vrijednosti su bile veće za uzorke kiselog tijesta u odnosu na uzorak kruha.

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti kruha ukazuju na njeno smanjenje u usporedbi s rezultatima kiselog tijesta ovisno o primjenjenim bakterijama i uzorcima sa/bez brašna graška te su rezultati u rasponu od minimalnih 3 % do maksimalnih 50 % (slike 7 i 8).

To se može protumačiti kao posljedica termičke obrade koja može utjecati na sastav polifenola, pri čemu dolazi do njihove degradacije. Međutim, prilikom termičke obrade može doći do stvaranja novih komponenata, koje su posljedica Maillardovih reakcija, a koje imaju antioksidativnu aktivnost. Takvi produkti izazivaju "maskirajući" efekt zbog kojeg se ne može procijeniti stvarni gubitak antioksidansa tijekom procesiranja (Sakač i sur., 2010).

5. ZAKLJUČAK

Obzirom na provedeno istraživanje i dobivene rezultate možemo zaključiti sljedeće:

1. Antioksidativna aktivnost ovisi o primijenjenim sirovinama i tehnološkom postupku te se mijenja tijekom faza proizvodnje kruha.
2. Proces kiseljenja tijesta uz dodatak bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* ima pozitivan učinak na antioksidativnu aktivnost kiselog tijesta i kruha.
3. Dodatak brašna graška ima negativan utjecaj na antioksidativnu aktivnost kiselog tijesta i kruha.
4. U odnosu na kruh, kiselo tijesto ima veću antioksidativnu aktivnost.

6. LITERATURA

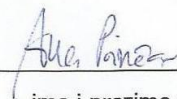
- Agboola S. O., Mofolasayo O. A., Watts B. M., Aluko R. E. (2010) Functional properties of yellow field pea (*Pisum sativum L.*) seed flours and the in vitro bioactive properties of their polyphenols. *Food Research International* **43**: 582-588.
- Antioxidant effect of polyphenols and natural phenols (2006) <http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant_effect_of_polyphenols_and_natural_phenols>. Pristupljeno 9.7.2017.
- Barber B., Ortolá C., Barber S., Fernández F. (1992) Storage of packaged white bread. III. Effects of sour dough and addition of acids on bread characteristics. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **149**: 442-449.
- Calasso M., Gobbetti M. (2011) Lactobacillus spp.: Other Species. *Reference Module in Food Science* **3**: 1507-1511.
- Clarke C., Schober T. J., Arendt E. K. (2002) Effect of singlestrain and traditional mixed strain starter cultures in rheological properties of wheat dough and bread quality. *Cereal Chemistry* **79**: 640-647.
- Coda R., Cagno R. D., Gobbetti M., Rizzello C. G. (2013) Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology* **37**:51-58.
- Corsetti C. A., Gobbetti, G. M., Rossi R. J., Damiani D. P. (1998) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology Biotechnology* **50**: 253-256.
- Curiel J. A., Coda R., Centomani I., Summo C., Gobbetti M., Rizzello C. A. (2014) Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **196**: 51-61.
- Čakarić D. (2009) Primjena cikličke voltometrije u određivanju antioksidativne aktivnosti bioloških uzoraka. Zagreb, FKIT.
- D'Archivio M., Filesì C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Masella C. J. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita* **43**: 348-361.
- Demirbaş F., İspirli H., Kurnaz A. A., Yılmaz M. T., Dertli E. (2017) Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT - Food Science and Technology* **79**: 361-366.
- De Vuyst L., Neysens P. (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 43-56.
- Duranti M., Gius C. (1997) Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research* **53**: 31-45.

- Duranti M. (2006) Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, **77(2)**: 67-82.
- Gänzle M. G. (2013) Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology* **37**: 2-10.
- Ghodbane S., Lahbib A., Sakly M., Abdelmelek H. (2013) Bioeffects of Static Magnetic Fields: Oxidative Stress, Genotoxic Effects, and Cancer Studies. *BioMed Research International* **2013**: 1-12.
- Hammes W. P., Gänzle M. G. (1998): Sourdough breads and related products. U: Microbiology of Fermented foods **2**: 199-216. *Blackie Academic & Professional*, London
- Hansen A., Hansen B. (1996): Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. **202**: 244-249.
- Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* **73**: 365-373.
- Hozová B., Janáovišová J., Dodok L., Buchtová V., Staruch L. (2002) Use of transglutaminase for improvement of quality of pastry produced by frozen-dough technology. *Czech Journal of Food Sciences* **20**: 215-222.
- Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **53**: 1841-1856.
- Jonagh G., Slim T., Greve H. (1968) Bread without gluten. *Bakers Digest* **6**: 24-29.
- 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 the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science* **46**: 348-355.
- Klas K. (2015) Primjena kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskog kruha obogaćenog proteinima, Zagreb, PBF.
- Loftus C. G., Murray J. A. (2003) Celiac Disease: Diagnosis and Management. *Hospital Physician* **9**: 1582-1592.
- Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D. M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J. H., Díaz-Muñiz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R. Lorca, G. Altermann, E. Barrangou, R. Ganesan, B. Xie, Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**:15611-15616.

- Mine Y. (2002) Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World Polutry Science Journal* **58**: 31-39.
- Mondor M., Guévremont E., Villeneuve S. (2014) Processing, characterization and bread-making potential of malted yellow peas. *Food Bioscience* **7**: 11-18.
- Pырzыnska K., Pekal A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods* **5**: 4288.
- Renzetti S., Dal Bello F., Arendt E.K. (2008) Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science* **48**: 33-45.
- Rizzello C. A., Calasso M., Campanella D., De Angelis M., Gobbetti M. (2014) Use of sourdough fermentation and mixture of wheat, chickpea, lentil and bean flours for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread. *International Journal of Food Microbiology* **180**: 78–87.
- Sakač M., Torbica A., Sedej I., Hadnađev M. (2011) Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flours. *Food Research International* **44**: 2806-2813.
- Sosulski F., Krygier K., Hogge L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound Phenolic acids. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **30**: 337-40.
- Vankosky M. A., Cárcamo H. A., McKenzie R. H., Dossall L. M. (2011) Integrated management of with nitrogen fertilizer, and thiamethoxam insecticide. *Agronomy Journal* **103(3)**: 565-572.
- Vehtersbah-Stojan P. (2015) Antioksidansi u aterosklerozi, Zagreb, FBF
- Vitamin A (2002) http://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_A. Pristupljeno 1.7.2017.
- Vlainić V. (2010) Mutabilnost bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum*. Zagreb, PBF.
- Vrhovac B., Francetić I., Jakšić B., Labar B., Vucelić B. (2003) Interna medicina, Zagreb, Ljevak str. 584-589; 408-409.
- Wootton-Beard P. C., Ryan L. (2011) Improving public health: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International* **44**: 3135-3136.
- Wu T., Taylor C., Nebl T., Ng K., Bennett L. E. (2017) Effects of flour composition and baking on in vitro digestibility of proteins in breads made from selected gluten-containing and gluten-free flours. *Food Chemistry* **233**: 514-524.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



ime i prezime studenta