



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Saša Drakula

**RAZVOJ BEZGLUTENSKOGA KRUHA  
POBOLJŠANE AROME, POVEĆANE  
PREHRAMBENE VRIJEDNOSTI I  
PRODULJENE TRAJNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Saša Drakula

**RAZVOJ BEZGLUTENSKOGA KRUHA  
POBOLJŠANE AROME, POVEĆANE  
PREHRAMBENE VRIJEDNOSTI I  
PRODULJENE TRAJNOSTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Mirjana Hruškar

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Saša Drakula

**DEVELOPMENT OF GLUTEN FREE  
BREAD WITH ENHANCED AROMA,  
INCREASED NUTRITIVE VALUE AND  
PROLONGED SHELF LIFE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Mirjana Hruškar, Full professor

Zagreb, 2020

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo je temu ovog doktorskog rada pod naslovom „Razvoj bezglutenskoga kruha poboljšane arome, povećane prehrambene vrijednosti i produljene trajnosti“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanje mentora na sjednici održanoj 25. veljače 2016. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 19. travnja 2016. godine.

Doktorski rad izrađen je u okviru znanstveno-istraživačkih projekata Primjena vakuumskog hlađenja u proizvodnji hrane produljene trajnosti i svježine (09.01/279) i Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-06-2016-3789) financiranih od strane Hrvatske zaklade za znanost.

## **Informacije o mentoru**

**Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar** je redovita profesorica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je zaposlena od 1992. godine. Na istom fakultetu je doktorirala 2001. godine. U svom znanstveno-istraživačkom radu bavi se kvalitetom i sigurnošću hrane, fizikalno-kemijskim, instrumentalnim, enzimskim i senzorskim analizama hrane te validacijom analitičkih metoda. Sudjelovala je u sedam nacionalnih i tri međunarodna znanstvena projekta. Bila je voditeljica projekta Unapređivanje studijskih programa u biotehničkom području prema načelima HKO-a sufinanciranog iz Europskog socijalnog fonda Europske unije. Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskim, diplomskim, poslijediplomskim specijalističkim studijima i doktorskom studiju kao nositelj devet te suradnik na osam predmeta. Objavila je 57 znanstvenih radova, od kojih su 22 rada zastupljena u bazama podataka Current Contents i Science Citation Index Expanded, 21 rad u drugim indeksiranim časopisima, a 14 radova u zbornicima radova s međunarodnih znanstvenih skupova. Sudjelovala je na 54 znanstvena skupa. Koautorica je sveučilišnog priručnika „Likopen u rajčici – svojstva, stabilnost i značaj u prehrani“ te e-priručnika „Upravljanje kvalitetom hrane“. Mentorica je devet završnih, 23 diplomska, tri znanstvena magistarska, četiri završna specijalistička i dva doktorska rada te tri studentska rada nagrađena Rektorovom nagradom. Dobitnica je Godišnje nagrade za znanstveno-istraživački rad Društva sveučilišnih nastavnika i ostalih znanstvenika u Zagrebu, Priznanja PBF-a za dugogodišnju uspješnu suradnju i izvanredan doprinos na promicanju visokog obrazovanja, znanosti i struke te Posebnog priznanja Rektora Sveučilišta u Zagrebu za doprinos unaprjeđenju sustava kvalitete. Članica je Hrvatske mljekarske udruge, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista te je više godina članica uređivačkog odbora znanstveno-stručnog časopisa Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam. Na Fakultetu i Sveučilištu je bila predsjednica ili članica više odbora, povjerenstava i drugih tijela. Od 2007. do 2011. godine je bila prodekanica za nastavu, a od 2011. do 2015. godine dekanica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Od 2015. godine prof. dr. sc. Mirjana Hruškar obnaša dužnost prorektorice za prostorni razvoj i sustav kontrole kvalitete Sveučilišta u Zagrebu. Od 2017. godine je suradnica Hrvatske akademije tehničkih znanosti za biotehničko područje, a od 2019. godine članica Akademije poljoprivrednih znanosti.

*Prof. dr. sc. Mirjani Hruškar zahvaljujem na pruženoj prilici, mentorstvu, prenesenom znanju i vrijednim savjetima pri izradi ovog rada.*

*Prof. dr. sc. Duški Ćurić veliko hvala na svesrdnoj pomoći, podršci i neiscrpnim stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Prof. dr. sc. Kseniji Marković i dr. sc. Igoru Lukiću zahvaljujem na vrijednim savjetima koji su doprinijeli povećanju kvalitete ovog rada.*

*Izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni, izv. prof. dr. sc. Marini Krpan, doc. dr. sc. Nikolini Čukelj Mustač, dr. sc. Bojani Voučko, dr. sc. Ivni Vrana Špoljarić i Lidiji Drobac, univ. bacc. puno hvala na svemu što su me naučile, idejama, savjetima, motivaciji, nesebičnoj pomoći i podršci u svakom trenutku te odličnoj radnoj atmosferi.*

*Prof. dr. sc. Nadi Vahčić zahvaljujem na stručnim savjetima pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marini Tomašević na pomoći pri GC-MS analizama.*

*Hvala kolegama i studentima koji su sudjelovali u senzorskim analizama i tako doprinijeli izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se svim kolegama, članovima Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda i Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, na ugodnoj radnoj atmosferi i susretljivosti.*

*Hvala mojim dragim prijateljima što su uvijek uz mene.*

*Najdražem pužu mužu beskrajno hvala što mi uljepšava život svaki dan.*

*Svojoj obitelji zahvaljujem na neizmjerne podršci i razumijevanju u svakom trenutku.*

**Sveučilište u Zagrebu****Prehrambeno-biotehnološki fakultet****Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo,  
prehrambena tehnologija i nutricionizam****UDK: 664.64.016.7:664.653:664.664(043.3)****Znanstveno područje: Biotehničke znanosti****Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija****RAZVOJ BEZGLUTENSKOGA KRUHA POBOLJŠANE AROME, POVEĆANE  
PREHRAMBENE VRIJEDNOSTI I PRODULJENE TRAJNOSTI**

Saša Drakula, mag. ing. techn. aliment.

**Rad je izrađen** na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu**Mentor:** Prof. dr. sc. Mirjana Hruškar

**Kratki sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj dodatka brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline, prekursora hlapljivih spojeva arome i proteaza na kvalitetu bezglutenskog kruha. Primjena kombinacije navedenih dodataka doprinijela je poboljšanju profila hlapljivih spojeva arome, senzorskih svojstava, prehrambene vrijednosti i trajnosti kruha. Profil hlapljivih spojeva arome te intenzitet pojedinih atributa mirisa i arome kruha razlikovao se ovisno o dodatku brašna žutog graška, kiselog tijesta i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje, prekursora hlapljivih spojeva arome i proteaza te njihovoj interakciji. Dodatak brašna žutog graška povećao je prehrambenu vrijednost kruha, ali i narušio prihvatljivost njegovog mirisa. Dodatak kiselog tijesta poboljšao je prihvatljivost mirisa sredine kruha s dodatkom brašna žutog graška, a kruh s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *Lactobacillus brevis* DSM 20054 pokazao se senzorski najprihvatljivijim. Dodatak većine prekursora hlapljivih spojeva arome, proteaza, kiselog tijesta i njihovih kombinacija pozitivno je utjecao na prihvatljivost mirisa sredine i arome kruha. Pri tome se kruh s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, proteaza, prolina i fruktoze (KtAEPF) pokazao senzorski najprihvatljivijim. Polupečenom kruhu KtAEPF s 30 % kiselog tijesta zapakiranom u modificiranoj atmosferi produljena je trajnost na 30 dana pri sobnoj temperaturi, u usporedbi s pet dana trajnosti kruha bez navedenih dodataka.

**Broj stranica:** 270**Broj slika:** 59**Broj tablica:** 50**Broj literaturnih navoda:** 382**Broj priloga:** 7**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** bezglutenski kruh, brašno žutog graška, kiselo tijesto, prekursori hlapljivih spojeva arome, profil hlapljivih spojeva arome, proteaze, senzorska svojstva, trajnost**Datum obrane:** 17. srpnja 2020.**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Prof. dr. sc. Duška Čurić
2. Prof. dr. sc. Ksenija Marković
3. Dr. sc. Igor Lukić, viši znanstveni suradnik
4. Prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)

**Rad je pohranjen u:** knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4; Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.



## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

PhD thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Postgraduate study of Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition**

**UDK: 664.64.016.7:664.653:664.664(043.3)**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**

**Scientific Field: Food Technology**

### **DEVELOPMENT OF GLUTEN FREE BREAD WITH ENHANCED AROMA, INCREASED NUTRITIVE VALUE AND PROLONGED SHELF LIFE**

Saša Drakula, mag. ing. techn. aliment.

**Thesis performed** at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

**Supervisor:** PhD Mirjana Hruškar, Full professor

**Short abstract:** The aim of this study was to determine the effect of the addition of yellow pea flour, sourdough prepared with various lactic acid bacteria, volatile flavour compounds precursors, and proteases on the quality of gluten free bread. The application of the combination of mentioned improvers enhanced its volatile flavour compounds profile, sensory properties, nutritional value, and shelf life. The volatile flavour compounds profile and the intensity of bread odour and flavour attributes differed depending on the addition of yellow pea flour, sourdough and lactic acid bacteria used for acidification, volatile flavour compounds precursors, proteases, as well as their interaction. The addition of yellow pea flour increased the nutritional value of the bread, but also impaired its odour acceptability. The addition of sourdough improved the odour of the bread crumb containing yellow pea flour, while the most sensory acceptable bread was the one with the *Lactobacillus brevis* DSM 20054 sourdough. The addition of most volatile flavour compounds precursors, proteases, sourdough, and their combinations positively affected the crumb odour and bread flavour acceptability. Bread with the addition of *L. brevis* sourdough, arginine, proteases, proline, and fructose (KtAEPF) was the most sensory acceptable. Partially baked KtAEPF bread with 30% sourdough packed in a modified atmosphere had a prolonged shelf life of 30 days at room temperature, compared to five days for bread with no improvers added.

**Number of pages:** 270

**Number of figures:** 59

**Number of tables:** 50

**Number of references:** 382

**Number of supplements:** 7

**Original in:** Croatian

**Key words:** gluten free bread, volatile flavour compounds precursors, volatile flavour compounds profile, proteases, sensory properties, shelf life, sourdough, yellow pea flour

**Date of the thesis defense:** 17 July 2020

**Reviewers:**

1. PhD Duška Ćurić, Full professor
2. PhD Ksenija Marković, Full professor
3. PhD Igor Lukić, Senior scientific associate
4. PhD Ines Panjkota Krbavčić, Full professor (substitute)

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23; National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4; University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

## **RAZVOJ BEZGLUTENSKOGA KRUHA POBOLJŠANE AROME, POVEĆANE PREHRAMBENE VRIJEDNOSTI I PRODULJENE TRAJNOSTI**

### **Sažetak:**

Bezglutenski kruh uobičajeno karakterizira mala prehrambena vrijednost, loša tekstura, miris i aroma te kratka trajnost budući da se najčešće proizvodi na bazi škroba i rafiniranih brašna. Potrebu za njegovim poboljšanjem dodatno naglašava činjenica da su potrošači većinom nezadovoljni senzorskim svojstvima bezglutenskog kruha dostupnog na tržištu, a koja su ključna pri odluci o kupnji. Primjena brašna mahunarki, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima koji kataliziraju njihov nastanak ima potencijala doprinijeti poboljšanju sveukupno loše kvalitete bezglutenskog kruha. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj dodatka brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline (*Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus brevis* 20054, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052), šećera (glukoze i fruktoze) i aminokiselina (arginina i prolina) kao prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima proteaza na prehrambenu vrijednost, profil hlapljivih spojeva arome, fizikalno-kemijska i senzorska svojstva te trajnost proizvedenog bezglutenskog kruha.

Profil hlapljivih spojeva arome te intenzitet pojedinih atributa mirisa i arome kruha razlikovao se ovisno o dodatku brašna žutog graška, kiselog tijesta i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje te njihovoj interakciji. Kruh s dodatkom brašna žutog graška karakterizirala je veća koncentracija većine analiziranih hlapljivih spojeva arome u odnosu na kruh bez njegovog dodatka, a u kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta utvrđeno je povećanje koncentracije većine analiziranih pirazina i drugih poželjnih spojeva koji nastaju pri pečenju. Dodatak brašna žutog graška je negativno utjecao na prihvatljivost mirisa sredine i kore kruha, a u kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta došlo je do pozitivnog djelovanja kiselog tijesta na prihvatljivost mirisa sredine kruha. Pri tome se kruh s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* pokazao najprihvatljivijim.

Dodatak prekursora hlapljivih spojeva arome i proteaza je također utjecao na profil hlapljivih spojeva arome, intenzitet pojedinih atributa mirisa i arome kruha, pri čemu se razmjer njihovog učinka razlikovao ovisno o pojedinom dodatku, kombinaciji dodataka te kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta. Dodatak većine prekursora hlapljivih spojeva arome, proteaza, kiselog tijesta i njihovih kombinacija pozitivno je utjecao na prihvatljivost mirisa sredine i arome kruha te je uzorke kruha s njihovim dodatkom karakterizirao izraženiji miris kore po

prženom šećeru i izgorenom. Najveća koncentracija analiziranih pirazina, pirola i furana karakterizirala je kruh s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, proteaza, prolina i fruktoze (KtAEPF), a koji se ujedno pokazao senzorski najprihvatljivijim s obzirom na miris i aromu.

S obzirom na utjecaj udjela dodanog kiselog tijesta (10 %, 20 % i 30 %), kruh KtAEPF s dodatkom 30 % kiselog tijesta pokazao se senzorski najprihvatljivijim i najpoželjnijim. U odnosu na kruh bez dodatka brašna žutog graška, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (0-G), prehrambena vrijednost kruha KtAEPF s 30 % kiselog tijesta povećana je s obzirom na udjel vlakana, proteina i pepela. Polupečenom kruhu KtAEPF s 30 % kiselog tijesta zapakiranom u modificiranoj atmosferi i skladištenom pri sobnoj temperaturi produljena je trajnost na 30 dana, u usporedbi s pet dana trajnosti kruha bez navedenih dodataka (0-G).

Iz svega navedenog može se zaključiti kako je primjenom kombinacije brašna žutog graška, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i proteaza poboljšana kvaliteta bezglutenskog kruha – njegov profil hlapljivih spojeva arome, senzorska svojstva, prehrambena vrijednost i trajnost.

**Ključne riječi:** bezglutenski kruh, brašno žutog graška, kiselo tijesto, prekursori hlapljivih spojeva arome, profil hlapljivih spojeva arome, proteaze, senzorska svojstva, trajnost

## **DEVELOPMENT OF GLUTEN FREE BREAD WITH ENHANCED AROMA, INCREASED NUTRITIVE VALUE AND PROLONGED SHELF LIFE**

### **Abstract:**

Gluten free bread is typically characterised by low nutritional value, poor texture, odour and flavour as well as short shelf life since it is usually based on starch and refined cereal flours. The need for its improvement is further emphasised by the fact that consumers are mostly dissatisfied with the sensory properties of gluten free bread available on the market, which are crucial for the purchase decision. The use of legume flour, sourdough, volatile flavour compounds precursors, and enzymes that catalyse their formation has the potential for improving the overall poor quality of gluten free bread. The aim of this study was to determine the effect of the addition of yellow pea flour, sourdough prepared with various lactic acid bacteria (*Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus brevis* 20054, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052), sugars (glucose and fructose) and amino acids (arginine and proline) as volatile flavour compounds precursors, and proteases on the nutritional, physico-chemical, sensory properties, and shelf life of gluten free bread.

The volatile flavour compounds profile and the intensity of bread odour and flavour attributes differed depending on the addition of yellow pea flour, sourdough and lactic acid bacteria applied for its preparation, as well as their interaction. Bread with the addition of yellow pea flour was characterised by a higher concentration of most of the analysed volatile flavour compounds compared to bread without its addition. In combination with the sourdough addition, an increase in concentration of most of the analysed pyrazines and other desirable compounds resulting from baking was determined. The addition of yellow pea flour impaired crumb and crust odour acceptability, while the addition of sourdough positively affected crumb odour of bread containing yellow pea flour. Bread with *L. brevis* sourdough was the most sensory acceptable.

The addition of volatile flavour compounds precursors and proteases also affected the volatile flavour compounds profile and the intensity of individual odour and flavour attributes of bread, with the extent of their effect differing based on the addition of single improver or their combination, as well as their addition in combination with the sourdough. The addition of most volatile flavour compounds precursors, proteases, sourdough, and their combinations improved the acceptability of crumb odour and bread flavour. It also attributed to the more pronounced caramelised sugar and burnt odour. Bread with the addition of *L. brevis*

sourdough, arginine, proteases, proline, and fructose (KtAEPF) had the most sensory acceptable odour and flavour and was characterised by the highest concentration of analysed pyrazines, pyrroles, and furans.

Considering the influence of the proportion of added sourdough (10%, 20% and 30%), KtAEPF bread with the addition of 30% sourdough was the most sensory acceptable and desirable one. Compared to the bread without the addition of yellow pea flour, sourdough, volatile flavour compounds precursors, and proteases (0-G), the nutritional value of KtAEPF bread with 30% sourdough dough was improved with respect to the fibre, protein and ash content. Partially baked KtAEPF bread with 30% sourdough packed in a modified atmosphere had a prolonged shelf life of 30 days at room temperature, compared to five days for bread with no improvers added (0-G).

Considering all the obtained results, it can be concluded that the application of a combination of yellow pea flour, sourdough, volatile flavour compounds precursors, and proteases improved the quality of gluten free bread – its volatile flavour compounds profile, sensory properties, nutritional value, and shelf life.

**Keywords:** gluten free bread, volatile flavour compounds precursors, volatile flavour compounds profile, proteases, sensory properties, shelf life, sourdough, yellow pea flour

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. Celijakija i bezglutenska prehrana.....	3
2.2. Bezglutenski kruh.....	3
2.2.1. Svojstva bezglutenskog kruha .....	5
2.2.2. Metode poboljšanja svojstava bezglutenskog kruha .....	5
2.2.2.1. Sirovine i aditivi .....	6
2.2.2.2. Primjena tehnologija u svrhu poboljšanja svojstava bezglutenskog kruha .....	8
2.2.2.3. Izazovi i budućnost proizvodnje bezglutenskog kruha .....	9
2.3. Mahunarke .....	9
2.3.1. Grašak.....	12
2.3.1.1. Prehrambena vrijednost i funkcionalna svojstva graška .....	12
2.3.1.2. Aroma graška .....	13
2.3.1.3. Primjena graška u proizvodima na bazi žitarica.....	14
2.4. Kiselo tijesto.....	15
2.4.1. Metabolizam bakterija mliječne kiseline.....	16
2.4.2. Utjecaj dodatka kiselog tijesta na svojstva kruha.....	18
2.4.3. Mahunarke i kiselo tijesto .....	19
2.5. Profil hlapljivih spojeva arome kruha .....	20
2.5.1. Porijeklo hlapljivih spojeva arome .....	22
2.5.1.1. Fermentacija .....	22
2.5.1.2. Oksidacija lipida.....	24
2.5.1.3. Maillardova reakcija.....	25
2.5.1.4. Karamelizacija.....	26
2.5.1.5. Toplinska degradacija .....	27
2.5.1.6. Interakcije pri nastanku hlapljivih spojeva arome.....	27
2.5.2. Aroma bezglutenskog kruha i metode poboljšanja .....	28
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>30</b>
3.1. Propagacija bakterija mliječne kiseline .....	31
3.2. Priprema kiselog tijesta i kruha .....	32
3.2.1. Priprema kiselog tijesta .....	32
3.2.2. Priprema kruha .....	32
3.2.2.1. Vakuum hlađenje polupečenog kruha .....	36
3.2.2.2. Pakiranje i skladištenje kruha pri određivanju trajnosti .....	36
3.3. Određivanje kemijskog sastava .....	37
3.4. Određivanje broja živih stanica bakterija mliječne kiseline.....	38
3.5. Određivanje broja živih stanica kvasaca .....	38
3.6. Određivanje pH i ukupne kiselosti .....	39
3.7. Određivanje šećera i kiselina.....	39
3.8. HS-SPME/GC-MS analiza profila hlapljivih spojeva arome.....	41
3.8.1. Optimizacija HS-SPME ekstrakcije .....	45
3.8.2. HS-SPME/GC-MS analiza .....	45
3.8.3. Validacija metode.....	47
3.8.4. Statistička obrada .....	47
3.9. HS-SPME/GC-MS analiza akroleina .....	48
3.9.1. Priprema kemikalija i uzoraka.....	48

3.9.2. Odabir uvjeta mikroekstrakcije .....	49
3.9.3. HS-SPME/GC-MS analiza .....	49
3.9.4. Validacija metode .....	50
3.10. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta .....	51
3.10.1. Liofilizacija uzoraka tijesta i kruha .....	51
3.10.2. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva .....	52
3.10.3. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva .....	52
3.10.4. DPPH metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta .....	53
3.10.5. FRAP metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta .....	53
3.10.6. HPLC metoda za određivanje fenolnih kiselina .....	54
3.10.7. Statistička obrada .....	55
3.11. Metode određivanja fizikalnih svojstava kruha .....	55
3.11.1. Specifični volumen kruha .....	55
3.11.2. Određivanje boje kore i sredine kruha .....	55
3.11.3. Određivanje teksture sredine kruha .....	56
3.11.4. Statistička obrada .....	56
3.12. Metoda određivanja sastava atmosfere u pakovini .....	56
3.13. Određivanje mikrobiološke ispravnosti kruha .....	57
3.14. Senzorske analize .....	57
3.14.1. Senzorska analiza mirisa kruha .....	58
3.14.1.1. Razvoj testa za deskriptivnu analizu mirisa kruha .....	58
3.14.1.2. Provođenje senzorske analize mirisa uzoraka kruha .....	60
3.14.2. Senzorska analiza arome kruha .....	61
3.14.2.1. Razvoj testa za deskriptivnu analizu arome kruha .....	61
3.14.2.2. Provođenje senzorske analize arome uzoraka kruha .....	64
3.14.3. Senzorska analiza izgleda i teksture kruha .....	65
3.14.4. Hedonistička senzorska analiza sveukupnog doživljaja kruha i test nizanja po preferenciji .....	66
3.14.5. Statistička obrada .....	66
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>68</b>
4.1. Prehrambena vrijednost sirovina .....	68
4.2. Utjecaj dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline .....	69
4.2.1. Mikrobiološka analiza, pH, ukupna kiselost, udjel kiselina i šećera .....	69
4.2.2. Optimizacija i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome .....	78
4.2.2.1. Optimizacija uvjeta SPME ekstrakcije .....	78
4.2.2.2. Validacija metode .....	81
4.2.3. Profil hlapljivih spojeva arome .....	88
4.2.3.1. Profil hlapljivih spojeva arome u različitim fazama pripreme kruha .....	88
4.2.3.2. Utjecaj dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline na profil hlapljivih spojeva arome kruha ...	121
4.2.4. Akrolein .....	129
4.2.4.1. Razvoj i validacija HS-SPME/GC-MS za određivanje akroleina .....	129
4.2.4.2. Akrolein u fazama pripreme kruha .....	134
4.2.5. Senzorska analiza .....	136
4.2.6. Korelacija senzorske analize i analize profila hlapljivih spojeva arome .....	149
4.2.7. Slobodni fenolni spojevi i antioksidativni kapacitet .....	151

4.3. Utjecaj dodatka kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima.....	157
4.3.1. Mikrobiološka analiza, pH, ukupna kiselost, udjel kiselina i šećera.....	157
4.3.2. Profil hlapljivih spojeva arome .....	164
4.3.3. Senzorska analiza .....	191
4.4. Optimizacija udjela dodanog kiselog tijesta.....	208
4.4.1. Fizikalno-kemijska svojstva kruha.....	208
4.4.2. Senzorska analiza .....	217
4.5. Prehrambena vrijednost i trajnost kruha.....	228
4.5.1. Prehrambena vrijednost kruha.....	228
4.5.2. Trajnost kruha.....	229
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>240</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>244</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>267</b>



## 1. UVOD

Bezglutenska prehrana je neophodan tretman kod osoba oboljelih od celijakije, a često ju karakterizira nizak unos vlakana, pojedinih vitamina i mineralnih tvari te povećan unos masti i energije. Bezglutenski kruh je uobičajeno male prehrambene vrijednosti, lošeg mirisa, arome i teksture te kratke trajnosti budući da se najčešće proizvodi na bazi škroba i rafiniranih brašna. Senzorska svojstva kruha presudna su za njegovu prihvatljivost od strane potrošača, a miris i aroma su svakako neka od ključnih svojstava. Profil hlapljivih spojeva koji utječu na miris i aromu kruha ovisi o primijenjenim sirovinama i uvjetima njegove proizvodnje. Stoga se miris i aroma bezglutenskog kruha uvelike razlikuju od mirisa i arome uobičajenog pšeničnog bijelog kruha. Bezglutenski kruh obično karakterizira manja koncentracija pirazina i drugih spojeva koji nastaju prilikom pečenja te posljedično manji intenzitet mirisa i arome po pečenom i izgorenom u odnosu na pšenični bijeli kruh.

Zbog svega navedenog se danas provode brojna istraživanja s ciljem poboljšanja kvalitete bezglutenskog kruha. Jedan od sve popularnijih načina povećanja njegove prehrambene vrijednosti je primjena brašna mahunarki budući da su odličan izvor vlakana, proteina i mineralnih tvari. Osim toga, mahunarke su uobičajeno premalo zastupljene u prehrani ljudi pa dodatak u kruh predstavlja način povećanja njihovog svakodnevnog unosa. Žuti grašak je jedna od mahunarki koja se može primijeniti za povećanje prehrambene vrijednosti kruha, a brašno žutog graška je dosad korišteno za obogaćivanje pšeničnog, kukuruznog i bezglutenskog kruha te kekisa, žitarica za doručak, biskvita i tjestenine. Međutim, negativna strana dodatka mahunarki u kruh je mogućnost narušavanja njegovih senzorskih svojstava. Kiselo tijesto se od davnina koristi pri proizvodnji kruha budući da pozitivno djeluje na njegovu prehrambenu vrijednost, senzorska svojstva i trajnost. Primjenjuje se i u proizvodnji bezglutenskog kruha, iako je zabilježen manje značajan pozitivan utjecaj njegovog dodatka na kvalitetu bezglutenskog u odnosu na uobičajeni kruh. Nadalje, na poboljšanje profila hlapljivih spojeva arome bezglutenskog kruha može se utjecati i dodatkom šećera i aminokiselina kao prekursora hlapljivih spojeva arome te proteaza kao enzima koji kataliziraju oslobađanje aminokiselina. Budući da svojstva kruha ovise o interakciji primijenjenih sirovina i uvjeta proizvodnje, potrebno je ispitati utjecaj brašna mahunarki, kiselog tijesta i prekursora hlapljivih spojeva arome na prehrambenu vrijednost i senzorska svojstva kruha te optimirati proces proizvodnje kruha s njihovim dodatkom.

Ciljevi ovog istraživanja bili su: (i) ispitati utjecaj dodatka brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima na profil hlapljivih spojeva arome i senzorska svojstva bezglutenskog kruha; (ii) optimizirati udjel dodanog kiselog tijesta s obzirom na senzorska i fizikalna svojstva bezglutenskog kruha; (iii) produljiti trajnost bezglutenskog kruha povećane prehrambene vrijednosti i poboljšanih senzorskih svojstava. Sveobuhvatno istraživanje provedeno je u svrhu stjecanja novih saznanja koja će doprinijeti postizanju povećanja kvalitete bezglutenskog kruha.

## **2. OPĆI DIO**

### **2.1. Celijakija i bezglutenska prehrana**

Celijakija je nasljedna, cjeloživotna, imunološki posredovana enteropatija uzrokovana intolerancijom glutena. Peptidi koji nastaju razgradnjom glutena odgovorni su za nepoželjni imunološki odgovor genetski predisponiranih pojedinaca oboljelih od celijakije. Celijakija se smatra i sustavnim poremećajem s mogućom kombinacijom znakova bolesti i simptoma povezanih s glutenom te za bolest specifičnim antitijelima. Očituje se upalnim promjenama sluznice tankog crijeva te posljedičnom malapsorpcijom hranjivih tvari, izvancrijevnim simptomima ili pak simptomi izostaju. Dijagnostika celijakije je vrlo kompleksna te se smatra kako postoji veliki broj nedijagnosticiranih osoba (Lindfors i sur., 2019). Prevalencija celijakije u svijetu određena na temelju serološke analize iznosi 1,4 % (Singh i sur., 2018). Osim celijakije, poremećaji povezani s glutenom uključuju i alergiju na pšenicu, dermatitis herpetiformis, glutensku ataksiju te preosjetljivost na gluten (Sapone i sur., 2012). Trenutno jedini učinkoviti tretman celijakije predstavlja bezglutenska prehrana (Vici i sur., 2016).

Gluten je strukturni protein prisutan u pšenici, raži i ječmu, a navedene žitarice koriste se u proizvodnji brojnih prehrambenih proizvoda. Prema Provedbenoj uredbi Komisije (EU) br. 828/2014, kako bi hrana mogla biti označena oznakom „bez glutena“ mora sadržavati manje od 20 mg glutena po kg proizvoda. Pridržavanje isključivo bezglutenske prehrane nije ni lako ni jednostavno radi ograničene dostupnosti i raznolikosti, više cijene bezglutenskih proizvoda, manje senzorske prihvatljivosti u odnosu na konvencionalne proizvode, potencijalne opasnosti od kontaminacije glutenom pri proizvodnji hrane te socijalnih ograničenja (Do Nascimento i sur., 2014; Zannini i sur., 2012). Bezglutenska prehrana je vrlo restriktivna te je uobičajeno siromašna vlaknima, vitaminom D, B<sub>12</sub>, folnom kiselinom, željezom, cinkom, kalcijem i magnezijem. Osim toga, karakterizira ju povećan unos zasićenih i hidrogeniranih masnih kiselina, povećan glikemijski indeks i glikemijsko opterećenje obroka (Vici i sur., 2016).

### **2.2. Bezglutenski kruh**

Gluten je zaslužan za kohezivnost i visko-elastična svojstva tijesta koja omogućuju zadržavanje plina tijekom fermentacije i održavanje porozne, spužvaste i elastične sredine kruha nakon pečenja (Belitz i sur., 2009; Wang i sur., 2017). Prolaminska frakcija glutena većinom doprinosi viskoznosti, a glutelinska frakcija elastičnosti i snazi tijesta (Belitz i sur.,

2009). Budući da je struktura koju tvori gluten ključna za izgled, teksturu, strukturu i aromu kruha (Zannini i sur., 2012), pri proizvodnji bezglutenskog kruha vrlo je izazovno postići svojstva slična glutenskom kruhu (Wang i sur., 2017).

Isključivanjem glutena iz recepture povećava se uloga škroba u osiguravanju strukture i teksture kruha (Witczak i sur., 2016). Uloga škroba u tijestu je vezanje vode i stvaranje stabilne strukture sposobne za zadržavanje plina (Abdel-Aal, 2009; Houben i sur., 2012; Zannini i sur., 2012). Škrob je polimer glukoze koji se sastoji od amiloze i amilopektina. Amiloza je nerazgranati lanac jedinica glukoze povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama, a amilopektin razgranati lanac jedinica glukoze povezanih  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama. Nativni škrob nalazi se u granulama različite veličine i oblika, ovisno o porijeklu škroba (Witczak i sur., 2016). Pri zagrijavanju suspenzije škroba u vodi dolazi do bubrenja škrobnih granula radi apsorpcije vode, a nastavkom zagrijavanja dolazi do pucanja škrobnih granula, izlaska amiloze iz granula te nastanka škrobne paste (Abdel-Aal, 2009). Pri hlađenju škrobne paste dolazi do ponovnog povezivanja molekula škroba – procesa retrogradacije i nastanka škrobnog gela. Amiloza je podložnija kristalizaciji te stvara čvrste gelove, dok amilopektin može biti dispergirani u vodi i stvara mekše gelove (Witczak i sur., 2016). Sposobnost bubrenja, vezanja vode, temperatura želatinizacije, svojstva pasti i škrobnih gelova ovise o porijeklu škroba, obliku i veličini granula, raspodjeli veličine čestica, omjeru amiloze i amilopektina, molekulskoj masi škroba, stupnju oštećenosti škroba, koncentraciji škroba i vode, pH i prisutnosti drugih molekula (masti, proteina, šećera, soli) (Abdel-Aal, 2009; Houben i sur., 2012; Witczak i sur., 2016). O navedenim funkcionalnim svojstvima škroba ovise struktura, tekstura i prihvatljivost konačnog proizvoda (Witczak i sur., 2016).

Bezglutenski kruh se uobičajeno proizvodi na bazi rižinog i kukuruznog brašna u kombinaciji s kukuruznim i krumpirovim škrobom i škrobom manioke (Capriles i Arêas, 2014; Masure i sur., 2016) budući da se radi o dostupnim i jeftinim sirovinama neutralne boje i okusa (Capriles i Arêas, 2014). Riža je bogata složenim i lako probavljivim ugljikohidratima, predstavlja izvor proteina hipoalergenih svojstava, mineralnih tvari (željeza, fosfora, kalija i magnezija) i vitamina B skupine te ima mali udjel natrija. Sastav rižinog brašna uvelike ovisi o kultivaru, okolišnim uvjetima i uvjetima obrade. Rižino brašno se uobičajeno dobiva od poliranog zrna kojem je prethodno mljevenjem uklonjen vanjski dio zrna u kojem je najveći udjel proteina, masti, vlakana, vitamina i mineralnih tvari. Prehrambena vrijednost integralnog rižinog brašna je veća, no trajnost takvog brašna je znatno kraća radi prisutnosti aktivne lipaze i lipoksigenaze te mogućeg razvoja užeglosti i gorkog okusa. Funkcionalna

svojstva rižinog brašna ponajviše ovise o škrobu, konkretnije o omjeru amiloze i amilopektina. Za pripremu tijesta odgovarajuće konzistencije s rižinim brašnom potrebna je znatno veća količina vode u odnosu na pšenično brašno (Rosell i Gómez, 2014).

Prethodno navedena brašna i škrobovi na bazi kojih se uobičajeno proizvodi bezglutenski kruh nemaju značajnu sposobnost tvorbe strukture kruha (Capriles i Arêas, 2014). S obzirom na to da ne postoji sastojak koji može nadomjestiti gluten u potpunosti (Capriles i sur., 2016), recepture za pripremu bezglutenskog kruha su uobičajeno kompleksne (Matos i Rosell, 2015). One uključuju veliki broj sastojaka kojima je zadaća nadomjestiti brojne uloge glutena. U tu svrhu dodaju se proteini, hidrokoloidi i drugi sastojci (Capriles i Arêas, 2014) koji doprinose tvorbi visko-elastične mreže za zadržavanje plina i strukture sredine, vezanju vode i razvoju volumena (Zannini i sur., 2012). U konačnici kvaliteta bezglutenskog kruha ovisi o primijenjenim sirovinama i uvjetima proizvodnje (Matos i Rosell, 2015).

### 2.2.1. Svojstva bezglutenskog kruha

Konzistencija glutenskog i bezglutenskog tijesta je vrlo različita. Bezglutenska tijesta karakterizira puno manja kohezivnost i elastičnost u odnosu na pšenično tijesto (Matos i Rosell, 2015) te ono često više nalikuje biskvitnom nego krušnom tijestu. Bezglutenski kruh uobičajeno karakterizira sveukupno lošija kvaliteta u odnosu na glutenski kruh – mala prehrambena vrijednost budući da se najčešće proizvodi na bazi škroba i rafiniranih brašna, slabo izražena boja, mali specifični volumen, mrvljiva sredina, nepoželjan okus, zrnatost i suhoća u ustima te kratka trajnost (Gallagher i sur., 2004; Houben i sur., 2012; Wang i sur., 2017). Na trajnost kruha utječe gubitak vlage, starenje i mikrobnog kvarenje (Capriles i Arêas, 2014), a bezglutenski kruh brže stari od pšeničnog radi lakše migracije i gubitka vode pri skladištenju (Moore i sur., 2004). Prema istraživanju provedenom od strane Do Nascimento i sur. (2014), osobe oboljele od celijakije nezadovoljne su senzorskim svojstvima bezglutenskog kruha, a ona predstavljaju ključan faktor pri donošenju odluke o kupnji.

### 2.2.2. Metode poboljšanja svojstava bezglutenskog kruha

U današnje vrijeme provode se brojna istraživanja s ciljem poboljšanja kvalitete bezglutenskog kruha s prehrambenog, tehnološkog, senzorskog aspekta i aspekta trajnosti kruha. Ona uključuju primjenu različitih sirovina, aditiva i tehnologija – bezglutenskih brašna, škrobova, hidrokoloida, proteina, mliječnih sastojaka, emulgatora, enzima, kiselog tijesta, tehnologije zamrzavanja, polupečenja i drugih tehnologija te njihovih kombinacija kao

potencijalnih poboljšivača (Wang i sur., 2017). Osim toga, provode se i istraživanja o utjecaju specifičnih tretmana (proteolize, kiseljenja tijesta) sirovina koje sadrže gluten u svrhu njegove potpune degradacije ili smanjenja koncentracije (Di Cagno i sur., 2008; Rizzello i sur., 2014b; Wang i sur., 2017).

#### 2.2.2.1. Sirovine i aditivi

Za povećanje prehrambene vrijednosti bezglutenskog kruha primjenjuju se brašna velike prehrambene vrijednosti koja uključuju brašna bezglutenskih žitarica (sirka, prosa), pseudožitarica (amaranta, heljde, kvinoje), mahunarki (slanutka, leće, graha, graška, soje), korijenja i gomolja (krumpira, batata, manioke), orašastih plodova, sjemenki, voća i povrća (Capriles i Arêas, 2014; Matos i Rosell, 2015). Proso i sirak sadrže visok udjel vitamina B skupine, mineralnih tvari (posebice kalcija u prosu, željeza u sirku) i fenolnih spojeva (Taylor i Awika, 2017). Brašna pseudožitarica (amaranta, kvinoje i heljde) karakterizira visok udjel proteina, masti i esencijalnih masnih kiselina, vitamina, mineralnih tvari i polifenolnih spojeva (Inglett i sur., 2015; Taylor i Awika, 2017). Ovisno o primijenjenom brašnu žitarica i pseudožitarica te njihovom dodanom udjelu, osim povećanja prehrambene vrijednosti, može doći i do pozitivnog, negativnog ili pak izostanka utjecaja na teksturu i senzorska svojstva bezglutenskog kruha (Alencar i sur., 2017, 2015; Alvarez-Jubete i sur., 2009; Burešová i sur., 2017; Hager i sur., 2012). Primjena brašna mahunarki u proizvodnji kruha opisana je u poglavlju 2.3. Budući da dodatak navedenih brašna alternativnih sirovina može narušiti senzorska svojstva kruha (Capriles i Arêas, 2014; Stantiall i Serventi, 2018), potrebno je optimizirati njihov dodatak. Zbog toga se ona često primjenjuju u kombinaciji s rafiniranim brašnima i škrobom koji se uobičajeno koriste za proizvodnju bezglutenskog kruha (Capriles i Arêas, 2014).

Hidrokoloidi su hidrofilni, dugolančani polisaharidi velike molekulske mase čija funkcionalna svojstva ovise o njihovoj kemijskoj strukturi (Anton i Artfield, 2008). Uključuju prirodne polisaharide porijeklom iz biljnih ekstrakata ( $\beta$ -glukan, pektin), biljnih izlučevina (guma arabika), morskih algi (karagenan), sluzi sjemenki (guar guma), škrob i modificirani škrob. Također, mogu biti sintetizirani kemijskim, biokemijskim (hidroksipropil-metilceluloza, HPMC; karboksimetil-celuloza, CMC) i mikrobiološkim (ksantan) putem (Houben i sur., 2012). U interakciji s vodom stvaraju mrežu gela koja povećava viskoznost, sposobnost zadržavanja plina te tako utječu na poboljšanje strukture, volumena, teksture i izgleda kruha (Anton i Artfield, 2008; Zannini i sur., 2012). Pri tome različiti hidrokoloidi u različitim

koncentracijama različito utječu na pojedina svojstva kruha (Lazaridou i sur., 2007), a njihov utjecaj ovisi i o drugim primijenjenim sirovinama (Hager i Arendt, 2013). U proizvodnji bezglutenskog kruha je najuspješnija primjena HPMC-a i ksantan gume (Anton i Artfield, 2008). Dodatak hidrokoloida može doprinijeti povećanju specifičnog volumena, smanjenju tvrdoće sredine, izraženijem posmeđivanju, poboljšanju senzorskih svojstava i usporavanju starenja bezglutenskog kruha (Bender i sur., 2018b; Capriles i Arêas, 2013; Hager i Arendt, 2013; Lazaridou i sur., 2007; Ziobro i sur., 2013a). Osim toga, hidrokoloide djeluju i na povećanje prehrambene vrijednosti, budući da se radi o topljivim vlaknima (Matos i Rosell, 2015). Topljiva vlakna mogu utjecati na smanjenje glikemijskog indeksa (Capriles i Arêas, 2014), što je od posebne važnosti kod bezglutenskog kruha budući da 5 % oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 ima celijakiju dijagnosticiranu biopsijom (Elfström i sur., 2014).

Proteini se pri proizvodnji bezglutenskog kruha dodaju radi poboljšanja fizikalnih i senzorskih svojstava te povećanja prehrambene vrijednosti. Dodaju se radi osnaživanja tijesta, odnosno mogućnosti tvorbe mreže koja oponaša svojstva glutena što doprinosi poboljšanju reoloških svojstava tijesta, strukturnih i senzorskih svojstava kruha te produljenju njegove trajnosti. Najčešće se dodaju proteini mlijeka, jaja, mahunarki i žitarica (Capriles i Arêas, 2014; Matos i Rosell, 2015). Eggleston i sur. (1992) utvrdili su kako dodatak istućenog bjelanjka doprinosi stabilizaciji tijesta, povećanju volumena zraka ugrađenog tijekom miješanja te specifičnog volumena kruha na bazi brašna manioke i soje. Ziobro i sur. (2013b) su ispitivali utjecaj dodatka izolata ili koncentrata proteina kolagena, albumina, proteina graška, soje i lupine na svojstva bezglutenskog tijesta i kruha na bazi škroba. Utvrdili su kako dodatak navedenih proteina značajno utječe na visko-elastična svojstva tijesta, povećanje poroznosti, većinom tamniju boju sredine kruha, smanjenje tvrdoće, žvkljivosti te kako usporava starenje kruha. Utjecaj na specifični volumen i senzorsku prihvatljivost razlikovao se ovisno o dodanim proteinima, pri čemu se senzorski najprihvatljivijim pokazao dodatak proteina graška. Prema rezultatima Nunes i sur. (2009), dodatak izolata proteina sirutke je pozitivno utjecao na svojstva bezglutenskog kruha na bazi bijelog rižinog brašna i krumpirovog škroba djelovanjem na povećanje volumena i smanjenje tvrdoće tijekom skladištenja. Nasuprot tome, u kruhu s dodatkom izolata proteina mlijeka utvrđen je suprotan utjecaj na volumen i teksturu, što ukazuje na potrebu pomnog odabira i optimizacije dodatka proteina kako bi se postigao željeni pozitivan učinak na kvalitetu bezglutenskog kruha.

Masti i emulgatori dodaju se radi stabilizacije mjehurića plina tijekom fermentacije i posljedičnog poboljšanja teksture sredine kruha (Houben i sur., 2012; Matos i Rosell, 2015).

U bezglutenskom kruhu s dodatkom emulgatora utvrđeno je povećanje specifičnog volumena i smanjenje tvrdoće (Demirkesen i sur., 2010; Onyango i sur., 2009). Osim toga, masti i emulgatori interakcijom s molekulama škroba mogu usporiti retrogradaciju škroba i migraciju vode te tako usporiti starenje kruha (Houben i sur., 2012; Onyango i sur., 2009; Smith i Johansson, 2005).

Enzimi također mogu doprinijeti povećanju kvalitete bezglutenskog kruha. Enzimi transglutaminaza i glukoza oksidaza doprinose nastanku mreže proteina u bezglutenskom tijestu (Zannini i sur., 2012) budući da kataliziraju reakcije direktnog (transglutaminaza) i indirektnog (glukoza oksidaza) povezivanja proteina (Renzetti i Rosell, 2016). Konačni utjecaj dodatka navedenih enzima na kvalitetu kruha ovisi o primijenjenom izvoru proteina i koncentraciji enzima (Renzetti i sur., 2008; Renzetti i Arendt, 2009a; Smerdel i sur., 2012). Renzetti i sur. (2008) utvrdili su povećanje specifičnog volumena, smanjenje tvrdoće i žvkljivosti kruha s dodatkom transglutaminaze u kruh na bazi kukuruznog brašna. Renzetti i Arendt (2009a) utvrdili su povećanje specifičnog volumena s dodatkom glukoza oksidaze u kruh na bazi brašna sirka i kukuruza, a smanjenje tvrdoće samo u slučaju kruha na bazi brašna kukuruza. Proteaze su enzimi koji hidroliziraju peptidne veze, a uključuju proteinaze i peptidaze. One utječu na povećanje stabilnosti, deformabilnosti i elastičnosti bezglutenskog tijesta te svojstva pasti tretiranih bezglutenskih brašna (Renzetti i Rosell, 2016). Mogući uzrok njihovog takvog djelovanja je promjena interakcija između proteina te proteina i škroba (Renzetti i Arendt, 2009b), no točan mehanizam djelovanja još uvijek nije u potpunosti poznat (Renzetti i Rosell, 2016). Kao posljedica navedenih utjecaja, dodatak proteaza u proizvodnji bezglutenskog kruha na bazi riže utječe na povećanje specifičnog volumena, smanjenje tvrdoće i žvkljivosti te usporeno starenje (Hamada i sur., 2013; Hatta i sur., 2015; Kawamura-Konishi i sur., 2013; Renzetti i Arendt, 2009b). Osim toga, budući da uslijed njihove aktivnosti dolazi do povećanja koncentracije slobodnih aminokiselina koje su poznati prekursori hlapljivih spojeva arome, proteaze mogu utjecati i na aromu kruha (Martínez-Anaya, 1996).

#### 2.2.2.2. Primjena tehnologija u svrhu poboljšanja svojstava bezglutenskog kruha

U svrhu poboljšanja kvalitete bezglutenskog kruha primjenjuju se i različite tehnologije, kao što su tehnologija kiseljenja tijesta, tretman visokim hidrostatskim tlakom te ohmsko zagrijavanje. Utjecaj primjene tehnologije kiseljenja tijesta detaljno je obrađen u poglavlju 2.4. Pri tretmanu visokim hidrostatskim tlakom dolazi do promjene funkcionalnih svojstava



škroba i proteina (Bender i Schönlechner, 2020) – želatinizacije škroba, polimerizacije proteina i time povećanja visko-elastičnih svojstava što ukazuje na potencijal za poboljšanje svojstava bezglutenskog kruha (Vallons i sur., 2011). Cappa i sur. (2016a) su utvrdili usporeno starenje kruha pripremljenog s kukuruznim škrobom i rižinim brašnom tretiranim visokim tlakom. Ohmsko zagrijavanje podrazumijeva prolazak izmjenične struje kroz materijal i stvaranje topline raspršivanjem električne energije kao rezultat električnog otpora materijala. Njegova prednost u odnosu na konvencionalnu metodu toplinske obrade pečenjem je brza i ujednačena raspodjela topline (Bender i Schönlechner, 2020). Prema rezultatima Bender i sur. (2019), primjenom ohmskog zagrijavanja dolazi do povećanja specifičnog volumena, elastičnosti i poroznosti kruha u odnosu na konvencionalno pečeni bezglutenski kruh, dok utjecaj na senzorska svojstva nije ispitan.

U svrhu produljenja trajnosti uobičajenog pšeničnog, pa tako i bezglutenskog kruha primjenjuje se pakiranje u modificiranoj atmosferi (Gallagher i sur., 2003), tehnologija aktivnih pakiranja (Gutiérrez i sur., 2011; Hempel i sur., 2013), polupečenja i zamrzavanja (Debonne i sur., 2018; Novotni i sur., 2012; Ronda i Roos, 2011).

#### 2.2.2.3. Izazovi i budućnost proizvodnje bezglutenskog kruha

Dosadašnja istraživanja su pokazala kako utjecaj pojedinih sirovina i aditiva na funkcionalna svojstva bezglutenskog tijesta i kruha značajno ovisi o brojnim faktorima – ostalim primijenjenim sirovinama, svojstvima i količini njihovog dodatka, udjelu vode u recepturi i uvjetima proizvodnog procesa (Capriles i Arêas, 2014). Stoga je izrazito teško predvidjeti kako će se njihov utjecaj odraziti na kvalitetu konačnog proizvoda, a što ukazuje na potrebu za optimizacijom receptura i uvjeta procesa proizvodnje. Unatoč značajnom napretku u razumijevanju pojedinih utjecaja i poboljšanju svojstava bezglutenskog kruha, njegova proizvodnja i dalje predstavlja veliki izazov (Capriles i sur., 2016; Matos i Rosell, 2015). Veća preferencija kruha na bazi rafiniranih brašna (Capriles i Arêas, 2014) i nezadovoljstvo potrošača senzorskim svojstvima dostupnih proizvoda (Do Nascimento i sur., 2014) ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima u svrhu istovremenog povećanja prehrambene vrijednosti i poboljšanja senzorskih svojstava kruha.

### 2.3. Mahunarke

Mahunarke pripadaju porodici *Fabaceae* koja se još naziva *Leguminosae*. Prema svjetskoj proizvodnji nalaze se odmah iza žitarica, pri čemu konzumacija graška, slanutka, leće i graha

predstavlja više od 70 % ukupne konzumacije mahunarki (FAO, 2016). Uzgajaju se u cijelom svijetu, prvenstveno radi jestivog zrna te ih karakterizira mala potreba za vodom i gnojivima, otpornost na bolesti i prilagodba na nepovoljne uvjete (Boukid i sur., 2019). Pojam zrnate mahunarke (engl. *pulses, grain legumes*) odnosi se na suho zrno mahunarki i uključuje grah, grašak, slanutak i leću (FAO, 2016) koji imaju mali udjel masti (Millar i sur., 2019).

Zrnate mahunarke imaju veliku prehrambenu vrijednost budući da predstavljaju izvor proteina, ugljikohidrata, vlakana, mineralnih tvari, vitamina i bioaktivnih tvari. Prema FAO (2017), zrnate mahunarke sadrže od 330 kcal do 390 kcal, od 20 g do 45 g proteina, od 5 g do 62 g ugljikohidrata, od 11 g do 47 g vlakana, od 1 g do 10 g masti te od 2 g do 6 g pepela na 100 g suhe tvari. Osim toga, mahunarke imaju niski glikemijski indeks (Trinidad i sur., 2010), bogate su esencijalnim aminokiselinama (FAO, 2017), a konzumacijom mahunarki u kombinaciji sa žitaricama osigurava se uravnoteženi unos aminokiselina (Boye i sur., 2010). Također, dokazano je da njihova konzumacija pozitivno utječe na zdravlje djelujući na povećanje sitosti, prevenciju kroničnih bolesti poput šećerne bolesti, metaboličkog sindroma, srčano-žilnih bolesti i raka (Boukid i sur., 2019; Dahl, 2019). Unatoč velikom potencijalu pozitivnog djelovanja na zdravlje i prevenciju bolesti, u zapadnim zemljama je njihova konzumacija vrlo mala (Dahl, 2019). Primjenom mahunarki u proizvodnji pekarskih proizvoda povećava se njihova zastupljenost u prehrani, ali i prehrambena vrijednost proizvoda. Osim nutritivnih, zrnate mahunarke sadrže i bioaktivne tvari koje mogu imati antinutritivno djelovanje, a uključuju inhibitore enzima, lektine, fitinsku kiselinu, tanine i druge fenolne spojeve, saponine, rafinozu i srodne oligosaharide. Inhibitori enzima, poput inhibitora tripsina i proteaza utječu na inaktivaciju probavnih enzima i smanjenje probavljivosti proteina. Lektini smanjuju topljivost i bioiskoristivost nutrijenata. Fitinska kiselina smanjuje bioiskoristivost mineralnih tvari. Tanini inaktiviraju probavne enzime i smanjuju probavljivost proteina. Rafinoza doprinosi stvaranju plinova. Saponini doprinose gorkom okusu (Boukid i sur., 2019; Campos-Vega i sur., 2010). Različitim tehnikama obrade, a koje uključuju ljuštenje, toplinsku obradu, namakanje, klijanje i fermentaciju, moguće je smanjiti neželjeni utjecaj pojedinih antinutrijenata mahunarki budući da dolazi do smanjenja njihove koncentracije ili inaktivacije (Aremu i sur., 2016; Batra i sur., 2019; Boukid i sur., 2019; Campos-Vega i sur., 2010; Champ, 2002). Osim antinutritivnog djelovanja, navedene bioaktivne tvari mogu imati i pozitivan utjecaj na zdravlje, kao što su antioksidativna aktivnost fitinske kiseline i fenolnih spojeva, prebiotička svojstva oligosaharida, vezanje

teških metala od strane saponina, osjećaj sitosti povezan s lektinima i drugi (Boukid i sur., 2019; Campos-Vega i sur., 2010).

Osim radi povećanja prehrabene vrijednosti, brašna mahunarki primjenjuju se u proizvodnji kruha i radi poželjnih tehnoloških svojstava – izražene sposobnosti vezanja vode, topljivosti, emulgirajućih i gelirajućih svojstava te svojstva pjenjenja (Boye i sur., 2010; Toews i Wang, 2013). U proizvodnji kruha su dosad primjenjivana i brašna mahunarki, ali i pojedine komponente mahunarki (izolati i koncentracije proteina, škrob) (Boukid i sur., 2019; Foschia i sur., 2017). S njihovim dodatkom dolazi do promjene svojstava tijesta i kruha koja ne doprinosi uvijek povećanju senzorske prihvatljivosti. Prema dosadašnjim istraživanjima utvrđen je različit utjecaj dodatka brašna ili komponenti mahunarki na fizikalna i senzorska svojstva kruha, a pri čemu on ovisi o vrsti mahunarke, dodanom udjelu i ostalim sastojcima te uvjetima proizvodnje kruha. Prema rezultatima ispitivanja dodatka mahunarki u pšenični kruh i/ili rolice, s povećanjem udjela dodanog brašna slanutka (od 0 % do 30 %) (Man i sur., 2015; Mohammed i sur., 2014), leće i graha (Kohajdová i sur., 2013) dolazi do smanjenja specifičnog volumena i senzorske prihvatljivosti te tamnjenja kore proizvoda. Olawole (2013) su također utvrdili smanjenje senzorske prihvatljivosti pšeničnog kruha s dodatkom više od 10 % brašna mletačkog graha, a Previtali i sur. (2014) s dodatkom više od 20 % brašna leće. Pri tome se negativni utjecaj na volumen i teksturu pripisuje razrijeđenju glutena (Mohammed i sur., 2014). Cunha i sur. (2019) su utvrdili kako zamjena 10 % kukuruznog brašna brašnom slanutka, graška, leće i boba ne dovodi do značajne razlike u senzorskoj prihvatljivosti kukuruznog kruha. U usporedbi s rezultatima postignutim u pšeničnom kruhu, dodatkom brašna ili proteina mahunarki u bezglutenski kruh postignuti su pozitivniji učinci. Ziobro i sur. (2016) su utvrdili povećanje senzorske prihvatljivosti s dodatkom proteina lupine, graška i soje u bezglutenski kruh. Miñarro i sur. (2012) su ispitivali utjecaj brašna slanutka, soje, klica rogača i proteina graška na svojstva bezglutenskog kruha, pri čemu se dodatak brašna slanutka i soje pokazao senzorski najprihvatljivijim. Primjena brašna mahunarki u kombinaciji s procesom kiseljenja tijesta također daje obećavajuće rezultate s obzirom na postignuta svojstva kruha. Olojede i sur. (2020) su utvrdili smanjenje tvrdoće i žvackivosti, povećanje specifičnog volumena i senzorske prihvatljivosti s dodatkom brašna slanutka i mletačkog graha (lat. *Vigna unguiculata*) u kruh na bazi sirka pripremljen s dodatkom kiselog tijesta.

Budući da predstavljaju odličan izvor nutrijenata i imaju poželjna tehnološka svojstva, mahunarke imaju veliki potencijal za primjenu u proizvodnji inovativnih proizvoda u

kombinaciji sa žitaricama, uključujući i bezglutenske proizvode. Pri razvoju takvih proizvoda potrebno je provesti optimizaciju proizvodnje u svrhu postizanja prihvatljivih tehnoloških svojstava tijesta, fizikalnih i senzorskih svojstava kruha.

### 2.3.1. Grašak

Grašak (lat. *Pisum sativum L.*) je jedna od prvih kultiviranih biljaka te se uzgaja diljem svijeta u zemljama s umjerenom klimom. Zrelo zrno graška je okruglog oblika te žute, zelene ili crvene boje kotiledona (Warkentin i sur., 2015).

#### 2.3.1.1. Prehrambena vrijednost i funkcionalna svojstva graška

Sirovi žuti grašak na 100 g suhe tvari sadrži 363 kcal, 27,4 g proteina, 47,4 g dostupnih ugljikohidrata, 19,7 g vlakana, 2,6 g masti (od čega 0,33 g zasićenih, 0,50 g jednostruko nezasićenih i 1,16 g višestruko nezasićenih masnih kiselina) i 3,0 g pepela (FAO, 2017). Bogat je lizinom koji je limitirajuća aminokiselina u žitaricama (Millar i sur., 2019) te folnom kiselinom i tiaminom (Erbersdobler i sur., 2017) koji nedostaju u bezglutenskom kruhu (Melini i sur., 2017). Proteini graška imaju dobru sposobnost stvaranja emulzija i pjene (Aluko i sur., 2009), a slabu sposobnost stvaranja gelova (Adebisi i Aluko, 2011). Frakcija proteina topljivih u vodi najznačajnije doprinosi njihovoj topljivosti i sposobnosti stvaranja pjene, a frakcija proteina topljivih u etanolu sposobnosti stvaranja emulzija (Adebisi i Aluko, 2011). Grašak sadrži visoki udjel škroba (od 43 % do 45 % suhe tvari sirovog zrna) (Brummer i sur., 2015). Škrob graška, kao i škrobove ostalih mahunarki, karakterizira visoki udjel amiloze i izražena sklonost retrogradaciji, što ograničava njihovu primjenu u prehrambenoj industriji (Ratnayake i sur., 2002). Vlakna mahunarki, pa tako i graška, sastoje se od neprobavljivih oligosaharida, topljivih vlakana, netopljivih vlakana i rezistentnog škroba. U kotiledonu se nalazi najviše topljivih, a u ljusci najviše netopljivih vlakana. Među topljivim vlaknima najzastupljeniji su pektini, hemiceluloze (većinom ksiloglukani i ksilani) i galakturonani (većinom ksilogalakturonani i ramnogalakturonani te neki homogalakturonani), a među netopljivim celuloza, ksilani i arabinani (Brummer i sur., 2015). Netopljiva vlakna mahunarki imaju puno veću sposobnost bubrenja, kapacitet vezanja vode i ulja u odnosu na topljiva vlakna (Dalgetty i Baik, 2003). Sirovo suho zrno graška sadrži 8,3 % oligosaharida, od kojih je najzastupljenija saharoza, a zatim neprobavljive stahioza, verbakoza i rafinoza. Neprobavljivi oligosaharidi mogu djelovati pozitivno u smislu prebiotičkog učinka, ali i negativno u smislu stvaranja plinova i nadutosti (Fan i sur., 2015). Masti graška sastoje se

većinom od nezasićenih masnih kiselina, od kojih su najzastupljenije linolna, oleinska i linolenska masna kiselina. Od zasićenih masnih kiselina najzastupljenije su palmitinska, stearinska i miristinska kiselina (Padhi i sur., 2017). U usporedbi s ostalim zrnatim mahunarkama, grašak sadrži najmanji udjel slobodnih ukupnih fenolnih spojeva i najmanji antioksidativni kapacitet (Padhi i sur., 2017).

#### 2.3.1.2. Aroma graška

Upotreba graška u prehrambenoj industriji je ograničena radi nepoželjne arome. Nepoželjna aroma zrnatih mahunarki može biti porijeklom iz same biljke ili nastati tijekom branja, obrade i skladištenja. Oksidacija lipida predstavlja glavni način nastanka spojeva odgovornih za nepoželjnu aromu mahunarki (Roland i sur., 2017). Činjenica da je u grašku utvrđena prisutnost lipoksigenaze (Domoney i sur., 1990) te da sadrži većinom nezasićene masne kiseline (Padhi i sur., 2017) ukazuje na veliku mogućnost nastanka nepoželjnih produkata oksidacije lipida. No spojevi odgovorni za nepoželjnu aromu mogu nastati i Maillardovom reakcijom te toplinskom degradacijom aminokiselina, fenolnih i drugih spojeva (Roland i sur., 2017).

Među hlapljivim spojevima arome graška najzastupljeniji su spojevi iz skupina aldehida, ketona, alkohola i kiselina (Heng, 2005; Murat i sur., 2013). Nepoželjna aroma graška je kompleksna, a na nju utječe niz spojeva, većinom nezasićeni karbonilni spojevi, zasićeni i nezasićeni alkoholi (Murray i sur., 1976). Prema Murray i sur. (1976), pojedini 3-alkil-2-metoksipirazini te kombinacije pojedinih aldehida, ketona i alkohola značajno doprinose karakterističnoj nepoželjnoj aromi graška. U dosadašnjim istraživanjima je nekoliko spojeva korišteno kao marker nepoželjne arome graha i graška. Oni se razlikuju između provedenih istraživanja, a uključuju heksanal, oktanal, (*E,E*)-2,4-nonadienal, (*E,E*)-2,4-dekadienal, 1-penten-3-on, 3-metil-1-butanol, 1-pentanol, 1-heksanol, 1-heptanol, 1-okten-3-ol, 2-sek-butil-3-metoksipirazin, 2-izopropil-3-metoksipirazin, 2-izobutil-3-metoksipirazin, 2-pentilfuran i dipropil-disulfid (Jakobsen i sur., 1998; Wang i sur., 1997; Xu i sur., 2019).

Nepoželjni atributi arome graška uključuju zelenu, graškastu, grahastu, zemljanu, lisnatu, oštru, jetku, metalnu, masnu aromu te aromu sijena i bujona, a povezani su s prisutnošću aldehida, ketona, alkohola, pirazina i drugih hlapljivih spojeva. Nepoželjni atributi povezani s nehlapljivim spojevima graška uključuju gorki i metalni okus te oporost, a povezani su s prisutnošću izoflavona, saponina, fenolnih kiselina, peptida i aminokiselina (Roland i sur.,

2017). Heng i sur. (2006) su utvrdili pozitivnu korelaciju koncentracije saponina i gorkog okusa graška.

Profil hlapljivih spojeva arome graška razlikuje se ovisno o kultivaru i godini uzgoja (Azarnia i sur., 2011; Malcolmson i sur., 2014). Osim odabirom najpogodnijeg kultivara i skladištenjem u odgovarajućim uvjetima, primjenom pojedinih metoda obrade je također moguće smanjiti nepoželjnu aromu mahunarki. One uključuju namakanje, toplinski tretman, klijanje, fermentaciju, ekstrakciju otapalima, enzimski tretman i ultrafiltraciju, kojima dolazi do smanjenja koncentracije nepoželjnih spojeva i/ili nastanka spojeva koji mogu maskirati nepoželjnu aromu mahunarki (Roland i sur., 2017). Pri ljuštenju graška dolazi do značajnog smanjenja koncentracije hlapljivih spojeva arome (Azarnia i sur., 2011). Toplinski tretman brašna žutog graška u kombinaciji s neparavanjem utjecao je na povećanje prihvatljivosti arome pšeničnog kruha s njegovim dodatkom (Fahmi i sur., 2019). Ekstrakcija otapalima pri visokom tlaku, uz etanol i vodu kao otapala također se pokazala učinkovitom (Hillen, 2016). Prema rezultatima Hillen (2016), tretiranjem brašna žutog graška na taj način postignuto je značajno poboljšanje prihvatljivosti arome i sveukupne prihvatljivosti keksa i biskvita s njegovim dodatkom. Prema rezultatima najnovijih istraživanja o utjecaju klijanja, tijekom klijanja zrna žutog graška dolazi do povećanja koncentracije spojeva odgovornih za grahastu (engl. *beany*) aromu (Xu i sur., 2019).

#### 2.3.1.3. Primjena graška u proizvodima na bazi žitarica

Dosad je brašno graška primijenjeno u proizvodnji pšeničnog kruha (Bourré i sur., 2019; Dabija i sur., 2017; Ficco i sur., 2018; Kamaljiti i sur., 2010; Mastromatteo i sur., 2015; Mondor i sur., 2014; Sadowska i sur., 2003), kukuruznog kruha (Cunha i sur., 2019), bezglutenskog kruha (Jeradechachai, 2012), biskvita (Gularte i sur., 2012; Hillen, 2016), tjestenina (Bouasla i sur., 2016; Chaudhary i sur., 2018), keksa (Hillen, 2016; Kamaljiti i sur., 2010; Simons i Hall, 2018), žitarica za doručak (Chaudhary i sur., 2018), krepera (Millar i sur., 2017) i ekstrudiranih *snack*-proizvoda (Chan i sur., 2019). Proteini graška su također primijenjeni u proizvodnji bezglutenskog kruha (Miñarro i sur., 2012; Pico i sur., 2019b; Ziobro i sur., 2013b) i *muffina* (Shevkani i Singh, 2014; Matos i sur., 2014).

U dosadašnjim istraživanjima je pri proizvodnji kruha najčešće primjenjivan dodatak od 5 % do 30 % brašna graška. Prema njihovim rezultatima, dodatak brašna graška utjecao je na povećanje prehrambene vrijednosti kruha djelujući na povećanje udjela proteina, vlakana i pepela (Ficco i sur., 2018; Mastromatteo i sur., 2015) te smanjenje glikemijskog indeksa

(Ficco i sur., 2018; Marinangeli i sur., 2009; Mastromatteo i sur., 2015). Kruhu s njegovim dodatkom utvrđen je i smanjeni volumen, poroznost, elastičnost, kohezivnost te povećana tvrdoća u odnosu na kruh bez njegovog dodatka (Dabija i sur., 2017; Kamaljit i sur., 2010; Sadowska i sur., 2003). Nasuprot tome, prema istraživanju Mondor i sur. (2014), zamjena 10 % pšeničnog brašna, brašnom žutog graška nije utjecala na specifični volumen. Prema rezultatima Mastromatteo i sur. (2015), zamjenom 5 % pšeničnog brašna od cijelog zrna brašnom žutog graška dolazi do smanjenja tvrdoće sredine kruha. U većini slučajeva njegove primjene u proizvodnji kruha došlo je i do smanjenja senzorske prihvatljivosti kruha, a posebice arome kruha (Dabija i sur., 2017; Jeradechachai, 2012; Kamaljit i sur., 2010; Mastromatteo i sur., 2015), dok u nekim slučajevima nije utvrđen negativan utjecaj na senzorska svojstva (Cunha i sur., 2019). S obzirom na senzorska svojstva, prihvatljivi udjel dodanog brašna žutog graška razlikuje se između različitih istraživanja, a iznosi 5 % (Kamaljit i sur., 2010), 10 % (Dabija i sur., 2017) ili 20 % (Ficco i sur., 2018).

Prema svemu navedenom, brašno graška ima veliki potencijal za primjenu u proizvodnji kruha radi povećanja njegove prehrambene vrijednosti i produljenja trajnosti, a budući da može negativno utjecati na fizikalna i senzorska svojstva kruha, potrebno je optimizirati recepturu i uvjete proizvodnje kruha s njegovim dodatkom. Primjena tehnologije kiselog tijesta u kombinaciji s dodatkom brašna graška može doprinijeti smanjenju njegovog potencijalno negativnog utjecaja na senzorska i fizikalna svojstva, budući da utječe na smanjenje nepoželjne arome graška (Bourré i sur., 2019), ali i na poboljšanje fizikalnih i drugih senzorskih svojstava kruha (Coda i sur., 2010).

#### **2.4. Kiselo tijesto**

Kiselo tijesto je smjesa brašna i vode fermentirana pomoću bakterija mliječne kiseline (BMK) i kvasaca (Hammes i Gänzle, 1998) te se tradicionalno koristi za proizvodnju pšeničnog i raženog kruha (Moroni i sur., 2009). Proces kiseljenja tijesta spada u najstarije primijenjene biotehnološke procese, a primjenjuje se i danas radi pozitivnog utjecaja na prehrambenu vrijednost, teksturalna i senzorska svojstva te trajnost pekarskih proizvoda (Gobbetti i sur., 2014). Dosadašnje studije su dokazale prisutnost više od 60 vrsta BMK (Gobbetti i sur., 2016) i 20 vrsta kvasaca u zrelom kiselom tijestu (De Vuyst i Neysens, 2005). Bakterije mliječne kiseline prisutne u kiselom tijestu obuhvaćaju nekoliko bakterijskih rodova – *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Enterococcus* i *Streptococcus*, pri čemu su bakterije iz roda *Lactobacillus* najzastupljenije (De Vuyst i sur., 2009). Od kvasaca su

najzastupljeniji *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua* i *Candida humilis* (De Vuyst i sur., 2009). Broj poraslih kolonija (engl. *Colony Forming Units*, CFU) bakterija mliječne kiseline u kiselom tijestu uobičajeno iznosi od  $10^7$  do  $10^9$  CFU  $g^{-1}$ , a kvasaca od  $10^5$  do  $10^7$  CFU  $g^{-1}$ , prema čemu njihov omjer iznosi 100 : 1 (Corsetti, 2013).

Prema inokulumu se razlikuju tri tipa kiselog tijesta: spontano fermentirana, osvježavana (engl. *backslopped*) kisela tijesta s endogenom mikroflorom, kisela tijesta inokulirana sa starter kulturom i kisela tijesta inokulirana sa starter kulturom i osvježavana (De Vuyst i sur., 2017). Osvježavanje podrazumijeva spontanu fermentaciju tijesta određeno vrijeme koje se zatim dodaje kao inokulum za fermentaciju novog tijesta (Corsetti, 2013). Svojstva kiselog tijesta ovise o nekoliko unutarnjih i vanjskih faktora, a koji uključuju svojstva brašna (udjel ugljikohidrata, masti i slobodnih masnih kiselina, mineralnih tvari, aktivnost enzima) i uvjete fermentacije (temperaturu, pH i promjenu pH, omjer vode i brašna, aktivitet vode, prisutnost kisika, trajanje, proces osvježavanja) (De Vuyst i sur., 2017; Hammes i Gänzle, 1998).

#### 2.4.1. Metabolizam bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline prisutne u kiselom tijestu uključene su u brojne metaboličke aktivnosti kao što su metabolizam i konverzija ugljikohidrata, proteina, lipida i fenolnih spojeva koje uključuju mliječno kiselu fermentaciju, nastanak hlapljivih spojeva arome, antimikrobnih spojeva i egzopolisaharida (Corsetti i Settanni, 2007; Gänzle, 2014). One najčešće fermentiraju sve topljive ugljikohidrate u brašnu (maltozu, saharozu, fruktozu, glukozu), kao i monosaharide porijeklom iz arabinosilana i arabinogalaktana (De Vuyst i sur., 2009), a enzimi prisutni u žitaricama su većinom odgovorni za razgradnju složenih ugljikohidrata i njihovo otpuštanje (Gänzle, 2014). Obligativni homofermentativni, fakultativni i obligativni heterofermentativni laktobacili su uobičajene bakterije mliječne kiseline u kiselom tijestu (Gobbetti, 1998). Metabolizmi homofermentativnih i heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline se više razlikuju po putu metabolizma heksoza nego pentoza (Gänzle, 2015). Obligativni homofermentativni i fakultativni heterofermentativni mikroorganizmi fermentiraju heksoze Embden-Meyerhof-Parnas putem pri čemu kao glavni produkt nastaje mliječna kiselina (Gobbetti i Gänzle, 2013). Do iskorištavanja maltoze i fruktoze uobičajeno dolazi tek u odsutnosti glukoze, a prisutnost glukoze također djeluje represivno i na metabolizam pentoza (Gänzle i sur., 2007). Obligativni homofermentativni mikroorganizmi fermentiraju pentoze fosfoketolaznim putem ili putem pentoza fosfata (Gänzle, 2015), a fakultativni heterofermentativni mikroorganizmi



fosfoketolaznim putem (Gobbetti i Gänzle, 2013). Obligativni heterofermentativni mikroorganizmi fermentiraju heksoze i pentoze fosfoketolaznim putem pri čemu kao glavni produkti nastaju mliječna kiselina, etanol, octena kiselina i CO<sub>2</sub> (Gobbetti i Gänzle, 2013). U slučaju heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline, maltoza je najčešće preferirani izvor energije, fruktoza preferirani elektron akceptor te predstavlja dodatni izvor energije, a većina obligativnih heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline metabolizira i pentoze (De Vuyst i sur., 2009; Gänzle i sur., 2007).

Proteoliza pri fermentaciji ponajviše ovisi o aktivnosti enzima prisutnih u žitaricama, dok bakterije mliječne kiseline proizvodnjom kiselina i posljedičnim zakiseljavanjem doprinose povećanju njihove aktivnosti (Gänzle, 2014; Gänzle i sur., 2007). Bakterijske peptidaze također doprinose povećanju koncentracije slobodnih aminokiselina, a može doći i do nastanka bioaktivnih peptida (Gänzle, 2014; Gobbetti i sur., 1996). Bakterije mliječne kiseline koriste aminokiseline za sintezu proteina, kao izvor energije, za regulaciju unutarstaničnog pH, stvaranje kofaktora i biokonverzije. Konverzija aminokiselina doprinosi nastanku hlapljivih spojeva arome i njihovih prekursora, ali i drugih spojeva kao što je fenilmliječna kiselina koja ima antifungalna svojstva (De Vuyst i sur., 2009).

Značaj metabolizma fenolnih spojeva za bakterije mliječne kiseline nije točno poznat, no mogući uzroci su osiguranje energije i/ili uklanjanje nepoželjnih spojeva. U konverziji fenolnih spojeva sudjeluje nekoliko enzima koji uključuju feruloil esteraze, tanin acil hidrolaze, glikozil hidrolaze, a u metabolizmu fenolnih kiselina reduktaze i dekarboksilaze (Gänzle, 2014). Sposobnost njihove konverzije i metabolizma, kao i nastali produkti razlikuju se između pojedinih sojeva bakterija mliječne kiseline (Rodríguez i sur., 2009). Pri kiseljenju tijesta može doći do metabolizma fenolnih kiselina, oslobađanja vezanih fenolnih kiselina i drugih fenolnih spojeva poput flavonoida te smanjenja koncentracije tanina (Verni i sur., 2019).

Sinteza egzopolisaharida doprinosi metabolizmu saharoze i zaštiti bakterija mliječne kiseline od nepovoljnih okolišnih faktora. Pri tome supstrat i primijenjeni bakterijski soj utječu na prinos i vrstu sintetiziranog egzopolisaharida (Gänzle, 2014; Rühmkorf i sur., 2012).

Jedan od mnogih antimikrobnih spojeva koji mogu nastati metabolizmom bakterija mliječne kiseline je reuterin. Metabolizmom pojedinih bakterijskih vrsta (*L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. buchneri*) izoliranih iz kiselog tijesta ili korištenih kao starter kultura (Bauer i sur., 2010b; Corsetti i Settanni, 2007; Schütz i Radler, 1984) dolazi do

konverzije glicerola do 3-hidroksipropanala (3-HPA) (Vollenweider i Lacroix, 2004) koji u otopini tvori reuterin – dinamičku ravnotežu 3-hidroksipropanala, njegovog hidrata, dimera i akroleina (Engels i sur., 2016). Radi antimikrobne aktivnosti reuterina se bakterijske vrste koje ga sintetiziraju koriste u proizvodnji hrane (Langa i sur., 2013) te se tako akrolein može naći u prehrambenim proizvodima. Schmidt i sur. (2018) su ispitivali primjenu reuterina u kruhu radi njegovog antifungalnog djelovanja. Akrolein (2-propenal) je vrlo reaktivni toksični aldehid koji može uzrokovati želučano-crijevnu, kožnu i dišnu iritaciju te utjecati na rad živčanog sustava (Gomes i sur., 2002). Osim navedenom konverzijom fermentacijskih metabolita, akrolein može nastati i toplinskom obradom hrane (Abraham i sur., 2011; Engels i sur., 2016), pri izgaranju duhana, goriva, drveta i plastike (Faroon i sur., 2008). Stoga je vrlo teško pouzdano procijeniti sveukupnu izloženost akroleinu, a zabrinutost dodatno raste s činjenicom da može nastati pri fiziološkim uvjetima *in vivo* (Engels i sur., 2016; Moghe i sur., 2015). Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) je definirala privremenu prihvatljivu koncentraciju (engl. *provisional tolerable concentration*) akroleina u hrani koja iznosi  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a što odgovara unosu  $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase dnevno (Gomes i sur., 2002). Nedostatak metoda za određivanje akroleina utječe na nedostatak podataka o njegovoj koncentraciji u hrani i drugim izvorima (ATSDR, 2007; Gomes i sur., 2002).

#### 2.4.2. Utjecaj dodatka kiselog tijesta na svojstva kruha

Tijekom fermentacije uslijed metaboličke aktivnosti bakterija mliječne kiseline dolazi do proizvodnje mliječne i octene kiseline i smanjenja pH do oko 4 (De Vuyst i sur., 2009). Pri smanjenom pH dolazi do povećanja aktivnosti enzima prisutnih u sirovinama – amilaza, proteaza, fitaza, hemicelulaza. Promjene koje nastaju tijekom fermentacije rezultat su metaboličke aktivnosti prisutnih mikroorganizama i aktivnosti prisutnih enzima (Poutanen i sur., 2009) te one utječu na svojstva konačnog proizvoda (Gobbetti i sur., 2014).

S aspekta poboljšanja prehrambenih svojstava, pri kiseljenju tijesta može doći do smanjenja probavljivosti škroba i glikemijskog indeksa, povećanja topljivosti vlakana, proizvodnje egzopolisaharida s prebiotičkim djelovanjem, povećanja bioiskoristivosti mineralnih tvari, oslobađanja bioaktivnih peptida s antioksidativnom aktivnosti, promjene koncentracije i biodostupnosti fenolnih spojeva, vitamina i sterola (Coda i sur., 2012; Di Cagno i sur., 2008; Gobbetti i sur., 2014; Poutanen i sur., 2009). Di Cagno i sur. (2008) su utvrdili kako pri fermentaciji bakterijama mliječne kiseline dolazi i do degradacije glutena što je posebno

značajno u slučaju kontaminacije bezglutenskih proizvoda. Osim toga, s aspekta sigurnosti, kiseljenje također može utjecati i na smanjenje koncentracije mikotoksina i pesticida te alergenosti proteina (Licandro i sur., 2020).

S obzirom na fizikalna svojstva, dodatak kiselog tijesta može utjecati na povećanje volumena i poroznosti, smanjenje tvrdoće te tamniju boju bezglutenskog kruha (Cappa i sur., 2016b; Corsetti i sur., 2008; Di Cagno i sur., 2008; Torrieri i sur., 2014). Kako je već spomenuto, pri fermentaciji kiselog tijesta uslijed metaboličke aktivnosti prisutnih mikroorganizama dolazi do nastanka hlapljivih spojeva arome i njihovih prekursora (npr. povećanja koncentracije slobodnih aminokiselina) što se pozitivno odražava na senzorskim svojstvima kruha. Di Cagno i sur. (2008) utvrdili su poboljšanje senzorskih svojstava bezglutenskog kruha s dodatkom kiselog tijesta.

Dodatak kiselog tijesta može produljiti trajnost kruha djelujući na usporavanje starenja i mikrobnog kvarenja kruha. Do usporavanja starenja dolazi radi zakiseljavanja, proteolitičke i amilolitičke aktivnosti pri kiseljenju tijesta (Corsetti i sur., 2008). Također, i sintetizirani egzopolisaharidi koji dovode do smanjenja gubitka vode pri skladištenju mogu potencijalno djelovati na usporavanje starenja kruha (Torrieri i sur., 2014). Moore i sur. (2007) su utvrdili usporeno starenje s dodatkom kiselog tijesta u bezglutenski kruh. Do usporavanja mikrobnog kvarenja kruha dolazi radi nastanka brojnih antimikrobnih metabolita pri fermentaciji kiselog tijesta, kao što su octena kiselina, fenilmliječna kiselina, hidroksi-masne kiseline, peptidi i drugi (Axel i sur., 2017; Debonne i sur., 2018; Gerez i sur., 2009).

#### 2.4.3. Mahunarke i kiselo tijesto

Mahunarke su prikladan supstrat za kiseljenje tijesta, same ili u kombinaciji sa žitaricama (Curiel i sur., 2015). Navedeni pozitivni učinci procesa kiseljenja tijesta na bazi žitarica utvrđeni su i pri kiseljenju tijesta na bazi/s dodatkom brašna mahunarki (Coda i sur., 2017; Curiel i sur., 2015; Rizzello i sur., 2014a; Starzyńska-Janiszewska i Stodolak, 2011). Pri kiseljenju brašna mahunarki također dolazi i do povećanja koncentracije *in vitro* probavljivosti proteina te povećanja koncentracije  $\gamma$ -aminomaslačne kiseline koja utječe na smanjenje krvnog tlaka (Coda i sur., 2017; Curiel i sur., 2015; Inoue i sur., 2003; Rizzello i sur., 2014a). U usporedbi s drugim metodama obrade, kiseljenje tijesta daje najbolje rezultate s obzirom na smanjenje koncentracije antinutrijenata mahunarki (Gobbetti i sur., 2019). Pri fermentaciji mahunarki pomoću bakterija mliječne kiseline dolazi do smanjenja koncentracije ili potpunog uklanjanja fitata, saponina, cijanida, tanina, inhibitora amilaze i tripsina te

oligosaharida tipa rafinoze (Batra i sur., 2019; Curiel i sur., 2015; Starzyńska-Janiszewska i Stodolak, 2011).

Kiselo tijesto također može doprinijeti poboljšanju strukturnih, teksturalnih i senzorskih svojstava kruha narušenih s dodatkom brašna mahunarki. Prema rezultatima Rizzello i sur. (2014a), kiseljenje tijesta s dodatkom 15 % brašna mahunarki (kombinacija brašna slanutka, leće i graha) utjecalo je na povećanje specifičnog volumena kruha, smanjenje tvrdoće te povećanje kohezivnosti, elastičnosti i rezilijencije. Sličan pozitivan utjecaj, odnosno povećanje specifičnog volumena, elastičnosti i poroznosti, smanjenje tvrdoće te poboljšanje senzorskih svojstava utvrdili su i Coda i sur. (2010) za kiselo tijesto na bazi slanutka i pseudožitarica. Pri procesu kiseljenja tijesta značajno se mijenja i profil hlapljivih spojeva, a što se pozitivno odražava na aromi konačnog proizvoda. Kiseljenjem brašna graška ili ekstrakta njegovih proteina smanjuje se koncentracija heksanala i dolazi do smanjenja intenziteta ili maskiranja nepoželjne arome graška što pozitivno utječe na senzorsku prihvatljivost kruha (Bourré i sur., 2019; Schindler i sur., 2012). Prema svemu navedenom, primjena brašna mahunarki u kombinaciji s kiselim tijestom predstavlja obećavajući način poboljšanja kvalitete bezglutenskog kruha.

## **2.5. Profil hlapljivih spojeva arome kruha**

Prema definiciji ISO 5492:2009, aroma (engl. *flavour*) predstavlja kompleksnu kombinaciju olfaktornih, okusnih i trigeminalnih osjeta doživljenu tijekom kušanja. Aroma značajno utječe na kvalitetu pekarskih proizvoda i njihovu prihvatljivost od strane potrošača (Cho i Peterson, 2010).

U kruhu je identificirano više od 500 hlapljivih spojeva iz kemijskih skupina alkohola, kiselina, aldehida, ketona, estera, furana, pirazina, pirola, pirolina, ugljikovodika, laktona, sumpornih spojeva i drugih (Paraskevopoulou i sur., 2012), no ne doprinose svi prisutni spojevi jednako mirisu i aromi kruha. Doprinos pojedinog spoja ovisi o njegovoj koncentraciji u proizvodu i pragu osjetljivosti što se često izražava u obliku OAV vrijednosti (engl. *Odor Activity Value*) i FD faktora (engl. *Flavour Dilution*). OAV vrijednost predstavlja omjer koncentracije spoja u hrani i njegovog praga osjetljivosti u vodi. Spojevi s OAV vrijednosti većom od 1 mogu se osjetiti, a što je OAV vrijednost veća, to je doprinos pojedinog spoja veći. Budući da je kruh kompleksna matrica, a za izračun se koristi prag osjetljivosti spoja u vodi, izračunata OAV vrijednosti je aproksimativna (Birch i sur., 2014). FD faktor određuje se analizom razrjeđenja ekstrakata arome (engl. *Aroma Extraction Dilution Analysis*, AEDA)

te predstavlja najveće razrjeđenje ekstrakta pri kojem je moguće osjetiti spoj metodom GC-olfaktometrije (Schieberle i Grosch, 1987). Zapravo samo mali dio prisutnih hlapljivih spojeva značajno utječe na karakterističnu aromu kruha. Spojevi koji značajno doprinose aromi kruha razlikuju se ovisno o primijenjenom brašnu i drugim sirovinama te uvjetima proizvodnje (Boeswetter i sur., 2019; Cho i Peterson, 2010; Grosch i Schieberle, 1997). Prema Cho i Peterson (2010), aromi kore pšeničnog kruha najviše doprinose 2-acetil-1-pirolin (koji se ujedno smatra ključnim za aromu pšeničnog kruha), zatim (*E*)-2-nonenal, 3-metilbutanal, 2,3-butandion, metional i (*Z*)-2-nonenal, a sredine kruha (*E*)-2-nonenal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, (*E,E*)-2,4-dekadienal, 2,3-butandion, metional, 1-okten-3-ol i (*E,E*)-2,4-nonadienal.

Spojevi odgovorni za aromu kruha nastaju tijekom fermentacije uslijed metaboličke aktivnosti kvasaca i bakterija mliječne kiseline, aktivnosti enzima, oksidacije lipida, Maillardove reakcije, reakcija karamelizacije i toplinske degradacije šećera i aminokiselina. Nastanak hlapljivih spojeva arome i kvaliteta profila arome kruha ovise o primijenjenim sirovinama, dodatku kiselog tijesta, enzima i poboljšivača, uvjetima miješanja, fermentacije pečenja, skladištenja (Jensen i sur., 2011; Moroni i sur., 2009; Pozo-Bayón i sur., 2006). Na slici 1 prikazana su glavna porijekla i faktori koji utječu na profil hlapljivih spojeva kruha.



**Slika 1.** Glavno porijeklo i faktori koji utječu na hlapljive spojeve u kruhu. **Porijeklo hlapljivih spojeva;** faktori utjecaja; **prekursori hlapljivih spojeva;** glavne skupine povezanih hlapljivih spojeva; sekundarne skupine povezanih hlapljivih spojeva (Petel, 2016)

Aroma sredine i kore kruha se značajno razlikuje. Na aromu sredine kruha ponajviše utječu spojevi nastali pri fermentaciji i oksidaciji lipida, a na aromu kore kruha spojevi koji nastaju Maillardovom reakcijom pri pečenju (Birch i sur., 2014). Također, ponekad može doći do prijelaza spojeva između sredine i kore kruha. Tako se pojedini spojevi nastali Maillardovom reakcijom u kori mogu detektirati u sredini kruha, a spojeva nastalih fermentacijom i oksidacijom lipida u kori kruha (Pico i sur., 2015).

Hlapljivi spojevi prisutni u kruhu mogu i pozitivno i negativno utjecati na senzorsku prihvatljivost arome. Prema literaturnom pregledu provedenom od strane Pico i sur. (2015), s povećanjem koncentracije acetaldehida, fenilacetaldehida, 2-metilpropanala, 2-metilbutanala, 3-metilbutanala, oktanala, nonanala, 2-nonenala, 2,3-butandiona, 2-butanona, 3-hidroksi-2-butanona, 3-metil-1-butanola, 2-metil-1-butanola, fenilmetanola, 2-feniletanola, 2-metilpropanske i 2-metilbutanske kiseline, heksil-acetata, furfurala, 2-acetil-1-pirolina, 6-acetiltetrahidropiridina, 4-hidroksi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona i dimetil-trisulfida povećava se prihvatljivost arome te prema tome oni imaju pozitivno djelovanje. Nasuprot tome, heksanal, 2-dekenal, (*E,E*)-2,4-dekadienal, benzaldehid, metional, 1-okten-3-ol, butanska i dekanska kiselina imaju negativno djelovanje budući da se s povećanjem njihove koncentracije smanjuje prihvatljivost arome kruha.

### 2.5.1. Porijeklo hlapljivih spojeva arome

#### 2.5.1.1. Fermentacija

Pri fermentaciji, kvasac *S. cerevisiae* prevodi 95 % fermentabilnih šećera u etanol i CO<sub>2</sub>. Većina etanola nastalog pri fermentaciji ispari pri pečenju. Preostalih 5 % fermentabilnih šećera se sekundarnim reakcijama iz piruvata nastalog glikolizom prevodi u alkohole, kratkolančane masne kiseline, estere i karbonilne spojeve. Osim toga, Erlichovim putem dolazi i do pretvorbe aminokiselina u alkohole, aldehide i estere (Pico i sur., 2015; Pozo-Bayón i sur., 2006). Kvasci proizvode estere i reakcijom acetil-koenzima A derivata masnih kiselina i alkohola koju katalizira enzim transferaza (Birch i sur., 2014; Lilly i sur., 2006). Budući da su jako hlapljivi, većina nastalih estera ispari prilikom pečenja (Birch i sur., 2014). Usljed metaboličke aktivnosti kvasaca dolazi i do nastanka kiselina (octene, butanske, heksanske kiseline) pomoću sintetaze masnih kiselina uz malonil-koenzim A kao supstrat (Berry i Watson, 1987). Na vrstu i koncentraciju hlapljivih spojeva arome koji nastaju prilikom fermentacije značajno utječe koncentracija i soj kvasaca te uvjeti u kojima se ona provodi (temperatura i vrijeme). Prema istraživanju Birch i sur. (2013a), pri fermentaciji sa

sedam različitih komercijalno dostupnih pekarskih kvasaca (potencijalno različiti sojevi kvasca *S. cerevisiae*) dobivena je značajno različita koncentracija 1-propanola, 2-metil-1-propanola, 2-feniletanola, 3-metilbutanala, fenilacetaldehida i 2,3-butandiona u kruhu. S povećanjem koncentracije kvasca, povećava se i koncentracija većine hlapljivih spojeva arome u kruhu koji nastaju uslijed njegove aktivnosti (Birch i sur., 2013b). U kruhu fermentiranom pri nižoj temperaturi (5 °C) utvrđena je veća koncentracija pojedinih estera (etil-acetata, etil-heksanoata i etil-oktanoata), a u kruhu fermentiranom pri 15 °C i 35 °C veća koncentracija spojeva nastalih oksidacijom lipida (1-heptanola, heksanala, heptanala, oktanala, dekanala i 2-pentilfurana) (Birch i sur., 2013b). Produljenjem vremena fermentacije dolazi do povećanja relativnog udjela alkohola, estera i aromatskih ugljikovodika te smanjenja relativnog udjela aldehida, ketona i karboksilnih kiselina (Maeda i sur., 2009). Prema istraživanju Schieberle i Grosch (1991), produljenjem krušne fermentacije dolazi do povećanja koncentracije 3-metil-1-butanola i 2-feniletanola.

Metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline koja uključuje konverziju i/ili metabolizam ugljikohidrata, spojeva s dušikom, lipida i fenolnih spojeva direktno i indirektno doprinosi nastanku hlapljivih spojeva arome (Gänzle, 2014). Ovisno o vrsti i soju bakterije mliječne kiseline primijenjene za kiseljenje, razlikuje se vrsta i količina hlapljivih spojeva arome u kruhu (Damiani i sur., 1996; Hansen i Hansen, 1994b; Kaseleht i sur., 2011; Plessas i sur., 2008). Kako je već navedeno, metabolizmom homofermentativnih bakterija mliječne kiseline nastaje mliječna kiselina, a heterofermentativnih mliječna i octena kiselina, etanol i CO<sub>2</sub> (Gobbetti i Gänzle, 2013). Osim navedenih metabolita, heterofermentativne bakterije mliječne kiseline većinom proizvode etil-acetat i druge estere te neke alkohole i aldehide, a homofermentativne 2,3-butandion i druge karbonilne spojeve (Damiani i sur., 1996; Kaseleht i sur., 2011). Specifični metabolički putevi pojedinih bakterija mliječne kiseline također utječu na nastanak hlapljivih spojeva arome, a jedan od njih je put arginin deiminaze prisutan kod bakterija *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. pontis*, *L. frumenti* i *L. sakei*. Osim što omogućava dodatnu proizvodnju energije i veću otpornost na kisele uvjete, tijekom fermentacije putem arginin deiminaze dolazi do konverzije arginina u ornitin koji je prekursor 2-acetil-1-pirolina, spoja koji nastaje tijekom pečenja i koji je odgovoran za karakterističnu aromu kore pšeničnog kruha (De Vuyst i sur., 2009; Gänzle i sur., 2007). Na aromu kiselog tijesta značajno utječu i vrsta brašna primijenjenog za kiseljenje, interakcija bakterija mliječne kiseline i enzima prisutnih u sirovinama (Ravyts i De Vuyst, 2011), kao i primijenjeni uvjeti procesa. Produljenje vremena fermentacije utječe na povećanje koncentracije hlapljivih

spojeva arome. Van Kerrebroeck i sur. (2018) su utvrdili povećanje koncentracije alkohola 1-pentanola i metilbutanola u kruhu s produljenjem vremena fermentacije kiselog tijesta (od 24 sata do 72 sata), a Ravyts i De Vuyst (2011) povećanje koncentracije octene kiseline. Proteoliza i oslobađanje aminokiselina tijekom procesa kiseljenja tijesta doprinose povećanju koncentracije prekursora za nastanak hlapljivih spojeva arome. Proteolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline u kiselom tijestu je ograničena, no smanjenje pH uslijed nastanka kiselina aktivira proteaze prisutne u žitaricama i tako se povećava udjel peptida i slobodnih aminokiselina. Bakterije mliječne kiseline zatim enzimskim putevima prevode aminokiseline u različite hlapljive spojeve (De Vuyst i sur., 2009; Gänzle i sur., 2007; Thiele i sur., 2002).

#### 2.5.1.2. Oksidacija lipida

Oksidacija lipida obuhvaća autooksidaciju, enzimsku oksidaciju i fotooksidaciju. Autooksidacija i enzimsku oksidacija značajno utječu na profil hlapljivih spojeva arome kruha. Do autooksidacije dolazi uslijed lančane reakcije slobodnih radikala, a koja se može podijeliti na inicijalnu, propagacijsku i terminalnu fazu. U inicijalnoj fazi dolazi do gubitka vodika i nastanka alkil-radikala (slobodni radikal lipida). U propagacijskoj fazi dolazi do njihove reakcije s kisikom i nastanka peroksil-radikala te prijenosa vodika i nastanka hidroperoksida. U terminalnoj fazi dolazi do akumulacije peroksilnih radikala, a reakcijom dvaju radikala do nastanka neradikalnih produkata (Bartosz i Kołakowska, 2010; Frankel, 2005; Parker, 2015). Iz nastalih hidroperoksida kompleksnim sekundarnim reakcijama (pri visokim temperaturama i prisutnosti metalnih katalizatora) nastaju karbonilni spojevi, alkoholi, alkani i drugi spojevi. Osim raspadanja monohidroperoksida, pri autooksidaciji dolazi i do oksidacije nezasićenih aldehida i ketona te raspadanja nehlapljivih sekundarnih produkata (dimera, oligomera, hidroperoksi-epoksida, hidroperoksi-epidioksida, dihidroperoksida) na sličan način kao i monohidroperoksida te nastanka sličnih hlapljivih spojeva (Frankel, 2005). Na autooksidaciju lipida utječe niz faktora – prisutnost i aktivnost prooksidansa i antioksidansa, sastav masnih kiselina, prisutnost kisika i kontaktna površina s njim, aktivitet vode, temperatura i drugi (Bartosz i Kołakowska, 2010). Što je veći stupanj nezasićenosti masnih kiselina, lakše započinje oksidacija. Mononezasićene kiseline su 10 puta reaktivnije, a polinezasićene 100 puta reaktivnije od zasićenih masnih kiselina. Do autooksidacije dolazi i tijekom toplinske obrade pri visokim temperaturama. Nezasićene masne kiseline su sklonije oksidaciji pri nižim temperaturama za razliku od zasićenih koje oksidiraju pri visokim temperaturama. Cijepanjem nastalih lipidnih hidroperoksida nastaje niz



hlapljivih spojeva. Iz hidroperoksida nastalih iz zasićenih masnih kiselina nastaju alkani, aldehidi, alkoholi (većinom C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), karboksilne kiseline i laktoni. Iz hidroperoksida mononezasićenih masnih kiselina nastaju srednje lančani aldehidi, 2-alkenali, alkani i alkeni, a iz hidroperoksida polinezasićenih masnih kiselina alkanali, alkenali, 2,4-alkadienali i 2-alkilfurani (Parker, 2015).

Enzimsku oksidaciju lipida kataliziraju enzimi lipoksigenaze. Lipoksigenaze su prirodno prisutne u žitaricama i mahunarkama, ponajviše u vanjskom dijelu zrna. Njihova aktivnost povećava se dodatkom vode (Domoney i sur., 1990; Frankel, 2005; Malekian i sur., 2000). Lipoksigenaze ponajviše djeluju na slobodne masne kiseline koje se lakše oksidiraju u odnosu na one vezane. One kataliziraju reakciju oksidacije polinezasićenih masnih kiselina (ponajviše linolne i linolenske kiseline) pri čemu nastaju 9-hidroperoksidi i 13-hidroperoksidi. Cijepanjem nastalih hidroperoksida djelovanjem hidroperoksid liaza ili neenzimskim putem te drugim reakcijama (izomerizacijom, premještanjem) nastaju slični spojevi kao i pri procesu autooksidacije – aldehidi, ketoni, alkoholi, vinil-ester, okso-kiseline, epoksi-hidroksi-esteri i dimeri (Frankel, 2005).

U proizvodnji kruha, tijekom pripreme tijesta dolazi do značajne autooksidacije lipida uslijed miješanja i ugradnje zraka u tijesto, povećanja kontaktne površine kisika i reaktanata, enzimske oksidacije uslijed povećanja aktivnosti enzima lipaza i lipoksigenaza s dodatkom vode. Tijekom pečenja dolazi do inaktivacije enzima, ali i do nastavka autooksidacije pri visokim temperaturama (Maire i sur., 2013). Vrsta masne kiseline i način oksidacije utječu na vrstu nastalog hidroperoksida, a vrsta nastalog peroksida i mjesto njegovog cijepanja određuje koji će hlapljivi spoj nastati (Frankel, 2005). Oksidacijom lipida nastaju senzorski poželjni i nepoželjni spojevi. Vrsta i koncentracija spojeva nastalih oksidacijom lipida utječu na konačni senzorski doživljaj proizvoda. Njihova vrlo mala koncentracija može dovesti do promjene arome, a uobičajeno nezasićeni spojevi imaju niži prag osjetljivosti od zasićenih (Frankel, 2005; Parker, 2015).

### 2.5.1.3. Maillardova reakcija

Maillardovom reakcijom nastaju poželjni spojevi odgovorni za karakterističnu aromu kore kruha (Pico i sur., 2015). Radi se o iznimno kompleksnoj reakciji koja uključuje reducirajuće šećere i amino-spojeve iz kojih u nizu paralelnih i serijskih reakcija nastaju hlapljivi spojevi arome, pigmenti i drugi spojevi (Parker, 2015). Može se podijeliti u tri faze: inicijalnu, intermedijarnu i finalnu. U inicijalnoj fazi odvijaju se reakcije kondenzacije šećera i amina te

Amadorijevo pregrađivanje. U intermedijarnoj fazi dolazi do dehidracije i fragmentacije šećera te Streckerove degradacije (Hodge, 1953). U početnoj i intermedijarnoj fazi nastaju prekursori za nastanak hlapljivih spojeva arome i boje (Parker, 2015). U finalnoj fazi odvijaju se reakcije kondenzacije aldola, kondenzacije aldehida i amina te nastanka heterocikličkih spojeva (Hodge, 1953). U finalnoj fazi Maillardove reakcije, osim hlapljivih spojeva arome, nastaju i melanoidini, smeđi spojevi velike molekulske mase odgovorni za karakterističnu boju kruha (Starowicz i Zieliński, 2019).

Spojevi koji nastaju Maillardovom reakcijom, a utječu na aromu, mogu se podijeliti u tri skupine: spojeve s kisikom (furfurali, furanoni i piranoni), spojeve s dušikom (pirazini, pirolini, pirolini, oksazoli, oksazolini) i spojeve sa sumporom (sulfidi, furantioli, tiazoli, tiazolini, ditiazini) (Starowicz i Zieliński, 2019). Vrsta prisutnih aminokiselina i šećera određuje koje će vrste produkata, odnosno hlapljivih spojeva arome nastati tijekom Maillardove reakcije, a na njenu kinetiku utječu koncentracija prekursora, pH, aktivitet vode, temperatura i vrijeme toplinske obrade te interakcija s komponentama matrice (Parker, 2015; Purlis, 2010). Reaktivnost pojedinih aminokiselina i šećera se međusobno razlikuje, ovisi o fazi Maillardove reakcije, a navedene razlike utječu i na brzinu reakcije. Kiseli pH u inicijalnoj fazi pospješuje reakcije, a u intermedijarnoj fazi o pH ovisi kojim će se putem daljnje reakcije odvijati. Niski aktivitet vode također pospješuje reakcije. Što se tiče utjecaja temperature i vremena toplinske obrade, povećanjem temperature i produljenjem vremena dolazi do daljnjeg nastanka stabilnih spojeva, ali i degradacije onih nestabilnih. Interakcija s komponentama matrice može pospješiti ili usporiti Maillardovu reakciju. Na primjer, proteini predstavljaju dodatni izvor amino-skupina koje mogu sudjelovati u reakcijama, no mogu i vezati nastale hlapljive spojeve. Također, aldehidi nastali oksidacijom lipida mogu sudjelovati u reakcijama kondenzacije (Parker, 2015).

Osim promjena koje utječu na boju i aromu konačnog proizvoda, pri Maillardovoj reakciji dolazi i do nepoželjnog smanjenja bioiskoristivosti slobodnih aminokiselina i proteina (Morales i sur., 2007), nepoželjnog nastanka akrilamida (Mottram i sur., 2002) te povećanja antioksidativne aktivnosti s nastankom melanoidina (Shen i sur., 2019).

#### 2.5.1.4. Karamelizacija

Karamelizacija podrazumijeva skupinu reakcija ugljikohidrata pri temperaturi višoj od 150 °C, niskom aktivitetu vode i u odsutnosti aminokiselina (Parker, 2015; Quintas i sur., 2007). Različitim reakcijskim putevima nastaje veliki broj produkata karamelizacije (Quintas

i sur., 2007), poput karbonilnih spojeva i furana (Pico i sur., 2015). Dolazi do cijepanja šećera, a hlapljivi spojevi arome nastaju kondenzacijom aldola fragmenata šećera (Parker, 2015).

#### 2.5.1.5. Toplinska degradacija

Pri visokim temperaturama (230 °C) pečenja dolazi i do toplinske degradacije šećera i aminokiselina pri čemu također nastaju hlapljivi spojevi bitni za aromu kore kruha (Pozo-Bayón i sur., 2006), poput octene kiseline, acetaldehida, furana, piridina i drugih (Pico i sur., 2015).

#### 2.5.1.6. Interakcije pri nastanku hlapljivih spojeva arome

Pri nastanku hlapljivih spojeva arome može doći i do interakcije pojedinih puteva njihovog nastanka. Tako je utvrđena interakcija kvasaca i bakterija mliječne kiseline pri fermentaciji. Pri tome kvasac utječe na povećanje proizvodnje octene kiseline od strane bakterija mliječne kiseline (Paramithiotis i sur., 2005), a bakterije mliječne kiseline na proizvodnju hlapljivih spojeva arome metabolizmom kvasca (Damiani i sur., 1996). Nadalje, u slučaju aktivnosti kvasaca i oksidacije lipida dolazi do kompeticije budući da je za oboje potreban kisik. Također, uslijed aktivnosti kvasaca i bakterija mliječne kiseline može doći do smanjenja koncentracije produkata oksidacije lipida (Czerny i Schieberle, 2002; Nor Qhairul Izzreen i sur., 2016). Heterofermentativni laktobacili djelovanjem na konverziju lipidnih peroksida u hidrokside, hidriranjem nezasićenih masnih kiselina u hidroksi-masne kiseline djelovanjem hidrataze masnih kiselina i konverzijom aldehida nastalih oksidacijom lipida pomoću bakterijske alkohol dehidrogenaze u pripadajuće alkohole djeluju na smanjenje koncentracije produkata oksidacije lipida. Nasuprot tome, homofermentativni laktobacili doprinose nastanku vodikovog peroksida tijekom metabolizma glukoze te tako doprinose i nastanku produkata oksidacije lipida (Gänzle, 2014; Vermeulen i sur., 2007). Utvrđeno je i kako tijekom Maillardove reakcije može doći do degradacije hlapljivih spojeva koji su produkti oksidacije lipida pri čemu nastaju furani, karbonilni i drugi spojevi. Pri navedenim reakcijama aminokiseline djeluju kao katalizatori, a s obzirom na reaktivnost, nezasićeni aldehidi koji su produkti oksidacije lipida reaktivniji su od zasićenih (Adams i sur., 2011b). Osim toga, fizikalno-kemijske interakcije s komponentama u matrici također mogu značajno utjecati na percepciju arome. Poznato je da proteini, škrob, masti i drugi sastojci mogu vezati hlapljive spojeve te tako utjecati na njihovo otpuštanje i percepciju arome (Guichard, 2002).

### 2.5.2. Aroma bezglutenskog kruha i metode poboljšanja

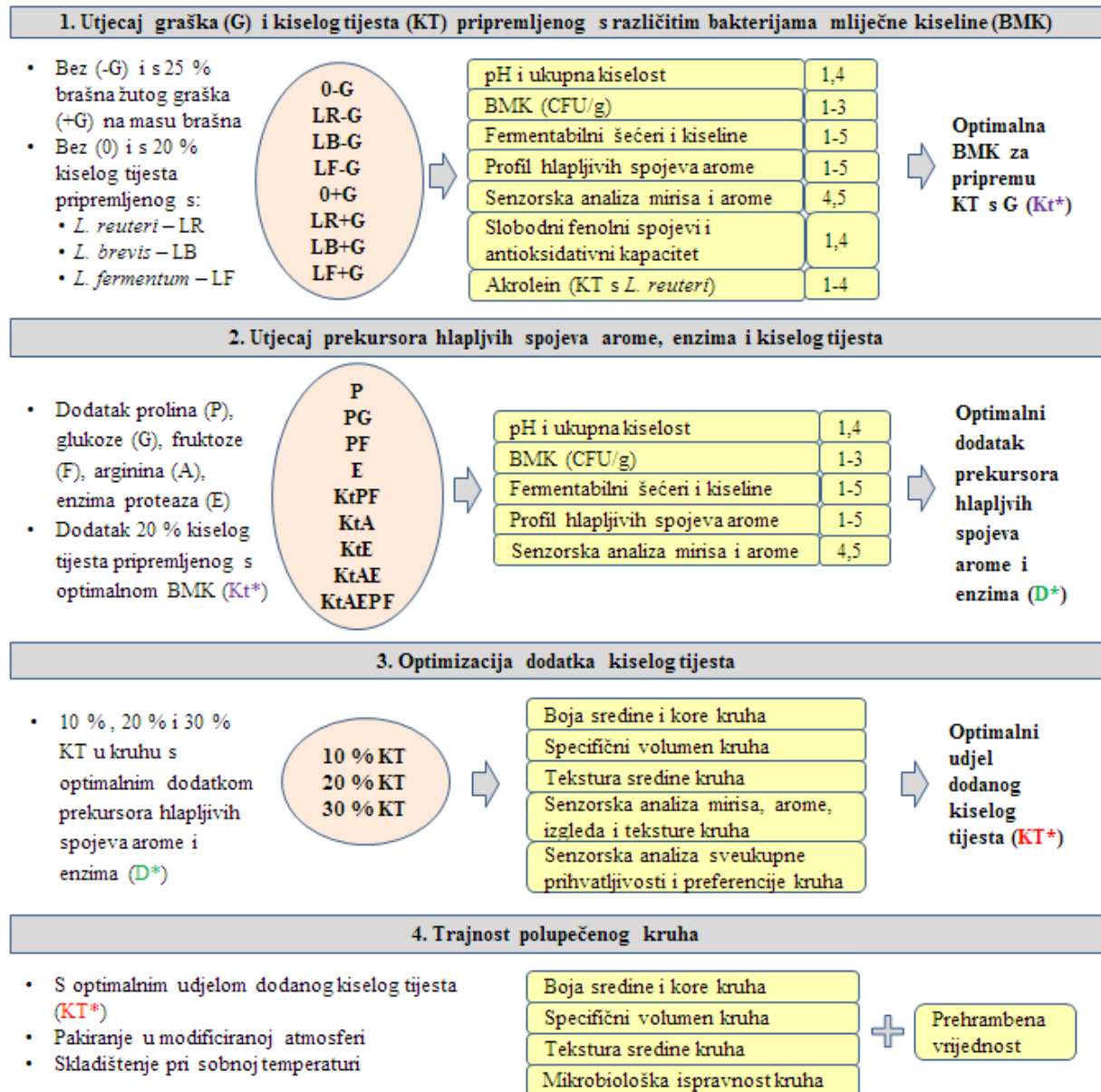
Među ostalim parametrima kvalitete kruha, aroma je jedan od najznačajnijih, ali i najmanje istraženih parametara. To se posebice odnosi na aromu bezglutenskog kruha, čija su istraživanja tek u začetku. Budući da bezglutenski kruh karakterizira loša aroma (Arendt i Dal Bello, 2008), analiza profila hlapljivih spojeva arome takvog kruha je nužna kako bi se utvrdio uzrok i mogući načini poboljšanja. Dosadašnja istraživanja profila hlapljivih spojeva arome bezglutenskog kruha bavila su se razumijevanjem procesa nastanka hlapljivih spojeva arome u fazama proizvodnje kruha (Pico i sur., 2017b); analizom utjecaja primjene različitih metoda dopečenja (Aguilar i sur., 2015); analizom utjecaja primjene brašna različitih vrsta bezglutenskih žitarica i pseudožitarica te škrobova u svrhu postizanja profila hlapljivih spojeva arome sredine i kore što sličnijeg pšeničnom kruhu (Pico i sur., 2019a, 2018b, 2017a); analizom utjecaja dodatka šećera i aminokiselina u svrhu poboljšanja arome (Pacyński i sur., 2015). Prema Pacyński i sur. (2015), jedan od uzroka loše arome bezglutenskog kruha značajan je nedostatak spojeva kako što su pirazini i 2-acetil-1-pirolin. Nasuprot tome, Pico i sur. (2019a) su utvrdili veću koncentraciju pirazina, pirola, furana i 2-acetil-1-pirolina u bezglutenskom nego pšeničnom kruhu, kao i općenito veću koncentraciju većine analiziranih spojeva. Prema Pico i sur. (2019a), uobičajeno lošija aroma bezglutenskog kruha u odnosu na pšenični može biti posljedica različitog omjera prisutnih spojeva i/ili strukture kruha koja utječe na otpuštanje hlapljivih spojeva. Boeswetter i sur. (2019) su utvrdili kako bezglutenskom kruhu na bazi rižinog brašna nedostaje aroma pečenog (engl. *roasty*) svojstvena pšeničnom kruhu.

Aroma bezglutenskog kruha bi se potencijalno mogla poboljšati primjenom kiselog tijesta u njegovoj proizvodnji. Proces kiseljenja tijesta utječe na poboljšanje arome kruha direktnim djelovanjem bakterija mliječne kiseline na povećanje koncentracije poželjnih i smanjenje koncentracije nepoželjnih spojeva te indirektnim djelovanjem na oslobađanje prekursora poželjnih hlapljivih spojeva arome (Czerny i Schieberle, 2002). Budući da se metabolička aktivnost važna za nastanak hlapljivih spojeva arome razlikuje između različitih sojeva bakterija mliječne kiseline te da nastanak hlapljivih spojeva ovisi i o supstratu i uvjetima fermentacije, posljedično dolazi do razlike u profilu hlapljivih spojeva kruha ovisno o primijenjenoj kulturi, sirovinama i uvjetima proizvodnje (Gänzle i sur., 2007; Katina i sur., 2006; Ravyts i De Vuyst, 2011). Stoga je potrebno odabrati prikladnu starter kulturu, sirovine i uvjete proizvodnje koji će rezultirati kruhom poželjnih senzorskih svojstava. Dodatak prekursora hlapljivih spojeva arome (šećera i aminokiselina) te enzima poput amilaza i

proteaza koji dovode do povećanja koncentracije šećera, odnosno aminokiselina također može direktno i indirektno doprinijeti poboljšanju arome kruha (Martínez-Anaya, 1996). Pacyński i sur. (2015) su postigli poboljšanje profila hlapljivih spojeva arome uslijed povećanja koncentracije pirazina u bezglutenskom kruhu s dodatkom kombinacije šećera i aminokiselina. Bredie i sur. (2006) su utvrdili kako dodatak aminokiselinskih prekursora i enzima dovodi do veće koncentracije poželjnih hlapljivih spojeva arome u kruhu.

### 3. MATERIJALI I METODE

Na slici 2 prikazana je shema istraživanja provedenog u okviru doktorskog rada.



**LEGENDA:**

Uzorci – ovalni okvir; analize – zaobljeni pravokutni okvir

Analizirani uzorci: 1 – kiselo tijesto, 2 – krušno tijesto prije fermentacije, 3 – krušno tijesto nakon fermentacije, 4 – kruh, 5 – kora

**Slika 2.** Shematski prikaz provedenih eksperimenata u četiri faze istraživanja

Istraživanje je provedeno u četiri faze. U prvoj fazi istraživanja ispitan je utjecaj dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline na pH i ukupnu kiselost, udjel kiselina i šećera, profil hlapljivih spojeva arome, koncentraciju slobodnih ukupnih fenolnih spojeva i fenolnih kiselina, antioksidativni kapacitet, koncentraciju akroleina u fazama pripreme kruha te senzorska svojstva bezglutenskog kruha. U drugoj fazi istraživanja ispitan je utjecaj dodatka pojedinih prekursora hlapljivih spojeva

arome i enzima te njihove kombinacije, kao i kombinacije s dodatkom kiselog tijesta, na pH i ukupnu kiselost, udjel kiselina i šećera, profil hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha te senzorska svojstva bezglutenskog kruha s brašnom žutog graška. U trećoj fazi istraživanja optimiziran je udjel dodanog kiselog tijesta s obzirom na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva kruha pripremljenog prema recepturi koja se pokazala optimalnom u prethodnoj fazi istraživanja. U četvrtoj fazi istraživanja je polupečenom kruhu pripremljenom prema optimalnoj recepturi s obzirom na dodatak prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel kiselog tijesta određena prehrambena vrijednost i trajnost.

### **3.1. Propagacija bakterija mliječne kiseline**

Za pripremu kiselog tijesta korištene su bakterijske kulture *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 i *Lactobacillus brevis* DSM 20054 (DSMZ, Njemačka) razmnožavane u MRS bujonu (Biolife, Italija) pripremljenom prema uputi proizvođača i steriliziranom (15 minuta pri 121 °C) u autoklavu (Sutjeska 1-62-161, Srbija).

Bakterijska kultura čuvana je u liofiliziranom obliku pri 4 °C ili u suspenziji 25 % glicerola pri -18 °C. U slučaju naciepljivanja kulture u liofiliziranom obliku, kultura je rehidrirana u 1 mL predgrijanog MRS bujona tijekom 30 minuta. U slučaju naciepljivanja kulture u suspenziji 25 % glicerola, kultura je neposredno prije odmrznuta i homogenizirana. Volumen od 10 mL predgrijanog MRS bujona naciepljen je s 1 mL rehidrirane liofilizirane kulture ili 0,1 mL kulture u suspenziji 25 % glicerola. Podloga s naciepljenom kulturom inkubirana je 24 ± 2 sata (faza 1) u termostatu (Memmert 100-800, Njemačka) pri optimalnoj temperaturi rasta bakterija – 37 °C za *L. reuteri* DSM 20016 i *L. fermentum* DSM 20052, 30 °C za *L. brevis* DSM 20054. Nakon inkubacije je u sterilnim uvjetima po 1 mL tekuće podloge s poraslom kulturom iz faze 1 prenesen u tri epruvete s 10 mL svježeg predgrijanog MRS bujona. Podloge s naciepljenom kulturom inkubirane su 24 ± 2 sata pri optimalnoj temperaturi (faza 2). Porasla bakterijska kultura iz faze 2 je u sterilnim uvjetima naciepljena u 200 mL svježeg predgrijanog MRS bujona. Naciepljena podloga inkubirana je 72 ± 2 sata pri optimalnoj temperaturi (faza 3). Nakon završene inkubacije u fazi 3, MRS bujon s poraslom bakterijskom kulturom centrifugiran (Rotina 35, Njemačka) je pri 4000 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 minuta. Biomasa je isprana dva puta s 50 mL sterilne vode nakon čega je resuspendirana u 100 mL sterilne vode.

### 3.2. Priprema kiselog tijesta i kruha

Za pripremu kiselog tijesta i kruha korištene su sljedeće sirovine: vodovodna voda, integralno rižino brašno (Advent, Hrvatska), brašno žutog graška (Fuszerhaz, Mađarska) prosijano na veličinu čestica  $< 1120 \mu\text{m}$ , integralno proseno brašno (Werz, Njemačka), kukuruzni ekstrudat (Naše klasje, Hrvatska), kukuruzni škrob Maisita (Agrana, Austrija), bjelanjak u prahu (Elcon – Prehrambeni proizvodi, Hrvatska), biljna mast (Zvijezda, Hrvatska), hidrokoloidi Methocell K4M Food Grade i Wellence Gluten Free 47129 (The Dow Chemical Company, SAD), emulgator MONO 40 (Juchem, Njemačka), sitna morska sol (Solana Pag, Hrvatska), konzumni bijeli šećer (Viro, Hrvatska), prašak za pecivo Dolcela (Podravka, Hrvatska), suhi instant kvasac Di-go (Kvasac, Hrvatska), L(+)-arginin (98,5-100 %, Fisher Scientific, SAD), L(-)-prolin ( $< 99 \%$ , Acros Organics, Belgija), D(+)-glukoza ( $\geq 99,5 \%$ , Gram-Mol, Hrvatska), D(+)-fruktoza (99 %, Acros Organics, Belgija), fungalna proteaza A (500 000 HUT  $\text{g}^{-1}$ , Bio-cat, SAD).

#### 3.2.1. Priprema kiselog tijesta

Recepture za pripremu kiselog tijesta prikazane su u tablici 1 (str. 33). Odvagana brašna i voda za pripremu kiselog tijesta stavljena su zasebno na predgrijavanje u fermentacijskoj komori (Weisheu GS1 ED 60/40, Njemačka) pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 2 sata. Nakon predgrijavanja svi sastojci izmiješani su ručnom miješalicom (mikser, Tefal *Prep' Line*, Francuska) te je dodan inokulum kulture bakterija mliječne kiseline – *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum* (pripremljen prema opisu u poglavlju 3.1.) od oko  $10^6 \text{ CFU g}^{-1}$ . Tijesto je poklopljeno i stavljeno na fermentaciju u fermentacijskoj komori pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 16 sati. Tijekom fermentacije praćeni su pH i temperatura tijesta pomoću zapisivača podataka OM-CP-PH101 (Omega Engineering, Velika Britanija) i pripadajućeg programa Omega v2.07.1 (Omega Engineering, Velika Britanija). Po završetku fermentacije, izuzet je uzorak za određivanje broja živih stanica bakterija mliječne kiseline. Dio kiselog tijesta iskorišten je za pripremu krušnog tijesta, a dio je zamrznut tekućim dušikom (Messer Croatia Plin, Hrvatska) te čuvan pri  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  do analize.

#### 3.2.2. Priprema kruha

Recepture za pripremu kiselog tijesta prikazane su u tablici 2 (str. 34).



**Tablica 1.** Recepture za pripremu kiselog tijesta po fazama istraživanja

Sirovina	Udjel sirovina na masu brašna (%)							
	1. faza			2. faza				3. faza
	LR-G, LB-G, LF-G	LR+G, LB+G (Kt), LF+G	KtPF	KtA	KtE	KtAE	KtAEPF	KTAEPF 10 % KT, 20 % KT, 30 % KT
Integralno rižino brašno	81,25	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Integralno proseno brašno	18,75	18,75	18,75	18,75	18,75	18,75	18,75	18,75
Brašno žutog graška	0,00	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
Vodovodna voda	150	150	150	150	150	150	150	150
Arginin*			-	0,1	-	0,1	0,1	0,1
Proteaze <sup>#</sup>			-	-	0,25	0,25	0,25	0,25
Inokulum (~ 10 <sup>6</sup> CFU g <sup>-1</sup> )	<i>L. reuteri/L. brevis/L. fermentum</i>		<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>

OZNAKE: **1. faza:** 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška; **2. faza** (svi uzorci s dodatkom brašna žutog graška): 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto, A – arginin; **3. faza:** 10 %, 20 % i 30 % dodanog KT u kruh KtAEPF (opisano pod 2. fazom)

\*izraženo na masu brašna u krušnom tijestu

<sup>#</sup>izraženo na masu proteina u kiselom tijestu

**Tablica 2.** Recepture za pripremu krušnog tijesta po fazama istraživanja

Sirovina	Udjel sirovina na masu brašna (%)															
	1. faza				2. faza									3. faza		
	0-G	LR-G, LB-G, LF-G	0+G (0)	LR+G, LB+G (Kt), LF+G	P	PF	PG	E	KtPF	KtA	KtE	KtAE	KtAEPF	10 % KT	20 % KT	30 % KT
Integralno rižino brašno <sup>x</sup>	65	65	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Kukuruzni škob	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Integralno proseno brašno <sup>x</sup>	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Brašno žutog graška <sup>x</sup>	0	0	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Kukuruzni ekstrudat	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Biljna mast	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Hidrokoloidi Wellence	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Hidrokoloidi Methocel	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Sol	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Prašak za pecivo	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Emulgator MONO 40	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Šećer	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Suhi instant kvasac	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Vodovodna voda <sup>x</sup>	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115
Bjelanjak u prahu	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Prolin	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Glukoza	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruktoza	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1	1	1	1
Kiselo tijesto*	-	20	-	20	-	-	-	-	20	20	20	20	20	10	20	30
Proteaze <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-

OZNAKE: **1. faza:** 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška; **2. faza** (svi uzorci s dodatkom brašna žutog graška): 0 – bez dodatka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto, A – arginin; **3. faza:** 10 %, 20 % i 30 % dodanog KT u kruh KtAEPF (opisano pod 2. fazom)

<sup>x</sup>dio sirovine zamijenjen kiselim tijestom (kod recepture s dodatkom kiselog tijesta); \*izraženo na masu krušnog tijesta; <sup>#</sup>izraženo na masu proteina u kiselom tijestu

Suhi sastojci homogenizirani su pomoću stolne miješalice (Electrolux EKM4000, Švedska) pri brzini 1. Istovremeno je kvasac razmućen u vodovodnoj vodi temperature 35 °C (masa vode = 7 × masa kvasca), dodan mu je šećer te je stavljen na predfermentaciju tijekom 10 minuta u fermentacijskoj komori (Weisheu GS1 ED 60/40, Njemačka) pri 35 °C i relativnoj vlažnosti zraka 85 %. Nakon homogenizacije suhih sastojaka i po završetku predfermentacije kvasca, suhim sastojcima dodana je otopljena biljna mast, predfermentirani kvasac te kiselo tijesto (kod uzoraka koji sadrže kiselo tijesto). Smjesa je zatim miješana 3 minute pri brzini 1 uz dodatak ostatka vode. Miješanje je nastavljeno pri brzini 3 tijekom 1,5 minute, nakon čega je dodan prethodno ručnom miješalicom (Tefal *Prep' Line*, Francuska) istučeni bjelanjak (15 sekundi pri brzini 1, 45 sekundi pri brzini 4, 30 sekundi pri brzini 5). Nakon dodatka bjelanjka, smjesa je miješana 1 minutu pri brzini 1, zatim promiješana silikonskom lopaticom i miješana još 1 minutu pri brzini 1. Po završetku miješanja, izmjeren je pH tijesta pomoću pH metra (Testo 205, Njemačka). Dio krušnog tijesta prije fermentacije izuzet je za mikrobiološku analizu, a dio je zamrznut tekućim dušikom i čuvan pri -18 °C do analize. Po 100 g tijesta odvagano je u silikonske kalupe (promjera 5,5 cm na dnu i 9 cm na vrhu kalupa; Ricomax, Kina) i fermentirano tijekom 50 minuta (45 minuta za uzorke 10 % KT, 20 % KT i 30 % KT u 3. fazi istraživanja – optimizirano vrijeme fermentacije) u fermentacijskoj komori pri 35 °C uz relativnu vlažnost zraka 85 %. Optimalno vrijeme fermentacije definirano je kao 75 % od vremena potrebnog da tijesto splasne pri fermentaciji. Nakon fermentacije, komadi tijesta stavljeni su na pečenje u pećnici (Weisheu EB 064-320 IS 600, Njemačka), pri uvjetima navedenim u tablici 3.

**Tablica 3.** Uvjeti pečenja i hlađenja kruha

Parametar	Direktno pečenje	Polupečenje	Dopečenje
<b>Temperatura predgrijavanja</b>	250 °C	250 °C	230 °C
<b>Temperatura pečenja</b>	230 °C	230 °C	200 °C
<b>Vrijeme pečenja</b>	15 min	10 min	12 min
<b>Naparavanje</b>	100 mL	100 mL	-
<b>Hlađenje</b>			
<b>1. i 2. faza*</b>	1 h	1 h	1 h
<b>3. faza*</b>	1,5 h	-	-
<b>4. faza*</b>	-	Vakuuum hlađenje	1,5 h

Faze istraživanja: \*1. ispitivanje utjecaja dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta, 2. ispitivanje utjecaja dodatka kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima, 3. optimizacija udjela dodanog kiselog tijesta, 4. određivanje trajnosti kruha

Dio tijesta nakon fermentacije izuzet je za mikrobiološku analizu, a dio je zamrznut tekućim dušikom i čuvan pri -18 °C do analize.

Uzorci kruha za određivanje utjecaja dodatka brašna žutog graška, različitih sojeva bakterija mliječne kiseline za pripremu kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima proizvedeni su: tehnologijom direktnog pečenja za određivanje profila hlapljivih spojeva arome, udjela šećera i kiselina, pH i ukupne kiselosti, fenolnih spojeva i antioksidativnog kapaciteta; a tehnologijom polupečenja i zamrzavanja za određivanje senzorskih svojstava kruha. Nakon hlađenja direktno pečenog kruha, uzorak cijelog kruha i odvojene kore kruha (gornja, bočna i donja) narezani su na kockice, zamrznuti tekućim dušikom, usitnjeni pomoću laboratorijskog mlina i čuvani pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize. Uzorci kruha namijenjeni za senzorsku analizu su prije dopečenja odmrzavani tijekom 3 sata pri sobnoj temperaturi. Uzorci kruha za određivanje optimalnog dodatka kiselog tijesta proizvedeni su tehnologijom direktnog pečenja za sve analize. Uzorci kruha za određivanje trajnosti proizvedeni su tehnologijom polupečenja uz primjenu vakuum hlađenja i pakiranja u modificiranoj atmosferi.

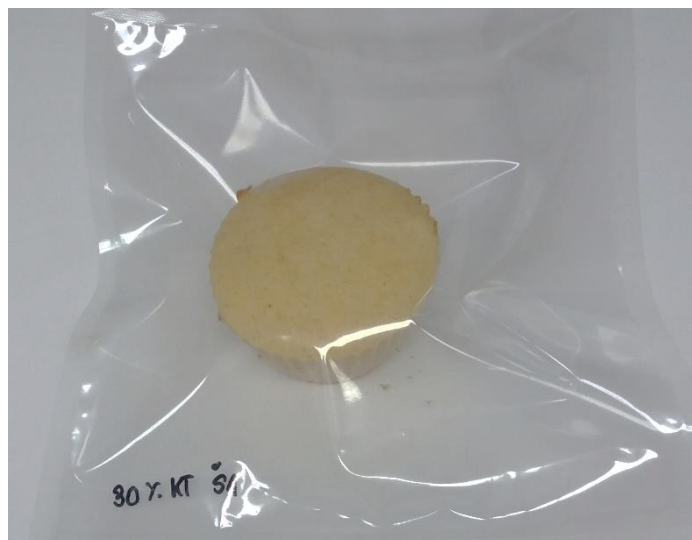
#### 3.2.2.1. Vakuum hlađenje polupečenog kruha

Vakuum hlađenje polupečenog kruha provedeno je u vakuum komori do postizanja temperature  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u sredini kruha. Vakuum komora s dvostrukim čeličnim plaštom i kruženjem silikonskog ulja temperiranog pomoću jedinice za hlađenje (Huber CC-515, Njemačka) spojena je na vakuum pumpu (Welch-ILMVAC LVS 105 T – 10 ef, Njemačka). Smanjenje temperature tijekom vakuum hlađenja praćeno je pomoću temperaturne sonde (HYP1, Omega Engineering, Velika Britanija), zapisivača podataka (OM-CP-QUADTEMP-A, Omega Engineering, Velika Britanija) i pripadajućeg programa (OM-CP Data Logger Software, Omega Engineering, Velika Britanija). Na police vakuum komore stavljeno je osam uzoraka polupečenog kruha neposredno nakon pečenja. Pri vakuum hlađenju, temperatura okoline u vakuum komori iznosila je  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a minimalni postignuti tlak 30 mbar. Vakuum hlađenje trajalo je oko 10 minuta. Po završetku hlađenja, u vakuum komoru upuhan je sterilni zrak (Messer Croatia Plin, Hrvatska).

#### 3.2.2.2. Pakiranje i skladištenje kruha pri određivanju trajnosti

Nakon vakuum hlađenja površina kruha poprskana je 96 % etanolom (Kefo, Hrvatska) te je kruh zapakiran u nepropusne dvoslojne poliamid (PA)/polietilen (PE) vrećice (dimenzije  $22,5\text{ cm} \times 25\text{ cm}$ , PA  $20\text{ }\mu\text{m}$ /PE  $70\text{ }\mu\text{m}$ , debljine  $90\text{ }\mu\text{m}$ , Dora-Pak, Hrvatska) uz upuhivanje modificirane atmosfere (70 %  $\text{CO}_2$  i 30 %  $\text{N}_2$ , Messer Croatia Plin, Hrvatska) i termozavarivanje. Pakiranje je provedeno u specijalnoj komori za pakiranje u modificiranoj

atmosfera (Besser Vacuum Junior Digit, Italija). Vrećice su pohranjene u klima komoru (Mettler HPP 110, Njemačka) pri temperaturi 20 °C i relativnoj vlažnosti zraka 50 %. Na slici 3 nalazi se primjer polupečenog kruha zapakiranog u nepropusnu vrećicu s modificiranom atmosferom.



**Slika 3.** Polupečeni kruh zapakiran u nepropusnu vrećicu s modificiranom atmosferom (vlastita fotografija)

### 3.3. Određivanje kemijskog sastava

Uzorak kruha za analizu kemijskog sastava pripremljen je prema standardnoj metodi AACC 62-05. Određivanje udjela vlage u sirovinama, kruhu i liofiliziranom kiselom tijestu, krušnom tijestu, kruhu i kori provedeno je prema metodi AACC 44-15A, a u kiselom i krušnom tijestu prema metodi Rodríguez-Sandoval i sur. (2008). Određivanje udjela pepela u sirovinama i kruhu provedeno je prema metodi AACC 08-01. Udjel proteina određen je metodom po Kjeldahlu (AACC 46-12.01), a udjel masti metodom po Soxhletu uz hidrolizu po Weibull-Stoldt (ISO 6492:1999, uz modifikacije). Udjel vlakana određen je uz primjenu enzimskog seta Integrated Total Dietary Fiber Assay Kit (Megazyme, Irska). Udjel vlakana netopljivih u vodi (IDF) i vlakana topljivih u vodi, a netopljivih u 78 % etanolu (SDFP) određen je enzimsko-gravimetrijskom metodom. Udjel vlakana topljivih u vodi i u 78 % etanolu (SDFS) određen je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom indeksa loma (engl. *High Performance Liquid Chromatography – Refractive Index Detector*, HPLC-RID) (AOAC 2011.25). Udjel soli određen je metodom po Mohru (ISO 9297:1989). Udjel masnih kiselina određen je u masti ekstrahiranoj metodom po Soxhletu (AACC 30-25.01). Ekstrahirana mast čuvana je pri -18 °C do analize. Priprema metilnih estera masnih kiselina

provedena je prema metodi ISO 5509:2000, analiza prema metodi ISO 5508:1990 pomoću plinskog kromatografa s plameno-ionizacijskim detektorom (ATI Unicam 610, Engleska) na koloni TR-FAME, 30 m × 0,22 mm × 0,25 μm (Thermo Scientific, SAD). Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću programa Unicam 4880 Chromatography Data System (ATI Unicam, Engleska). Analizirana je i standardna smjesa 37 masnih kiselina (F.A.M.E. 10 mg mL<sup>-1</sup> u metilen kloridu, Supelco, SAD). Identifikacija masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja dobivenih pikova s vremenom zadržavanja standarda masnih kiselina. Udjel masnih kiselina određen je metodom izračuna udjela u površini svih pikova. Sve analize provedene su u dva ponavljanja za svaki uzorak.

### **3.4. Određivanje broja živih stanica bakterija mliječne kiseline**

Određivanje broja živih stanica bakterija mliječne kiseline provedeno je prema metodi ISO 15214:1998. Pri analizi uzorka tijesta odvagano je  $10 \pm 0,01$  g uzorka u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu, dodano 90 mL sterilne vode i homogenizirano. Prije naciepljivanja uzorka, u Petrijevu zdjelicu dodana je kap 0,1 % otopine cikloheksimida (Sigma-Aldrich, SAD) kako bi se spriječio rast kvasaca i plijesni. U Petrijevu zdjelicu naciepljen je 1 mL decimalnog razrjeđenja suspenzije biomase ili suspenzije tijesta, zaliven je s 15 mL otopljenog sterilnog de Man, Rogosa i Sharpe (MRS) agara (Biolife, Italija) pripremljenog prema uputi proizvođača i podloga je pažljivo homogenizirana rotacijom po radnoj površini. Nakon skrtnjenja prvog sloja MRS agara, zaliven je drugi sloj kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Naciepljene podloge inkubirane su u termostatu (Memmert 100-800, Njemačka) pri optimalnoj temperaturi rasta (30 °C ili 37 °C) tijekom 72 sata. Analiza je provedena na tri decimalna razrjeđenja u dva ponavljanja. Nakon inkubacije prebrojane su porasle kolonije (na pločama s od 15 do 300 kolonija) te su rezultati izraženi u obliku srednje vrijednosti broja poraslih kolonija (CFU) po mL suspenzije biomase ili gramu tijesta.

### **3.5. Određivanje broja živih stanica kvasaca**

Odvagano je  $10 \pm 0,01$  g uzorka tijesta u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu, dodano 90 mL sterilne vode i homogenizirano. Prije naciepljivanja uzorka, u Petrijevu zdjelicu dodana je kap 1 % otopine oksitetraciklina ( $m V^{-1}$ ) kako bi se spriječio rast bakterija. U Petrijevu zdjelicu naciepljen je 1 mL suspenzije uzorka, zaliven je s 15 mL otopljenog sterilnog sladnog agara za kvasce (engl. *yeast malt agar*; Sigma-Aldrich, SAD) pripremljenog prema uputi proizvođača i podloga je pažljivo homogenizirana rotacijom po radnoj površini. Naciepljene

podloge inkubirane su u termostatu (Memmert 100-800, Njemačka) pri 30 °C tijekom 72 sata. Analiza je provedena na tri decimalna razrjeđenja u dva ponavljanja. Nakon inkubacije ploča prebrojane su porasle kolonije te su rezultati izraženi u obliku srednje vrijednosti CFU g<sup>-1</sup>.

### 3.6. Određivanje pH i ukupne kiselosti

Ukupna kiselost određena je u uzorcima kiselog tijesta i kruha, prema metodi Lefebvre i sur. (2002). Odvagano je  $10 \pm 0,01$  g uzorka svježeg kiselog tijesta ili zamrznutog kruha u plastičnu čašu s poklopcem volumena 200 mL i dodano je 90 mL destilirane vode. Poklopljeni uzorak homogeniziran je na magnetnoj miješalici (IKA RT 5, Njemačka) pri brzini 3 (~ 180 o min<sup>-1</sup>), tijekom 15 minuta. Nakon homogenizacije izmjeren je pH uzorka pomoću pH metra (Jenway 3510, Velika Britanija). Uzorak je titriran s 0,1 M natrijevim hidroksidom (pripremljen iz: natrijev hidroksid, > 98 %, Lachner, Češka) do postizanja pH 8,5. Analiza je provedena u dva ponavljanja za svaki uzorak. Rezultati određivanja ukupne kiselosti izraženi su u obliku volumena 0,1 M natrijevog hidroksida utrošenog za postizanje željenog pH.

Pri analizi rezultata primijenjena je analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA) u kombinaciji s *post hoc* Tukey HSD testom ( $\alpha = 0,05$ ). U 1. fazi istraživanja primijenjena je faktorska ANOVA za ispitivanje utjecaja dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta kao dva faktora, a u 2. fazi istraživanja jednosmjerna ANOVA za ispitivanje utjecaja dodatka prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Provedena je i analiza korelacije pH i ukupne kiselosti, uz  $\alpha = 0,05$ . Statistička analiza provedena je pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc, SAD).

### 3.7. Određivanje šećera i kiselina

Udjel šećera i kiselina određen je u uzorcima kiselog tijesta, krušnog tijesta, kruha (kora i sredina) i kori kruha. Određivanje šećera i kiselina provedeno je prema metodi Lefebvre i sur. (2002), uz modifikacije. Pri određivanju udjela šećera i kiselina korištene su sljedeće kemikalije: kalijev heksacijanoferat (II) trihidrat ( $\geq 99$  %, Kemika, Hrvatska), cinkov sulfat heptahidrat ( $\geq 99,5$  %, Kemika, Hrvatska), saharoza (99,5 %, Sigma-Aldrich, SAD), D(+)-glukoza (99,5 %, Gram-Mol, Hrvatska), D(-)-fruktoza ( $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich, SAD), L(+)-mliječna kiselina ( $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, SAD), octena kiselina ( $\geq 98$  %, Macron, SAD) i sumporna kiselina (96 %, Carlo Erba, Francuska).

### Priprema uzorka

Odvagano je  $10 \pm 0,0001$  g uzorka. Uzorci zamrznutog kiselog tijesta i krušnog tijesta vagani su u laboratorijsku čašu od 100 mL nakon čega je dodano 5 mL destilirane vode kako bi se otopili i mogli kvantitativno prenijeti preko lijevka u odmjernu tikvicu od 50 mL. Uzorci zamrznutog kruha i kore kruha vagani su na papiru nakon čega su kvantitativno preneseni u odmjernu tikvicu od 50 mL. U tikvicu je dodan magnet i 30 mL destilirane vode. Tikvica je začepljena i uzorak je homogeniziran 30 minuta na magnetnoj miješalici (IKA RT 5, Njemačka), pri brzini 3 ( $\sim 180$  o  $\text{min}^{-1}$ ). Nakon homogenizacije magnet je ispran destiliranom vodom u tikvicu i uklonjen, a tikvica je dopunjena destiliranom vodom do oznake. Sadržaj tikvice je promućkan, prenesen u epruvetu za centrifugu i centrifugiran pri  $10000$  o  $\text{min}^{-1}$  tijekom 5 minuta (Rotina 35, Njemačka). Zatim je 5 mL supernatanta preneseno u novu epruvetu, dodan je 1 mL otopine Carrez I (0,085 M vodena otopina kalijevog heksacijanoferata (II) trihidrata) i 1 mL otopine Carrez II (0,25 M vodena otopina cinkovog sulfata heptahidrata). Sadržaj epruvete je promućkan i centrifugiran pri  $4000$  o  $\text{min}^{-1}$  tijekom 5 minuta. Dobiveni supernatant profiltriran je preko najlonskog filtera za brizgalicu (veličina pora  $0,45$   $\mu\text{m}$ , FilterBio, Kina). Profiltrirani uzorak je čuvan pri  $-18$  °C do HPLC analize.

### HPLC analiza

Udjel saharoze, glukoze i fruktoze određen je HPLC-RID metodom, a udjel mliječne i octene kiseline HPLC metodom uz primjenu detektora s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) proizvođača Shimadzu (Japan). Razdvajanje i određivanje šećera i kiselina provedeno je istovremeno, uz primjenu kolone MetaCarb 67H,  $300$  mm  $\times$   $6,5$  mm (Agilent Technologies, SAD), pri sljedećim uvjetima:

Temperatura kolone:  $40$  °C

Volumen uzorka injektiran na kolonu:  $20$   $\mu\text{L}$

Trajanje analize: 25 minuta

Pokretna faza:  $0,5$  mM vodena otopina sumporne kiseline

Protok pokretne faze:  $0,5$  mL  $\text{min}^{-1}$

Valna duljina DAD:  $200$  nm

HPLC analiza provedena je u minimalno dva ponavljanja za svaki uzorak. Za kvantifikaciju šećera i kiselina primijenjena je metoda vanjskog standarda. U  $5$  mL pripremljene otopine standarda dodan je  $1$  mL otopine Carrez I i  $1$  mL otopine Carrez II. Dobivena smjesa promućkana je i profiltrirana preko najlonskog filtera za brizgalicu. Tako pripremljena



otopina standarda korištena je za HPLC analizu. Kalibracijske krivulje izrađene su pomoću dobivenih površina pikova analita (y) i njihovih poznatih koncentracija u otopinama standarda (x). HPLC analiza provedena je u tri ponavljanja na svakoj koncentracijskoj razini. U tablici 4 prikazani su parametri kvalifikacije i kvantifikacije.

**Tablica 4.** Parametri kvalifikacije i kvantifikacije šećera i kiselina HPLC-RID/DAD metodom

Analit	Vrijeme zadržavanja (min)	Koncentracijski raspon (mg mL <sup>-1</sup> )	Analizirane koncentracijske razine	Jednadžba kalibracijske krivulje	Koeficijent korelacije (r)
Saharoza	7,53	0,101 – 2,510	6	$y = 310694 x + 11428$	0,9997
Glukoza	8,95	0,025 – 2,495	10	$y = 330670 x - 1832$	1,0000
Fruktoza	9,87	0,032 – 4,108	10	$y = 313152 x - 6320$	1,0000
Mliječna kiselina	11,73	0,099 – 1,979	6	$y = 1916347 x + 54405$	0,9992
Octena kiselina	14,35	0,013 – 0,521	8	$y = 1377428 x - 2830$	1,0000

Budući da nije postignuto odgovarajuće kromatografsko razdvajanje saharoze i maltoze te fruktoze i ksiloze, rezultati određivanja saharoze i maltoze su izraženi kao ekvivalenti saharoze, a fruktoze i ksiloze kao ekvivalenti fruktoze. Rezultati su izraženi u obliku udjela šećera i kiselina u suhoj tvari uzorka. Izračunat je i fermentabilni koeficijent kao omjer množinske koncentracije mliječne i octene kiseline u kiselom tijestu.

Pri analizi rezultata primijenjena je ANOVA u kombinaciji s *post hoc* Tukey HSD testom ( $\alpha = 0,05$ ). U 1. fazi istraživanja primijenjena je faktorska ANOVA za ispitivanje utjecaja dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta kao dva faktora, a u 2. fazi istraživanja jednosmjerna ANOVA za ispitivanje utjecaja dodatka prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Provedena je i analiza korelacije pH i ukupne kiselosti s koncentracijom mliječne i octene kiseline, uz  $\alpha = 0,05$ . Statistička analiza provedena je pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc, SAD).

### 3.8. HS-SPME/GC-MS analiza profila hlapljivih spojeva arome

Analiza profila hlapljivih spojeva arome provedena je metodom mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (engl. *Headspace-Solid Phase Microextraction*, HS-SPME) u kombinaciji s plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS). Obuhvaćala je analizu 62 spoja, a u tablici 5 prikazan je popis analiziranih spojeva s pripadajućim specifikacijama standarda, kvalifikacijskim i kvantifikacijskim parametrima. Temeljne standardne otopine (engl. *stock* otopine) koncentracije 20 mg mL<sup>-1</sup> pripremljene su u etanolu, a razrjeđenja su pripremljena s vodom.

**Tablica 5.** Hlapljivi spojevi analizirani HS-SPME/GC-MS metodom s pripadajućim specifikacijama standarda (čistoća, proizvođač), kvalifikacijskim i kvantifikacijskim parametrima (ciljani (engl. *target*) i kvalifikacijski ioni, vrijeme zadržavanja, linearni retencijski indeks)

Spoj	CAS broj	Čistoća	Proizvođač	Ciljani ion	Kvalifikacijski ioni	RT	LRI	Koncentracija ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) za optimizaciju ekstrakcije
<b>Aldehidi</b>								
2-Metilbutanal	96-17-3	AS	Sigma-Aldrich	57	41/58/86	3,08	908	81,20
3-Metilbutanal	590-86-3	98	Acros Organics	44	43/57/58	3,14	911	73,30
Pentanal	110-62-3	97	Acros Organics	44	41/57/58	4,14	972	77,60
Heksanal	66-25-1	98	Sigma-Aldrich	56	44/57/72	6,86	1076	8,15
(E)-2-Heksanal	6728-26-3	> 96	Merck	69	41/55/83	12,69	1213	-
Heptanal	111-71-7	AS	Sigma-Aldrich	70	55/57/71	11,10	1180	41,60
(E)-2-Heptanal	18829-55-5	AS	Sigma	83	41/55/57	18,43	1317	3,90
Oktanal	124-13-0	99	Acros Organics	43	57/69/84	16,60	1285	3,86
(E)-2-Oktanal	2548-87-0	95	Alfa Aesar	70	41/55/83	24,58	1421	-
Nonanal	124-19-6	95	Acros Organics	57	41/56/98	22,68	1389	4,10
(E)-2-Nonanal	18829-56-6	AS	Fluka	70	41/55/83	30,78	1526	1,54
(E,E)-2,4-Nonadienal	5910-87-2	$\geq 90$	Sigma-Aldrich	81	41/67/138	39,23	1687	-
Dekanal	112-31-2	95	Acros Organics	57	43/70/82	28,89	1494	3,88
(E,E)-2,4-Dekadienal	25152-84-5	95	Acros Organics	81	41/67/83	42,52	1802	4,14
Benzaldehid	100-52-7	> 99	Acros Organics	106	51/77/105	29,80	1509	1,60
Fenilacetaldehid	122-78-1	98	Acros Organics	91	65/92/120	36,71	1636	-
<b>Ketoni</b>								
2-Butanon	78-93-3	99	Acros Organics	43	57/72	2,94	898	-
2,3-Butandion	431-03-8	99	Acros Organics	43	42/86	4,18	975	78,01
2,3-Pentandion	600-14-6	97	Acros Organics	43	57/100	6,29	1057	76,82
2-Heptanon	110-43-0	98	Merck	58	43/71/114	10,98	1177	39,79
6-Metil-5-hepten-2-on	110-93-0	99	Aldrich	43	41/55/69	19,43	1334	15,44
2-Oktanon	111-13-7	99	Acros Organics	58	43/59/71	16,37	1280	16,08

AS – analitički standard; nd – nije definirano; RT – vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme); LRI – linearni retencijski indeks

**Tablica 5.** Hlapljivi spojevi analizirani HS-SPME/GC-MS metodom s pripadajućim specifikacijama standarda (čistoća, proizvođač), kvalifikacijskim i kvantifikacijskim parametrima (ciljani (engl. *target*) i kvalifikacijski ioni, vrijeme zadržavanja, linearni retencijski indeks) – nastavak

Spoj	CAS broj	Čistoća	Proizvođač	Ciljani ion	Kvalifikacijski ioni	RT	LRI	Koncentracija ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) za optimizaciju ekstrakcije
<b>Alkoholi</b>								
1-Butanol	71-36-3	99,5	Merck	56	41/42/43	9,64	1147	-
2-Metil-1-propanol	78-83-1	$\geq 99,8$	Sigma-Aldrich	43	41/42/74	7,62	1102	79,84
3-Metil-1-butanol	123-51-3	AS	Sigma-Aldrich	55	42/57/70	12,50	1209	72,40
1-Pentanol	71-41-0	99	Acros Organics	42	41/55/70	14,75	1251	78,80
1-Heksanol	111-27-3	98	Acros Organics	56	43/55/69	20,64	1354	83,50
(Z)-3-Heksenol	928-96-1	$> 98$	Merck	67	41/58/82	22,32	1383	-
2-Etil-1-heksanol	104-76-7	99	Acros Organics	57	41/43/83	28,75	1491	8,00
1-Heptanol	111-70-6	98	Acros Organics	70	55/56/69	26,68	1457	8,47
1-Oktanol	111-87-5	99	Acros Organics	56	55/69/70	32,67	1559	7,80
(E)-2-Okten-1-ol	18409-17-1	98	Acros Organics	57	41/43/55	35,86	1618	-
1-Okten-3-ol	3391-86-4	98	Acros Organics	57	43/72/85	26,46	1453	8,08
(Z)-3-Nonen-1-ol	10340-23-5	97	Alfa Aesar	55	41/68/81	38,91	1676	7,76
Fenilmetanol	100-51-6	99	Acros Organics	79	77/107/108	43,90	1877	78,40
2-Feniletanol	60-12-8	100	Merck	91	65/92/122	44,46	1909	78,00
<b>Kiseline</b>								
2-Metilbutanska kiselina	116-53-0	98	Merck	74	41/57/87	38,64	1666	78,01
Pentanska kiselina	109-52-4	99	Alfa Aesar	60	41/55/73	41,04	1750	79,60
Heksanska kiselina	142-62-1	98	Merck	60	41/73/87	43,48	1854	75,26
Heptanska kiselina	111-14-8	98	Acros Organics	60	43/73/87	45,17	1959	77,62
Oktanska kiselina	124-07-2	99	Acros Organics	60	41/43/73	46,55	$> C20$	78,80
Dekanska kiselina	334-48-5	AS	Fluka	60	43/73/129	48,79	$> C20$	9,44
Benzojeva kiselina	65-85-0	99,5	Lach-ner	105	51/77/122	50,37	$> C20$	79,96

AS – analitički standard; nd – nije definirano; RT – vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme); LRI – linearni retencijski indeks

**Tablica 5.** Hlapljivi spojevi analizirani HS-SPME/GC-MS metodom s pripadajućim specifikacijama standarda (čistoća, proizvođač), kvalifikacijskim i kvantifikacijskim parametrima (ciljani (engl. *target*) i kvalifikacijski ioni, vrijeme zadržavanja, linearni retencijski indeks) – nastavak

Spoj	CAS broj	Čistoća	Proizvođač	Ciljani ion	Kvalifikacijski ioni	RT	LRI	Koncentracija ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) za optimizaciju ekstrakcije
<b>Esteri</b>								
Etil-heksanoat	123-66-0	> 99 %	Merck	88	60/99/101	13,67	1231	0,81
Etil-oktanoat	106-32-1	> 98 %	Merck	88	57/101/127	25,30	1433	0,76
Etil-tetradekanoat	124-06-1	AS	Fluka	88	43/101/256	46,36	> C20	0,22
Etil-heksadekanoat	628-97-7	AS	Fluka	88	41/43/101	48,57	> C20	0,52
Etil-benzoat	93-89-0	nd	Etol/IFF	105	77/122/150	37,72	1659	0,77
<b>Aromatski ugljikovodici</b>								
Stiren	100-42-5	99,5	Acros Organics	104	77/78/103	14,65	1249	0,64
Toluen	108-88-3	> 99	Lach-ner	91	65/92	5,55	1032	0,76
<b>Fenoli</b>								
Fenol	108-95-2	99	Lach-ner	94	39/65/66	45,91	> C20	-
2-Metoksi-4-vinilfenol	7786-61-0	AS	Fluka	150	77/107/135	48,08	> C20	71,20
<b>Sumporni spojevi</b>								
Dimetil-disulfid	624-92-0	99	Acros Organics	94	45/46/79	6,50	1064	-
<b>Pirazini</b>								
2-Metilpirazin	109-08-0	> 99	Alfa Aesar	94	39/53/67	15,18	1258	73,26
2-Etilpirazin	13925-00-3	99	Alfa Aesar	107	80/108	18,95	1326	83,95
2,5-Dimetilpirazin	123-32-0	99	Acros Organics	108	39/42/81	18,24	1314	79,99
2,6-Dimetilpirazin	108-50-9	98,5	Sigma-Aldrich	108	39/40/42	18,56	1319	-
2,3,5-Trimetilpirazin	14667-55-1	AS	Fluka	122	39/42/81	22,89	1393	79,20
2-Etil-5-metilpirazin	13360-64-0	nd	Fluorochem	121	56/122	22,21	1381	-
2-Etil-6-metilpirazin				121	39/94/122	21,88	1375	-
<b>Piroli</b>								
2-Acetilpirol	1072-83-9	tehn.	Maybridge	94	39/66/109	45,40	1975	80,92
<b>Furani</b>								
2-Acetilfuran	1192-62-7	99	Acros Organics	95	39/43/110	29,15	1498	78,41
Furfural	98-01-1	99	Sigma-Aldrich	96	39/95	26,96	1461	78,41
2-Furanmetanol	98-00-0	98	Acros Organics	81	53/97/98	38,12	1667	76,44

AS – analitički standard; nd – nije definirano; RT – vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme); LRI – linearni retencijski indeks

### 3.8.1. Optimizacija HS-SPME ekstrakcije

Optimizacija uvjeta ekstrakcije obuhvaćala je ispitivanje utjecaja različitih temperatura (40 °C, 50 °C i 60 °C) i trajanja ekstrakcije (30 min, 45 min i 60 min) na količinu ekstrahiranih spojeva. Kako bi se osigurala prisutnost svih analiziranih spojeva, pri svim ispitivanim uvjetima ekstrakcije uzorku kruha dodana je jednaka poznata količina standarda analiziranih spojeva (prikazano u tablici 5). Rezultati su izraženi u obliku površina analiziranih spojeva po skupinama spojeva. Analiza je pri svim uvjetima provedena u dva ponavljanja.

### 3.8.2. HS-SPME/GC-MS analiza

Analiza profila hlapljivih spojeva arome provedena je u uzorcima kiselog tijesta, krušnog tijesta prije i nakon fermentacije, kruha i kore. Uzorci su do analize čuvani pri -18 °C.

#### HS-SPME ekstrakcija

U staklenu bočicu za uzorak volumena 20 mL odvagano je  $0,25 \pm 0,0001$  g uzorka, dodano je 4,99 mL prethodno pripremljene otopine soli (20 % NaCl (m V<sup>-1</sup>), pH 3 prilagođen 0,05 M limunskom kiselinom) i 10 µL otopine unutarnjeg standarda 1-butanola koncentracije 946 µg mL<sup>-1</sup>. Unutarnji standard odabran je u skladu s Poinot i sur. (2007). Dodan je magnet (15 mm × 6 mm) i bočica je zatvorena krimp čepom (PTFE 3 mm, Macherey-Nagel, Njemačka). Za ekstrakciju je korišteno SPME vlakno CAR/DVB/PDMS, 50/30 µm (Stableflex, Agilent Technologies, SAD) kondicionirano u skladu s uputom proizvođača. Ekstrakcija je provedena tijekom 60 minuta pri 60 °C u termobloku s magnetnom miješalicom (Pierce Reacti-Therm 18971, SAD), uz miješanje brzinom 5 i uravnoteženje 5 minuta prije početka ekstrakcije. SPME ekstrakcija i GC-MS analiza provedene su u minimalno dva ponavljanja za svaki uzorak.

#### GC-MS analiza

Analiza ekstrahiranih spojeva provedena je pomoću plinskog kromatografa (GC System 6890N, Agilent Technologies, SAD) sa spektrometrom masa kao detektorom (Mass Selective Detector 5973 *inert*, Agilent Technologies, SAD) pri sljedećim uvjetima:

Temperatura injektora: 260 °C

Vrijeme desorpcije: 5 min

Vrijeme čišćenja vlakna nakon desorpcije: 2 min

Protok plina u injektoru tijekom desorpcije: 50 mL min<sup>-1</sup>

Način rada injektora: bez razdvajanja protoka (engl. *splitless*)

Liner: Ultra Inert Liner, ravni, 0,75 mm (Agilent Technologies, SAD)

Septa: Premium Inlet Septa, 11 mm (Agilent Technologies, SAD)

Kolona: CP-Wax 52 CB, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Agilent Technologies, SAD)

Temperaturni program: 40 °C, 3 min; 2 °C min<sup>-1</sup> do 105 °C; 5 °C min<sup>-1</sup> do 130 °C; 10 °C min<sup>-1</sup> do 230 °C, 5 min

Trajanje analize: 55,5 min

Pokretna faza: Helij 5,0 (Messer Croatia Plin, Hrvatska)

Protok pokretne faze kroz kolonu: 1 mL min<sup>-1</sup>

Temperatura MS izvor: 230 °C

Temperatura MS kvadrupol: 150 °C

Temperatura AUX: 280 °C

Energija ionizacije: 70 eV

Način snimanja detektora: ukupni ionski kromatogram (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC)

Područje snimanja masa (m z<sup>-1</sup>): 35-350

Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću programa MSD ChemStation G1701DA, verzija D.00.00.38 (Agilent Technologies, SAD). Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektra analiziranog spoja s vremenom zadržavanja i spektrom pripadajućeg standarda te usporedbom spektra analiziranog spoja sa spektrom dostupnim u knjižnicama spektara masa NIST05, WILEY274 i Wiley7Nist05.

GC-MS analiza otopine smjese alkana C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> (~ 40 mg L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, SAD) provedena je pri uvjetima analize uzorka, uz nekoliko modifikacija. Otopina alkana unesena je izravno u injektor, uz način rada injektora s razdvajanjem protoka u omjeru 5 : 1. Analiza je provedena u dva ponavljanja. Linearni retencijski indeks (LRI) izračunat je pomoću jednadžbe:  $LRI(x) = 100 \times z + 100 \times \frac{RT(x) - RT(z)}{RT(z+1) - RT(z)}$ , pri čemu LRI označava linearni retencijski indeks analiziranog spoja x, vrijednost z predstavlja broj ugljikovih atoma alkana s vremenom zadržavanja prije analiziranog spoja x, z+1 broj ugljikovih atoma alkana s vremenom zadržavanja nakon analiziranog spoja x, RT(x) je vrijeme zadržavanja analiziranog

spoja,  $RT(z)$  je vrijeme zadržavanja alkana prije analiziranog spoja  $x$ , a  $RT(z+1)$  odnosi se na vrijeme zadržavanja alkana nakon analiziranog spoja  $x$  (Bianchi i sur., 2007).

### 3.8.3. Validacija metode

Prikladnost metode za namijenjenu svrhu ispitana je određivanjem sljedećih validacijskih parametara – linearnosti, preciznosti (ponovljivosti i međupreciznosti), granice detekcije i granice kvantifikacije.

Linearnost metode ispitana je metodom dodatka standarda u matricu kruha, na od pet do 11 koncentracijskih razina svakog analiziranog spoja, s tri ponavljanja analize na svakoj koncentracijskoj razini u skladu s ICH (2005). Određeni su koncentracijski rasponi područja linearnosti, jednadžba pravca i koeficijent korelacije.

Analiza preciznosti metode uključivala je određivanje ponovljivosti i međupreciznosti u skladu s ICH (2005). Ponovljivost metode određena je analizom matrice kruha s dodatkom standarda analiziranih spojeva na dvije koncentracijske razine unutar raspona kalibracijske krivulje, uz tri ponavljanja analize na svakoj koncentracijskoj razini. Međupreciznost metode određena je analizom matrice kruha s dodatkom standarda analiziranih spojeva na dvije koncentracijske razine unutar raspona kalibracijske krivulje, uz tri ponavljanja analize na svakoj koncentracijskoj razini tijekom tri različita dana analize. Rezultati određivanja ponovljivosti i međupreciznosti izraženi su u obliku relativne standardne devijacije (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD).

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su pomoću standardne devijacije mjerenja pri niskoj koncentraciji analita u skladu s Pawliszyn (2012). Provedeno je sedam ponovljenih mjerenja pri istoj niskoj koncentraciji analita. Standardna devijacija ponovljenih mjerenja pomnožena je s tri za izračun granice detekcije, a s 10 za izračun granice kvantifikacije.

### 3.8.4. Statistička obrada

Pri analizi rezultata primijenjena je ANOVA u kombinaciji s *post hoc* Tukey HSD testom ( $\alpha = 0,05$ ). U 1. fazi istraživanja primijenjena je faktorska ANOVA za ispitivanje utjecaja faze pripreme i vrste uzorka kao dva faktora, dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta kao dva faktora, a u 2. fazi istraživanja jednosmjerna ANOVA za ispitivanje utjecaja dodatka prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Provedena je i analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) rezultata određivanja koncentracije hlapljivih

spojeva arome u kruhu i kori kako bi se utvrdilo koji su spojevi zastupljeniji u cijelom kruhu, a koji u kori kruha. Nadalje, dodatna PCA analiza profila hlapljivih spojeva arome kruha provedena je u svrhu utvrđivanja sličnosti i razlika ovisno o dodatku brašna žutog graška i kiselog tijesta u 1. fazi istraživanja, odnosno razlika ovisno o dodatku kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima u 2. fazi istraživanja. Statistička analiza provedena je pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc, SAD).

### **3.9. HS-SPME/GC-MS analiza akroleina**

#### 3.9.1. Priprema kemikalija i uzoraka

##### Priprema temeljne standardne otopine akroleina

Temeljna standardna otopina akroleina (90 %, stabiliziran s hidrokinonom, Sigma-Aldrich, SAD) koncentracije  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$  s dodatkom 0,2 % ( $\text{m V}^{-1}$ ) hidrokinona (99 %, Kemika, Hrvatska) kao stabilizatora je dnevno svježe pripravljena i čuvana u tamnom posuđu pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  do analize.

##### Priprema kiselog tijesta, krušnog tijesta i kruha za određivanje akroleina

Kiselo tijesto pripravljeno je s integralnim rižinim i prosenim brašnom (1 : 0,2), uz omjer brašna i vode 1 : 1,5. Kao starter kulture ( $10^6 \text{ CFU g}^{-1}$ ) korišteni su bakterijski soj *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 (DSMZ, Njemačka) za koji je poznato da sintetizira reuterin (REF) te *Lactobacillus brevis* DSM 20054 (DSMZ, Njemačka) za koji je poznato da ne sintetizira reuterin (Bauer i sur., 2010b; Engels i sur., 2016), a koji je korišten za pripremu kontrolnog uzorka i matrice za validacijske eksperimente. Kiselo tijesto pripravljeno postupkom opisanim u poglavlju 3.2.1. fermentirano je 16 sati pri optimalnoj temperaturi rasta bakterijskog soja ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$  za *L. reuteri*,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  za *L. brevis*). Krušno tijesto i kruh pripravljeno su bez i s dodatkom kiselog tijesta, prema recepturi bez dodatka brašna žutog graška navedenoj u tablici 2, a prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Kiselo tijesto, krušno tijesto prije i nakon krušne fermentacije te kruh zamrznuti su tekućim dušikom (Messer Croatia Plin, Hrvatska) i čuvani pri  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  do analize. Postupak pripreme kruha proveden je u dva ponavljanja.



### 3.9.2. Odabir uvjeta mikroekstrakcije

Za odabir uvjeta mikroekstrakcije primijenjen je puni faktorski dizajn pokusa. Analiziran je utjecaj dvije temperature ekstrakcije (40 °C i 50 °C) i tri vremena trajanja ekstrakcije (10, 15 i 20 minuta). Analize su provedene na otopinama standarda akroleina (12 µg g<sup>-1</sup>), u dva ponavljanja.

### 3.9.3. HS-SPME/GC-MS analiza

#### HS-SPME ekstrakcija

Za SPME ekstrakciju korišteno je vlakno CAR/DVB/PDMS, 50/30 µm (Stableflex, Agilent Technologies, SAD) kondicionirano u skladu s uputom proizvođača. U staklenu bočicu za uzorak volumena 20 mL odvagano je 0,25 ± 0,0001 g uzorka, dodano je 50 µL otopine unutarnjeg standarda 4-metil-2-pentanol (98 %, Sigma-Aldrich, SAD) koncentracije 1 µg mL<sup>-1</sup> i otopina soli (20 % NaCl (m V<sup>-1</sup>), pH 3 prilagođen 0,05 M limunskom kiselinom) do ukupnog volumena od 5 mL. Dodan je magnet (15 mm × 6 mm), bočica je zatvorena krimp čepom (PTFE 3 mm, Macherey-Nagel, Njemačka) i stavljena u termoblok s magnetnom miješalicom (Pierce Reacti-Therm 18971, SAD) na uravnoteženje tijekom 5 minuta, uz miješanje pri brzini 5. Nakon uravnoteženja, vlakno je izloženo uzorku te je započeta ekstrakcija.

#### GC-MS analiza

Analiza SPME ekstrakta provedena je prema metodi opisanoj u poglavlju 3.8.2. uz nekoliko modifikacija:

Temperatura injektora: 250 °C

Temperaturni program: 37 °C, 3 min; 40 °C min<sup>-1</sup> do 100 °C, 2 min; 40 °C min<sup>-1</sup> do 230 °C; 10 °C min<sup>-1</sup> do 230 °C, 5 min

Trajanje analize: 14,83 min

Temperatura AUX: 250 °C

Način snimanja detektora: odabrani ioni (engl. *Single Ion Monitoring*, SIM)

m z<sup>-1</sup> (ciljani ion\* i kvalifikacijski ioni) – 56,1\* i 55,1 (akrolein); 41,2\*, 45,2 i 69,2 (unutarnji standard)

#### 3.9.4. Validacija metode

Svi validacijski eksperimenti provedeni su pri definiranim optimalnim uvjetima SPME ekstrakcije (40 °C, 20 minuta). Validacijski parametri selektivnost, linearnost, preciznost (ponovljivost i međupreciznost) i stabilnost određeni su u skladu s preporukama ICH (2005), a granica detekcije i kvantifikacije u skladu s Pawliszyn (2012).

Kako bi se ispitaio utjecaj različitih matrica, kalibracijski eksperimenti provedeni su metodom unutarnjeg standarda i metodom dodatka standarda s tri različite matrice – kiselim tijestom, krušnim tijestom i kruhom pripremljenim s kontrolnom starter kulturom *L. brevis* DSM 20054. Poznata koncentracija akroleina dodana je u otopinu soli bez ili s dodatkom 0,25 g matrice uzorka (kiselog tijesta, krušnog tijesta ili kruha). Kalibracijske otopine pripravljene su razrjeđenjem temeljne standardne otopine akroleina. Analiza je provedena na šest koncentracijskih razina u rasponu od 0,012  $\mu\text{g g}^{-1}$  do 0,900  $\mu\text{g g}^{-1}$  za kalibracijsku krivulju bez dodatka matrice i u matrici kiselog tijesta, a devet koncentracijskih razina u rasponu od 0,012  $\mu\text{g g}^{-1}$  do 12,000  $\mu\text{g g}^{-1}$  za kalibracijsku krivulju u matrici krušnog tijesta i kruha, kako bi se pokrio raspon očekivane koncentracije akroleina. Sve analize provedene su u tri ponavljanja. Rezultati određivanja linearnosti izraženi su u obliku omjera površine akroleina i unutarnjeg standarda.

Ponovljivost metode određena je bez i s dodatkom tri različite matrice. Rezultati su izraženi u obliku relativne standardne devijacije tri ponovljena mjerenja na pet koncentracijskih razina unutar linearnog područja metode. Međupreciznost je određena analizom otopine bez dodatka matrice pri dvije koncentracije akroleina (0,012  $\mu\text{g g}^{-1}$  i 0,600  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Rezultati su izraženi u obliku relativne standardne devijacije dva ponovljena mjerenja u tri različita dana analize.

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su metodom izračuna standardne devijacije odziva akroleina pri koncentraciji koja je manja od 10 puta procijenjene granice detekcije. Analiza 0,012  $\mu\text{g g}^{-1}$  akroleina provedena je u 10 ponavljanja. Granica detekcije je izračunata množenjem dobivene standardne devijacije odziva s tri, a granica kvantifikacije s 10.

Kako bi se ispitala stabilnost akroleina u temeljnoj standardnoj otopini, provedena je analiza nakon 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 i 92 sata skladištenja u mraku pri 4 °C. Pri analizi je 12  $\mu\text{g g}^{-1}$  akroleina dodano u 5 mL otopine za analizu. Mjerenja su provedena u dva ponavljanja.

U svrhu određivanja linearnosti metode, provedena je regresijska analiza u programu MS Excel 2016. U svrhu definiranja optimalnih uvjeta SPME ekstrakcije i stabilnosti otopine

akroleina, provedena je analiza varijance (ANOVA), uz *post hoc* Tukey HSD test ( $\alpha = 0,05$ ) u programu Statistica 10.

### **3.10. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta**

Određivanje koncentracije slobodnih ukupnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta provedeno je u liofiliziranim uzorcima kiselog tijesta i kruha. Analizirani su uzorci različiti s obzirom na dodatak brašna žutog graška i kiselog tijesta (1. faza istraživanja).

Pri ekstrakciji i određivanju udjela slobodnih fenolnih spojeva i određivanju antioksidativnog kapaciteta korištene su sljedeće kemikalije: metanol (Ultra gradient HPLC grade, J. T. Baker, SAD), etanol (apsolutni, J. T. Baker, SAD), ledena octena kiselina (99,5 %, Macron, SAD), etil-acetat ( $\geq 99,9$  %, Carlo Erba, Francuska), Folin-Ciocalteu reagens (2 M, Sigma, SAD), natrijev karbonat ( $> 99$  %, Gram-Mol, Hrvatska), DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Aldrich, SAD), željezov (III) klorid heksahidrat ( $> 99$  %, Kemika, Hrvatska), TPTZ – 2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazin (98 %, Alfa Aesar, SAD), klorovodična kiselina (34-37 %, Carlo Erba, Francuska), natrijev acetat trihidrat (99,5 %, Lachner, Češka), Troloks – 6-hidroksi-2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina (97 %, Aldrich, SAD), ferulinska kiselina (99 %, Acros Organics, Belgija), protokatehinska kiselina (97 %, Sigma-Aldrich, Njemačka), 4-hidroksibenzojeva kiselina (99 %, Sigma-Aldrich, Njemačka), vanilinska kiselina (97 %, Sigma-Aldrich, Njemačka), acetonitril (Carlo Erba, Francuska).

#### **3.10.1. Liofilizacija uzoraka tijesta i kruha**

Zamrznuti uzorci odvagani su u Petrijeve zdjelice (oko 30 g tijesta i 20 g kruha po zdjelici) i stavljeni u zamrzivač na  $-80$  °C minimalno 2 sata prije liofilizacije. Liofilizacija je provedena u liofilizatoru Alpha 1-4 LSCplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Njemačka) pri temperaturi polica  $20$  °C, temperaturi kondenzatora  $-55$  °C, minimalnom tlaku 1 mbar, u trajanju od 18 do 22 sata. Liofilizirani uzorci samljeveni su u laboratorijskom mlinu (First FA-5482, Austrija) i čuvani pri  $-18$  °C do analize.

### 3.10.2. Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva

Ekstrakcija slobodnih fenolnih spojeva provedena je prema metodi Li i sur. (2009), u dva ponavljanja za svaki uzorak. Izvagano je  $0,25 \pm 0,0001$  g liofiliziranog uzorka u plastičnu epruvetu volumena 1,5 mL. Dodan je 1 mL 80 % etanola, uzorak je homogeniziran pomoću vrtložne miješalice (vorteks, IKA MS3 basic, Njemačka) i stavljen u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex RK 100 H, Njemačka) tijekom 10 minuta. Zatim je uzorak centrifugiran (Thermo Scientific Micro CL 21, Njemačka) pri  $8000 \text{ o min}^{-1}$  tijekom 15 minuta, supernatant je odvojen i ekstrakcija je ponovljena još dva puta, uz dodatak  $800 \mu\text{L}$  80 % etanola. Svi supernatanti spojeni su i upareni do suhog pod strujom dušika 4,6 (Messer Croatia Plin, Hrvatska), uz zagrijavanje na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uparenom ekstraktu dodano je  $500 \mu\text{L}$  2 % octene kiseline te je homogeniziran 30 sekundi pomoću vrtložne miješalice. Zatim je dodano  $500 \mu\text{L}$  etil-acetata, homogenizirano 30 sekundi pomoću vrtložne miješalice i centrifugirano pri  $14000 \text{ o min}^{-1}$  tijekom 15 minuta. Nakon centrifugiranja odvojena je etil-acetatna frakcija i ekstrakcija s etil-acetatom ponovljena je još dva puta. Svi etil-acetatni ekstrakti spojeni su i upareni do suhog pod strujom dušika, uz zagrijavanje na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Suhi ekstrakti čuvani su pri  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  do analize. Prije analize, pripremljeni ekstrakti otopljeni su u  $200 \mu\text{L}$  metanola i centrifugirani pri  $14000 \text{ o min}^{-1}$  tijekom 5 minuta.

### 3.10.3. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva (engl. *Total Phenolic Content*, TPC) provedeno je uz primjenu Folin-Ciocalteu reagensa, modificiranom metodom prema Yu i sur. (2002). U mikrokivetu je otpipetirano  $200 \mu\text{L}$  destilirane vode,  $10 \mu\text{L}$  ekstrakta uzorka i  $50 \mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute dodano je  $150 \mu\text{L}$  20 % natrijevog karbonata,  $580 \mu\text{L}$  destilirane vode i sadržaj kivete je promućkan. Vrijeme reakcije mjereno je od trenutka dodatka Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 2 sata stajanja u mraku pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija pri  $765 \text{ nm}$  pomoću UV/VIS spektrofotometra (UNICAM Helios  $\beta$ , Engleska). Pri određivanju apsorbancije slijepe probe je u reakciju, umjesto  $10 \mu\text{L}$  ekstrakta uzorka, dodano  $10 \mu\text{L}$  metanola. Mjerenje je provedeno u minimalno dva ponavljanja za svaki uzorak. Za kvantifikaciju ukupnih fenolnih spojeva korištena je kalibracijska krivulja izrađena pomoću otopina ferulinske kiseline u metanolu, u rasponu koncentracija ferulinske kiseline od  $49 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $859 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Mjerenja su provedena na devet koncentracijskih razina, uz tri ponavljanja na svakoj koncentracijskoj razini. Jednadžba kalibracijske krivulje bila je  $y = 0,0007 x + 0,0054$ , uz koeficijent korelacije  $r = 0,9999$ .

Rezultati su izraženi u obliku  $\mu\text{g}$  ekvivalenata ferulinske kiseline (FAE) po g suhe tvari uzorka.

#### 3.10.4. DPPH metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta

U mikrokivetu je otpipetirano 25  $\mu\text{L}$  ekstrakta uzorka, 0,95 mL svježe pripremljene 0,06 mM otopine DPPH u metanolu i sadržaj kivete je promućkan. Vrijeme reakcije mjereno je od trenutka dodatka DPPH reagensa. Nakon 30 minuta stajanja u mraku pri sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija pri 517 nm pomoću UV/VIS spektrofotometra (UNICAM He $\lambda$ ios  $\beta$ , Engleska). Pri određivanju apsorbancije slijepe probe je u reakciju, umjesto 25  $\mu\text{L}$  ekstrakta uzorka, dodano 25  $\mu\text{L}$  metanola. Mjerenje je provedeno u minimalno dva ponavljanja za svaki uzorak. Za kvantifikaciju antioksidativnog kapaciteta korištena je kalibracijska krivulja izrađena pomoću otopina Troloksa u metanolu, u rasponu koncentracija Troloksa od 0,10  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  do 0,99  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  (Belščak i sur., 2009; Brand-Williams i sur., 1995). Mjerenja su provedena na sedam koncentracijskih razina, uz tri ponavljanja na svakoj koncentracijskoj razini. Jednadžba kalibracijske krivulje bila je  $y = 0,6172 x + 0,0071$ , uz koeficijent korelacije  $r = 0,9998$ . Rezultati su izraženi u obliku  $\mu\text{mol}$  ekvivalenata Troloksa (TE) po g suhe tvari uzorka.

#### 3.10.5. FRAP metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta

FRAP reagens (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*) pripremljen je s 20 mM željezovim (III) kloridom heksahidratom, 10 mM TPTZ-om u 40 mM klorovodičnoj kiselini i 300 mM acetatnim puferom (za pripremu korišten natrijev acetat trihidrat i ledena octena kiselina) u omjeru volumnih udjela 1 : 1 : 10. U mikrokivetu je otpipetirano 10  $\mu\text{L}$  ekstrakta uzorka, 1 mL FRAP reagensa i sadržaj kivete je promućkan. Vrijeme reakcije mjereno je od trenutka dodatka FRAP reagensa. Nakon 4 minute reakcije, izmjerena je apsorbancija pri 593 nm pomoću UV/VIS spektrofotometra (UNICAM He $\lambda$ ios  $\beta$ , Engleska). Pri određivanju apsorbancije slijepe probe je u reakciju, umjesto 10  $\mu\text{L}$  ekstrakta uzorka, dodano 10  $\mu\text{L}$  metanola. Mjerenje je provedeno u minimalno dva ponavljanja za svaki uzorak. Za kvantifikaciju antioksidativnog kapaciteta korištena je kalibracijska krivulja izrađena pomoću otopina Troloksa u metanolu, u rasponu koncentracija Troloksa od 0,40  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  do 3,20  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  (Belščak i sur., 2009; Benzie i Strain, 1996). Mjerenja su provedena na osam koncentracijskih razina, uz tri ponavljanja na svakoj koncentracijskoj razini. Jednadžba

kalibracijske krivulje bila je  $y = 0,3613 x + 0,0004$ , uz koeficijent korelacije  $r = 0,9998$ . Rezultati su izraženi u obliku  $\mu\text{mol}$  ekvivalenata Troloksa po g suhe tvari uzorka.

### 3.10.6. HPLC metoda za određivanje fenolnih kiselina

Koncentracija fenolnih kiselina u ekstraktu slobodnih fenolnih spojeva određena je prema modificiranoj HPLC metodi (IOOC - International Olive Oil Council, 2009). Analiza je provedena pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC Agilent 1200 Series, Agilent, SAD) s detektorom s nizom dioda (G1315D, Agilent, SAD) i kolonom Fortis Universil HS C18, 250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Fortis Technologies, Engleska) pri sljedećim kromatografskim uvjetima:

Termostat za uzorke: 4 °C

Volumen uzorka injektiran na kolonu: 20  $\mu\text{L}$

Trajanje analize: 41 min

Pokretna faza: A – 2 % octena kiselina, B – metanol : acetonitril = 1 : 1

0 min – 96 % A, 4 % B; 41 min – 50 % A, 50 % B

Protok pokretne faze: 1 mL  $\text{min}^{-1}$

Valna duljina: 280 nm

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja i UV-VIS spektra analiziranog spoja s vremenom zadržavanja i spektrom pripadajućeg standarda. Za kvantifikaciju fenolnih kiselina primijenjena je metoda vanjskog standarda. Kalibracijske krivulje izrađene su pomoću dobivenih površina pikova analita (y) i njihovih poznatih koncentracija u otopinama standarda (x). HPLC analiza provedena je u dva ponavljanja na devet koncentracijskih razina. U tablici 6 prikazani su parametri kvalifikacije i kvantifikacije fenolnih kiselina. Rezultati su izraženi u obliku  $\mu\text{g}$  fenolne kiseline po g suhe tvari uzorka.

**Tablica 6.** Parametri kvalifikacije i kvantifikacije fenolnih kiselina HPLC-DAD metodom

Fenolna kiselina	Vrijeme zadržavanja (min)	Koncentracijski raspon ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Jednadžba kalibracijske krivulje	Koeficijent korelacije (r)
protokatehinska	12,27	0,33 – 33,22	$y = 19,067 x - 0,812$	0,9998
4-hidroksibenzojeva	18,77	0,43 – 43,07	$y = 18,671 x + 0,017$	0,9998
vanilinska	22,10	0,40 – 39,77	$y = 19,045 x - 0,970$	0,9998
ferulinska	28,75	1,22 – 121,77	$y = 13,547 x - 3,149$	0,9998

### 3.10.7. Statistička obrada

Pri analizi rezultata ispitivanja utjecaja dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta (2 faktora) primijenjena je faktorska ANOVA u kombinaciji s *post hoc* Tukey HSD testom ( $\alpha = 0,05$ ). Provedena je i analiza korelacije koncentracije slobodnih ukupnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i antioksidativnog kapaciteta, uz  $\alpha = 0,05$ . Statistička analiza provedena je pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc, SAD).

## 3.11. Metode određivanja fizikalnih svojstava kruha

Analiza fizikalnih svojstava kruha provedena je u okviru definiranja optimalnog udjela dodanog kiselog tijesta u kruh s optimalnim dodatkom prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima u 3. fazi istraživanja te u okviru određivanja trajnosti polupečenog kruha u 4. fazi istraživanja.

### 3.11.1. Specifični volumen kruha

Masa kruha određena je na tehničkoj vagi (Kern KB 2000-2N, Njemačka) 1,5 sat nakon pečenja. Volumen kruha određen je metodom nasipanja uljane repice (AACC 10-05.01). Mjerenje mase i volumena provedeno je u četiri ponavljanja za svaki uzorak. Specifični volumen kruha izražen je kao omjer volumena i mase kruha ( $\text{mL g}^{-1}$ ).

### 3.11.2. Određivanje boje kore i sredine kruha

Boja kore i sredine kruha određena je pomoću kolorimetra (Spectrophotometer CH-3500 D, Konica Minolta, Japan) i pripadajućeg programa (Spectramagic NX, Konica-Minolta, Japan), na principu mjerenja stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine. Prije početka mjerenja kolorimetar je kalibriran s bijelim standardom (refleksija 100 %) te crnim valjkom (refleksija 0 %). Pri mjerenju je korištena maska s otvorom 30 mm. Uzorak je postavljen iznad otvora tako da ga u potpunosti pokriva te je pokriven tamnom kutijom. Mjerenja boje gornje i donje kore kruha provedena su u četiri ponavljanja, a sredine kruha u 12 ponavljanja za svaki uzorak. Rezultati su izraženi pomoću parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  CIELAB prostora boja. Parametar  $L^*$  je približna mjera svjetline, prema kojoj svaka boja može biti klasificirana na skali između crne (0) i bijele (100). Parametar  $a^*$  obuhvaća crvenu (pozitivne vrijednosti) i zelenu boju (negativne vrijednosti), a parametar  $b^*$  žutu (pozitivne vrijednosti) i plavu boju

(negativne vrijednosti) (Pathare i sur., 2013). Ukupna promjena boje ( $\Delta E$ ) izračunata je prema jednadžbi  $\Delta E = \sqrt{\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2}$  (Adekunte i sur., 2010).

### 3.11.3. Određivanje teksture sredine kruha

Tekstura sredine kruha određena je pomoću analizatora teksture TA.HDplus (Stable Micro Systems, Velika Britanija), uz primjenu TPA testa (engl. *Texture Profile Analysis*) s dvostrukom kompresijom. Pri mjerenju je korištena aluminijska sonda promjera 25 mm i ćelija s opterećenjem od 5 kg. Analiza je provedena pri sljedećim uvjetima: brzina sonde prije, tijekom i nakon testa  $2 \text{ mm s}^{-1}$ , naprezanje (engl. *strain*) 50 %, vrijeme testa 30 s, snaga okidača (engl. *trigger force*) 20 g. Analiza teksture provedena je 1,5 sati nakon pečenja kruha. Neposredno prije analize kruh je narezan na komade debljine 12,5 mm pomoću rezalice (Gorenje R504N/01 tip AS8ST, Slovenija) te je nožem uklonjena kora. Pri analizi su na stalak analizatora teksture stavljena dva komada kruha, čime je postignuta ukupna debljina kruha od 25 mm. Mjerenje je za svaki uzorak provedeno u šest ponavljanja. Rezultati analize obrađeni su pomoću računalnog programa Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems, Velika Britanija) i izraženi kao tvrdoća, elastičnost, rezilijencija, kohezivnost i žvackljivost sredine kruha.

### 3.11.4. Statistička obrada

Pri analizi rezultata primijenjena je jednosmjerna ANOVA u kombinaciji s *post hoc* Tukey HSD testom ( $\alpha = 0,05$ ) pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc, SAD).

## 3.12. Metoda određivanja sastava atmosfere u pakovini

Sastav atmosfere u pakovini određen je pomoću plinskog analizatora (OXIBABY 6.0 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, WITT Gasetechnik, Njemačka). Tankom iglom uređaja probušeno je pakiranje te je nakon nekoliko sekundi na zaslonu plinskog analizatora očitani udjeli O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>. Analiza sastava atmosfere u pakiranju provedena je u četiri ponavljanja za svaki uzorak. Statistička značajnost razlike u udjelu plinova u pakovini određena je primjenom jednosmjerne analize varijance u kombinaciji s *post hoc* Tukey HSD testom ( $\alpha = 0,05$ ) pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc, SAD).



### **3.13. Određivanje mikrobiološke ispravnosti kruha**

Pri određivanju mikrobiološke ispravnosti kruha korištene su sljedeće kemikalije: Yeast Malt Broth (Sigma-Aldrich, SAD), tripton (Biolife, Italija), kvašćev ekstrakt (Biolife, Italija), D(+)-glukoza (Fluka, Švicarska), agar (Liofilchem, Italija), cikloheksimid (Sigma-Aldrich, SAD) i oksitetraciklin.

Mikrobiološka analiza polupečenog kruha obuhvaćala je određivanje plijesni metodom ICC No. 139, aerobnih mezofilnih bakterija metodom ICC No. 125 i aerobnih sporogenih bakterija metodom ICC No. 144. U sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu izvagano je  $10 \pm 0,01$  g uzorka, dodano je 90 mL sterilne vode te je uzorak stavljen na homogenizaciju na magnetnoj miješalici (IKA RT 5, Njemačka) tijekom 20 minuta, uz brzinu miješanja 3 ( $\sim 180$  o  $\text{min}^{-1}$ ). Tako pripremljena suspenzija korištena je za pripremu decimalnih razrjeđenja pri određivanju plijesni i aerobnih mezofilnih bakterija. Pri određivanju aerobnih sporogenih bakterija je 10 mL pripremljene suspenzije uzorka preneseno u sterilnu epruvetu i zagrijavano na  $80$  °C tijekom 10 minuta. Po završetku zagrijavanja sadržaj epruvete ohlađen je pod mlazom vode na sobnu temperaturu te je dobivena suspenzija korištena za pripremu decimalnih razrjeđenja.

Pri određivanju plijesni korištena je sterilna hranjiva podloga Yeast Malt Agar pripremljena prema uputi proizvođača, uz dodatak oksitetraciklina (1 %,  $\text{m V}^{-1}$ ) za sprječavanje rasta bakterija. Nacijepljene ploče inkubirane su u termostatu (Memmert 100-800, Njemačka) pri  $25$  °C tijekom 120 sati. Pri određivanju aerobnih mezofilnih i sporogenih bakterija korištena je sterilna hranjiva podloga Plate Count Agar (PCA) pripremljena prema uputi proizvođača, uz dodatak cikloheksimida (0,1 %) za sprječavanje rasta kvasaca i plijesni. Nacijepljene ploče inkubirane su pri  $30$  °C tijekom 72 sata. Svaka analiza provedena je na tri decimalna razrjeđenja u dva ponavljanja. Nakon inkubacije ploča prebrojane su porasle kolonije na pločama (pri određivanju plijesni na pločama s od 20 do 100 kolonija, aerobnih mezofilnih bakterija na pločama s od 30 do 300 poraslih kolonija, aerobnih sporogenih na pločama s minimalno 15 poraslih kolonija) te su rezultati izraženi u obliku srednje vrijednosti  $\text{CFU g}^{-1}$ .

Uz provedbu mikrobiološke analize, uzorci su svaki dan tijekom skladištenja vizualno pregledani u svrhu utvrđivanja vidljivog porasta plijesni.

### **3.14. Senzorske analize**

Senzorske analize kruha provedene su u senzorskom laboratoriju Laboratorija za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji, u skladu s normama ISO 6658:2017 i ISO 8589:2007. Za

„odmaranje“ olfaktornih receptora panelistima su poslužena zrnca kave, a za ispiranje usta vodovodna voda. Pri svakoj senzorskoj analizi uzorci su bili označeni troznamenkastim kodovima. U deskriptivnom testu korištena je ljestvica intenziteta od 0 do 10 prema Heitmann i sur. (2017), a u hedonističkom testu ljestvica ocjena sviđanja od 1 do 9 prema Hager i sur. (2012). U senzorskoj analizi sudjelovali su zaposlenici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Senzorska analiza uzoraka različitih prema dodatku brašna žutog graška i kiselog tijesta (1. faza istraživanja) te uzoraka različitih prema dodatku kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (2. faza istraživanja) obuhvaćala je deskriptivnu i hedonističku analizu mirisa sredine i kore te arome kruha. Senzorska analiza uzoraka različitih prema dodanom udjelu kiselog tijesta (3. faza istraživanja) obuhvaćala je deskriptivnu i hedonističku analizu mirisa sredine i kore te arome kruha, deskriptivnu analizu izgleda i teksture kruha, hedonističku analizu sveukupnog doživljaja i test nizanja po preferenciji.

### 3.14.1. Senzorska analiza mirisa kruha

#### 3.14.1.1. Razvoj testa za deskriptivnu analizu mirisa kruha

Razvoj testa za senzorsku analizu mirisa kruha obuhvaćao je uvodnu senzorsku analizu za prepoznavanje atributa mirisa i tri rasprave panelista u svrhu definiranja ključnih atributa mirisa, pripadajućih asocijacija i njihovih intenziteta. Uvodnoj senzorskoj analizi za prepoznavanje atributa mirisa pristupio je 21 panelist (20 žena i jedan muškarac, od 26 do 54 godine). Panelistima su poslužena četiri različita uzorka kruha (kora i sredina zasebno) – pšenični bijeli kruh (Pan-pek, Hrvatska) i kukuruzni miješani kruh (Pan-pek, Hrvatska) kao primjeri „uobičajenog“ kruha te nedovoljno pečen (10 minuta) i prepečen (20 minuta) bezglutenski kruh kao primjeri ekstremnih atributa mirisa. Pripremljeni uzorci prikazani su na slici 4.



**Slika 4.** Set uzoraka kruha korišten za prepoznavanje atributa mirisa pri razvoju testa za deskriptivnu senzorsku analizu (vlastita fotografija)

Od panelista je traženo da pomirišu uzorke i navedu sve atribute mirisa koje u njima osjete. Cilj uvodne senzorske analize bio je definirati koje sve atribute mirisa panelisti osjete u kruhu sličnom onom kakav će biti analiziran u ovom istraživanju. Pomoću definiranog popisa svih atributa mirisa, tijekom rasprava panelista definirani su ključni atributi mirisa ciljanog kruha. U svrhu definiranja ključnih atributa mirisa, pripadajućih asocijacija i njihovih intenziteta provedene su tri rasprave panelista. Cilj prve i druge rasprave bio je, na temelju rezultata provedene uvodne senzorske analize, definirati ključne atribute mirisa i dodijeliti im odgovarajuće asocijacije. U raspravama je sudjelovalo od 13 do 18 panelista. Panelistima su posluženi isti uzorci kao i na uvodnoj senzorskoj analizi. Osim uzoraka, panelistima su posluženi prijedlozi asocijacija atributa mirisa radi povezivanja određenog atributa mirisa s pripadajućom terminologijom i intenzitetom. Panelisti su pomirisali uzorke kruha, a potom uz vodstvo raspravljali o atributima mirisa zabilježenim na uvodnoj senzorskoj analizi sa svrhom definiranja ključnih atributa mirisa, razvijanja odgovarajuće terminologije i definiranja pripadajućih asocijacija. Cilj treće rasprave bio je definirati intenzitete atributa mirisa pripremljenih asocijacija u kojem je sudjelovalo sedam panelista. Panelisti su nakon mirisanja asocijacija zasebno odredili intenzitet atributa mirisa na ljestvici od 0 do 10, potom su uz vodstvo raspravljali i zajednički donijeli odluku o konačnom intenzitetu atributa mirisa svake asocijacije. U tablici 7 nalazi se konačni opis asocijacija i pripadajućih intenziteta, a na slici 5 pripremljene asocijacije atributa mirisa.

**Tablica 7.** Asocijacije za atribute mirisa kruha i pripadajući intenziteti korišteni pri deskriptivnoj analizi

Mirisni atribut	Asocijacija	Intenzitet
Po svježem pečenom kruhu	Kora svježeg pečena kruha	10/10
Po kvascu	5 % svježeg kvasca u vodi	10/10
Po sirovom tijestu	Tijesto za pripremu kruha	10/10
Po kukuruzu	20 % kukuruzne krupice u toploj vodi	9/10
Po kikirikiju	Oljušteni kikiriki	8/10
Po grašku	20 % brašna žutog graška u toploj vodi	10/10
Po prženom šećeru	Karamelizirani šećer	7/10
Po kokicama	Svježeg kokice	10/10
Po kuhanoj riži	20 % riže u toploj vodi	10/10
Po masnom	Zagrijana biljna mast	9/10
Po zagorenom	Izgoreni pšenični kruh	8/10

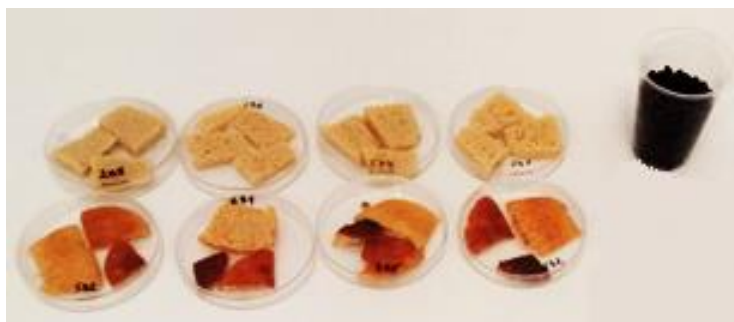


**Slika 5.** Asocijacije atributa mirisa kruha korištene pri deskriptivnoj senzorskoj analizi (vlastita fotografija)

### 3.14.1.2. Provođenje senzorske analize mirisa uzoraka kruha

Od panelista je prije senzorske analize uzoraka traženo da se prisjete atributa mirisa i njihovih intenziteta mirisanjem pripremljenih asocijacija. Asocijacije za atribute mirisa (slika 5) pripremljene su neposredno prije senzorske analize, a opis pripreme i pripadajući intenziteti nalaze se u tablici 7. Senzorska analiza provedena je u periodu od 1,5 do 3 sata nakon pečenja kruha. Za serviranje je korištena jedna četvrtina kruha. Gornja, bočna i donja kora su odvojene od sredine, a sredina je narezana na komade debljine oko 1 cm. Panelistima je u Petrijevim zdjelicama posluženo od četiri do šest uzoraka sredine i kore kruha. Test kojeg su panelisti ispunjavali sastojao se od dva dijela: deskriptivnog testa i hedonističkog testa. U deskriptivnom dijelu testa od panelista je traženo da ocijene intenzitet svakog pojedinog

atributa mirisa na ljestvici od 0 do 10 (0 – izostanak intenziteta, 10 – najjači intenzitet), s mogućnošću izražavanja ocjene intenziteta na jednu decimalu. Kod hedonističkog dijela testa od panelista je traženo da ocijene sviđanje mirisa uzoraka na ljestvici od 1 do 9, pri čemu je opis ocjena bio točno definiran (1 – izrazito mi se ne sviđa, 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa, 9 – izrazito mi se sviđa), s mogućnošću izražavanja ocjene u obliku cijelog broja. Hedonistički test mirisa kruha proveden je u skladu sa Svensson (2012). Primjer testova nalazi se u prilogima 1 i 2, a na slici 6 prikazan je primjer postavljene senzorske analize.



**Slika 6.** Primjer postavljene senzorske analize mirisa kruha (vlastita fotografija)

Rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti ocjena intenziteta pojedinog atributa mirisa izračunate za svaki uzorak.

U senzorskoj analizi mirisa uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima sudjelovalo je 15 treniranih panelista (14 žena, jedan muškarac, od 26 do 54 godine), a analiza je provedena u dva ponavljanja. U senzorskoj analizi mirisa uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška i udjelu dodanog kiselog tijesta sudjelovalo je 14 treniranih panelista (13 žena, jedan muškarac, od 27 do 56 godina), a analiza je provedena u jednom ponavljanju.

### 3.14.2. Senzorska analiza arome kruha

#### 3.14.2.1. Razvoj testa za deskriptivnu analizu arome kruha

Razvoj testa za deskriptivnu analizu arome kruha obuhvaćao je uvodnu senzorsku analizu za prepoznavanje atributa arome te četiri rasprave za definiranje ključnih atributa arome, pripadajućih asocijacija i njihovih intenziteta. U uvodnoj senzorskoj analizi sudjelovalo je 13 panelista (12 žena i jedan muškarac, od 26 do 55 godina). Panelistima su poslužena četiri različita uzorka kruha u kojima su trebali prepoznati što više atributa arome. Uzorci koji su im prezentirani bili su: pšenični polubijeli *baguette rustique* (Dubravica, Hrvatska) i kukuruzni

kruh delikates (Dubravica, Hrvatska) kao primjeri „uobičajenog“ kruha te bezglutenski kruh pripremljen bez i s dodatkom brašna žutog graška. Pripremljeni uzorci prikazani su na slici 7.



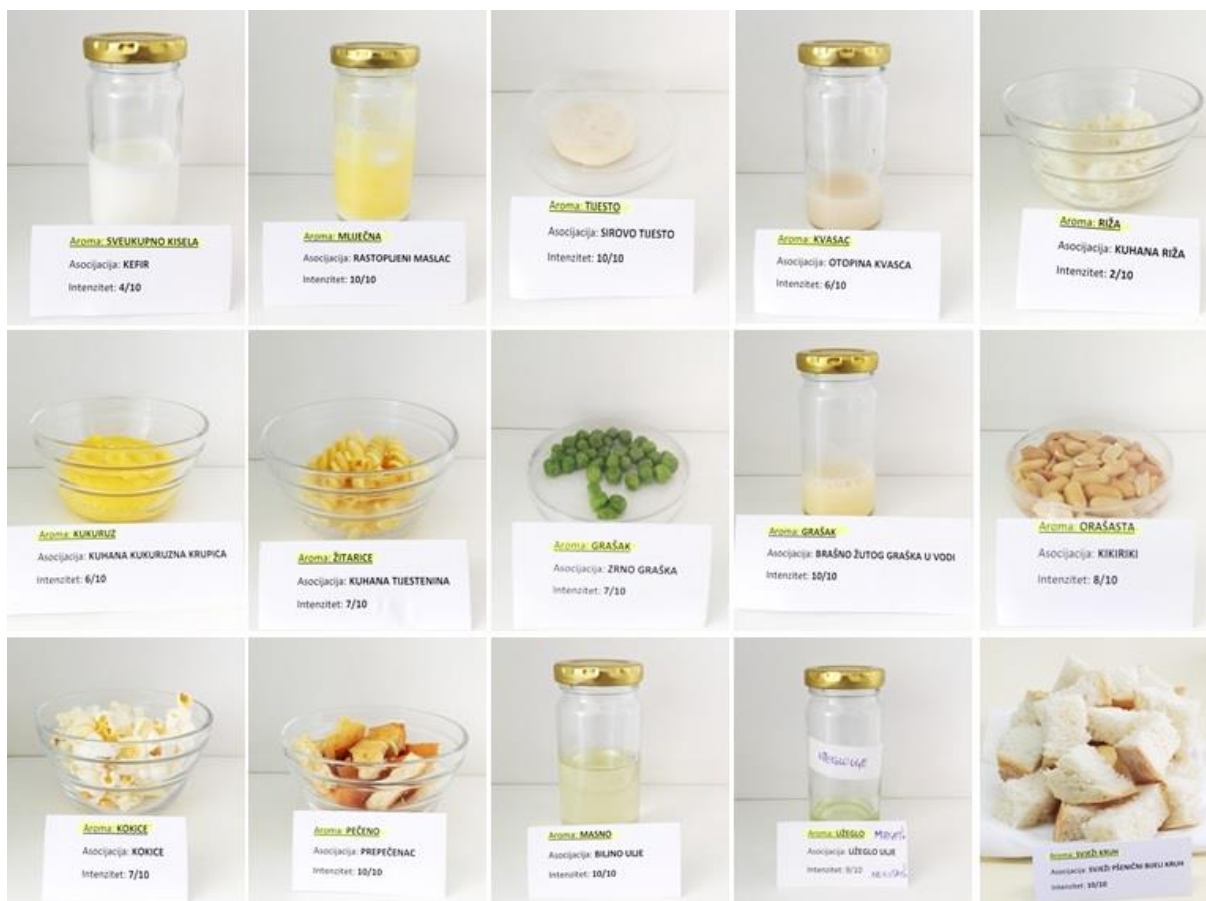
**Slika 7.** Set uzoraka kruha korišten za prepoznavanje atributa arome pri razvoju testa za deskriptivnu senzorsku analizu (vlastita fotografija)

Cilj uvodne senzorske analize bio je definirati koje sve atribute arome panelisti osjete u kruhu sličnom onom kakav će biti analiziran u ovom istraživanju. Pomoću definiranog popisa svih atributa arome, tijekom rasprava panelista definirani su ključni atributi arome ciljanog kruha. U svrhu definiranja ključnih atributa arome kruha, pripadajućih asocijacija i njihovih intenziteta provedene su četiri rasprave panelista. U provedenim raspravama sudjelovalo je od 11 do 14 panelista. Cilj prve tri rasprave bio je, na temelju rezultata provedene uvodne senzorske analize, definirati ključne atribute arome i dodijeliti im odgovarajuće asocijacije. Panelistima su posluženi sljedeći uzorci: pšenični polubijeli *baguette rustique* (Dubravica, Hrvatska), kukuruzni kruh delikates (Dubravica, Hrvatska) i bezglutenski kruh pripremljen s dodatkom brašna žutog graška i kiselog tijesta te prijedlozi asocijacija za atribute arome. Panelisti su kušali uzorke kruha, a potom raspravljali o atributima arome zabilježenim na uvodnoj senzorskoj analizi sa svrhom definiranja ključnih atributa arome, razvijanja odgovarajuće terminologije i definiranja pripadajućih asocijacija. Cilj zadnje rasprave bio je definirati intenzitete atributa arome pripremljenih asocijacija. Panelisti su nakon kušanja navedenih asocijacija zasebno odredili intenzitet atributa arome na ljestvici od 0 do 10, potom su međusobno raspravljali i zajednički donijeli odluku o konačnom intenzitetu atributa arome svake asocijacije. U tablici 8 nalazi se opis asocijacija atributa arome i pripadajućih intenziteta, a na slici 8 pripremljene asocijacije atributa arome. Trening za pamćenje intenziteta osnovnih okusa proveden je u dva dodatna termina.

**Tablica 8.** Atributi arome kruha, pripadajuće definicije, asocijacije i intenziteti korišteni u deskriptivnoj senzorskoj analizi

Atribut		Definicija	Asocijacija	Intenzitet
Okus	<b>Slatko</b>	Osnovni okus	Saharoza (2 %, 5 %, 10 %)*	2, 5, 10/10
	<b>Slano</b>	Osnovni okus	Natrijev klorid (0,2 %, 0,35 %, 0,5 %)*	2, 5, 10/10
	<b>Kiselo</b>	Osnovni okus	Limunska kiselina (0,05 %, 0,08 %, 0,15 %)*	2, 5, 10/10
	<b>Gorko</b>	Osnovni okus	Kofein (0,05 %, 0,08 %, 0,15 %)*	2, 5, 10/10
Aroma	<b>Sveukupna kisela aroma</b>	Sveukupna aroma povezana s kiselim (mliječno, citrusno, jabučno, octeno kiselo)	Kefir	4/10
	<b>Mliječna aroma</b>	Aroma povezana s rastopljenim maslacem	Rastopljeni maslac	10/10
	<b>Tijesto</b>	Vlažna aroma nepečenog tijesta	Sirovo tijesto	10/10
	<b>Kvasac</b>	Aroma kvasca	5 % svježeg kvasca u vodi	6/10
	<b>Riža</b>	Aroma kuhane riže	Kuhana riža	2/10
	<b>Kukuruz</b>	Aroma kuhanog kukuruza	Kuhana kukuruzna krupica	6/10
	<b>Žitarice</b>	Lagana, škrobasta aroma kuhanih žitarica	Kuhana tjestenina	7/10
	<b>Graškasto</b>	Graškasta, zelena aroma	20 % brašna žutog graška u vodi	10/10
	<b>Orašasto</b>	Orašasta aroma kikirikija	Zrno graška, sirovo	7/10
	<b>Prašnjavo, zagušljivo</b>	Aroma povezana sa suhim zatvorenim prostorima (tavan, ormar), stara knjiga	Oljušteni kikiriki	8/10
	<b>Kokice</b>	Aroma svježe pečenih kokica	Stara knjiga	8/10
	<b>Pečeno</b>	Smeđa aroma pečenog	Kokice	7/10
	<b>Masno</b>	Aroma povezana s masnim	Prepečenac	10/10
	<b>Užeglo</b>	Aroma užeglog ulja	Biljno ulje	10/10
	<b>Svježi kruh</b>	Aroma svježe pečenog pšeničnog kruha	Užeglo ulje	9/10
Okus, aroma	Naknadni gorki okus	Gorki okus koji zaostaje nakon kušanja	Kora i sredina svježeg kruha	10/10
	Naknadna aroma graška	Aroma graška koja zaostaje nakon kušanja		

\* Pripremljeno prema univerzalnoj ljestvici intenziteta (Kemp i sur., 2018)



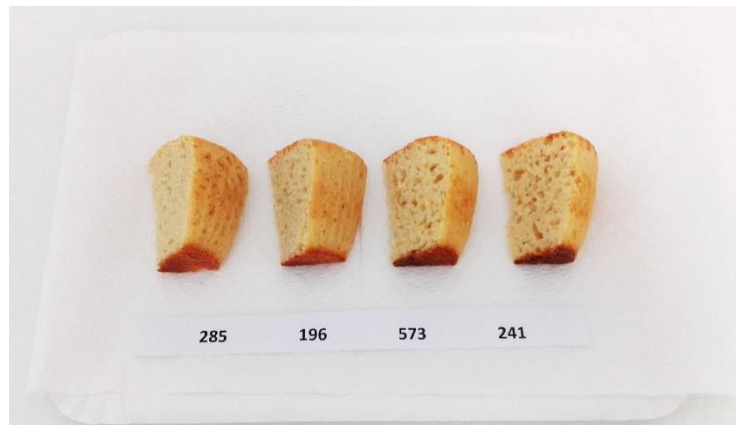
**Slika 8.** Asocijacije atributa arome kruha korištene pri deskriptivnoj senzorskoj analizi (vlastita fotografija)

### 3.14.2.2. Provođenje senzorske analize arome uzoraka kruha

Od panelista je prije senzorske analize uzoraka traženo da se prisjete atributa arome i njihovih intenziteta kušanjem pripremljenih asocijacija, uz obaveznu pauzu 15 minuta između kušanja asocijacija i kruha. Asocijacije atributa arome pripremljene su 1 sat prije početka senzorske analize, a opis pripreme i pripadajući intenziteti se nalaze u tablici 8. Senzorska analiza provedena je u periodu od 1 do 3 sata nakon pečenja kruha. Panelistima je posluženo od četiri do šest uzoraka kruha. U deskriptivnom dijelu testa je od panelista traženo da ocijene intenzitet atributa arome na ljestvici od 0 do 10 (0 – izostanak intenziteta, 10 – najjači intenzitet), s mogućnošću izražavanja ocjene intenziteta na jednu decimalu. Kod hedonističkog dijela testa je od panelista traženo da ocijene sviđanje arome uzoraka na ljestvici od 1 do 9, pri čemu je opis ocjena bio točno definiran (1 – izrazito mi se ne sviđa, 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa, 9 – izrazito mi se sviđa), s mogućnošću izražavanja ocjene u obliku cijelog broja. Hedonistički test arome kruha proveden je u skladu sa Svensson



(2012). Primjer testova nalazi se u prilogima 3 i 4, a na slici 9 je prikazan primjer postavljene senzorske analize.



**Slika 9.** Primjer postavljene senzorske analize arome kruha (vlastita fotografija)

Rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti ocjena intenziteta pojedinog atributa arome izračunate za svaki uzorak.

U senzorskoj analizi arome uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima sudjelovalo je 13 treniranih panelista (12 žena, jedan muškarac, od 26 do 54 godine), a analiza je provedena u dva ponavljanja. U senzorskoj analizi arome kruha različitog prema dodatku brašna žutog graška i udjelu dodanog kiselog tijesta sudjelovalo je 15 treniranih panelista (14 žena, jedan muškarac, od 27 do 56 godina), a analiza je provedena u jednom ponavljanju.

### 3.14.3. Senzorska analiza izgleda i teksture kruha

U senzorskoj analizi izgleda i teksture kruha različitog prema dodatku brašna žutog graška i udjelu dodanog kiselog tijesta sudjelovalo je 14 treniranih panelista (13 žena, jedan muškarac, od 27 do 56 godina), a analiza je provedena u jednom ponavljanju. Panelistima su poslužena četiri uzorka kruha. U deskriptivnom testu je od panelista traženo da ocijene intenzitet svojstava izgleda i teksture kruha na ljestvici od 0 do 10 (0 izostanak intenziteta, a 10 najjači intenzitet), s mogućnošću izražavanja ocjene intenziteta na jednu decimalu. Primjer testa nalazi se u prilogu 5, a na slici 9 je prikazan primjer postavljene senzorske analize.

#### 3.14.4. Hedonistička senzorska analiza sveukupnog doživljaja kruha i test nizanja po preferenciji

U hedonističkoj senzorskoj analizi sveukupnog doživljaja kruha različitog prema dodatku brašna žutog graška i udjelu dodanog kiselog tijesta te testu nizanja po preferenciji sudjelovalo je ukupno 58 potrošača (studenti i zaposlenici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta). U hedonističkom testu se od potrošača očekivalo da s obzirom na sveukupni doživljaj ocijene kruh na ljestvici od 1 do 9, pri čemu je opis ocjena bio definiran (1 – izrazito mi se ne sviđa, 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa, 9 – izrazito mi se sviđa), s mogućnošću izražavanja ocjene cijelim brojem. U testu nizanja po preferenciji, od potrošača se očekivalo da nanižu uzorke kruha na ljestvici od 1 do 4 s obzirom na preferenciju, pri čemu je 1 – najviše preferiram, a 4 – najmanje preferiram. Primjer testova nalazi se u priložima 6 i 7, a na slici 9 je prikazan primjer postavljene senzorske analize.

#### 3.14.5. Statistička obrada

Za određivanje statistički značajnih razlika između analiziranih uzoraka i ocjena panelista u 1. i 2. fazi istraživanja korištena je *Mixed Model* faktorska ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) s uzorkom kao fiksnim utjecajem i panelistom kao slučajnim (engl. *random*) utjecajem. Značajnost utjecaja dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta u 1. fazi istraživanja ispitana je primjenom *Mixed Model* faktorske ANOVA analize ( $\alpha = 0,05$ ) s dodatkom brašna žutog graška i kiselim tijestom kao fiksnim utjecajima te panelistom kao slučajnim utjecajem, uz *post hoc* Tukey HSD test ( $\alpha = 0,05$ ). Značajnost utjecaja dodatka kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima u 2. fazi istraživanja ispitana je primjenom *Mixed Model* faktorske ANOVA analize ( $\alpha = 0,05$ ) sa svakim zasebnim dodatkom kao fiksnim utjecajem te panelistom kao slučajnim utjecajem, uz *post hoc* Tukey HSD test ( $\alpha = 0,05$ ). Za određivanje značajnih razlika između analiziranih uzoraka i ocjena panelista u 3. fazi istraživanja korištena je *Mixed Model Main Effect* ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) s uzorkom kao fiksnim utjecajem i panelistom kao slučajnim (engl. *random*) utjecajem, uz *post hoc* Tukey HSD test ( $\alpha = 0,05$ ). Značajnost utjecaja dodatka različitog udjela kiselog tijesta ispitana je primjenom *Mixed Model Main Effect* ANOVA analize ( $\alpha = 0,05$ ) s uzorkom s različitim dodatkom kiselog tijesta (uzorak bez dodatka kiselog tijesta nije uključen u analizu) kao fiksnim utjecajem te panelistom kao slučajnim utjecajem. Povezanost senzorskih atributa s prihvatljivošću kruha i koncentracijom hlapljivih spojeva arome određenom HS-SPME/GC-MS metodom ispitana je analizom korelacije ( $\alpha = 0,05$ ). Provedena je i PCA analiza rezultata senzorske analize mirisa kore i

sredine kruha kako bi se utvrdilo koji atributi više definiraju miris sredine, a koji miris kore kruha. Također, PCA analiza primijenjena je i za analizu rezultata senzorske analize mirisa sredine, kore te arome kruha radi jednostavnijeg prikaza razlika i sličnosti mirisa i arome analiziranih uzoraka kruha. U svrhu definiranja optimalnog kiselog tijesta, dodanih prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima s obzirom na prihvatljivost kruha, provedena je analiza profila poželjnosti pomoću metode općih linearnih modela (engl. *General Linear Models*, GLM) kojom su utvrđeni faktori poželjnosti. Rezultati nizanja uzoraka po preferenciji analizirani su pomoću Friedman ANOVA analize ( $\alpha = 0,05$ ). Statistička obrada podataka provedena je pomoću programa Statistica 10 (StatSoft Inc, SAD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Prehrambena vrijednost sirovina

Rezultati određivanja prehrambene vrijednosti sirovina prikazani su u tablici 9.

**Tablica 9.** Prehrambena vrijednost sirovina korištenih za pripremu bezglutenskog kruha (g 100 g suhe tvari<sup>-1</sup>)

	<b>Brašno žutog graška</b>	<b>Integralno rižino brašno</b>	<b>Integralno proseno brašno</b>	<b>Kukuruzni ekstrudat</b>	
<b>Pepeo</b>	2,69 ± 0,00	1,60 ± 0,02	1,53 ± 0,00	0,64 ± 0,01	
<b>Proteini</b>	23,22 ± 0,05	7,92 ± 0,01	11,57 ± 0,01	8,40 ± 0,00	
<b>Masti</b>	3,87 ± 0,04	2,51 ± 0,16	4,57 ± 0,06	2,55 ± 0,11	
<b>Škrob</b>	49,25 ± 0,43	75,77 ± 0,44	66,89 ± 0,43	76,77 ± 0,43	
IDF*	17,25 ± 0,28	4,40 ± 0,14	3,71 ± 0,35	4,90 ± 0,44	
<b>Vlakna</b>	SDFP*	1,25 ± 0,18	0,73 ± 0,10	1,24 ± 0,20	0,73 ± 0,06
SDFS*	5,08 ± 0,14	0,77 ± 0,04	0,72 ± 0,00	1,27 ± 0,02	
Ukupno	23,58 ± 0,04	5,67 ± 0,15	5,90 ± 0,08	6,90 ± 0,48	
<b>Šećeri</b>	3,10 ± 0,13	1,14 ± 0,09	0,75 ± 0,09	1,02 ± 0,08	
<b>Suha tvar<sup>#</sup></b>	87,71 ± 0,02	86,62 ± 0,22	87,79 ± 0,23	89,34 ± 0,01	

\*IDF – netopljiva vlakna; SDFP – vlakna topljiva u vodi, netopljiva u 78 % etanolu; SDFS – vlakna topljiva u vodi i 78 % etanolu

<sup>#</sup>izraženo na 100 g sirovine

Brašno žutog graška predstavlja izvrstan izvor proteina (23 % suhe tvari) i vlakana (24 % suhe tvari). U odnosu na integralno rižino brašno, brašno žutog graška sadržavalo je 68 % više pepela, 55 % više masti, 35 % manje škroba, gotovo trostruko više proteina i šećera te četverostruko više vlakana (tablica 9). Osim navedenih određenih parametara prehrambene vrijednosti, brašno graška sadrži više lizina, limitirajuće esencijalne aminokiseline u žitaricama. Stoga njegova primjena u proizvodima na bazi žitarica doprinosi uravnoteženijem unosu aminokiselina (Amagliani i sur., 2017; Millar i sur., 2019). Brašno graška također sadrži visoku koncentraciju sporo probavljivog i rezistentnog škroba (Piecyk i sur., 2012) te utječe na smanjenje glikemijskog indeksa (Angioloni i Collar, 2012; Ficco i sur., 2018).

## 4.2. Utjecaj dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline

U ovom dijelu istraživanja ispitan je utjecaj dodatka brašna žutog graška (G) u kombinaciji s dodatkom 20 % kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline (*L. reuteri* – LR, *L. brevis* – LB, *L. fermentum* – LF) na pH i ukupnu kiselost, udjel kiselina i šećera, profil hlapljivih spojeva arome, koncentraciju slobodnih ukupnih fenolnih spojeva i fenolnih kiselina, antioksidativni kapacitet, koncentraciju akroleina u fazama pripreme kruha te senzorska svojstva bezglutenskog kruha. Provedena je analiza uzoraka kiselog tijesta, krušnog tijesta prije i nakon fermentacije, kruha i kore kruha.

### 4.2.1. Mikrobiološka analiza, pH, ukupna kiselost, udjel kiselina i šećera

U tablici 10 prikazani su rezultati određivanja broja poraslih kolonija bakterija mliječne kiseline i kvasaca u različitim fazama pripreme kruha.

**Tablica 10.** Broj bakterija mliječne kiseline (BMK) i kvasaca (log CFU g<sup>-1</sup>) u uzorcima kiselog tijesta prije (KT 0 h) i nakon (KT 16 h) fermentacije te krušnog tijesta nakon fermentacije (TF) različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i primijenjene bakterije mliječne kiseline

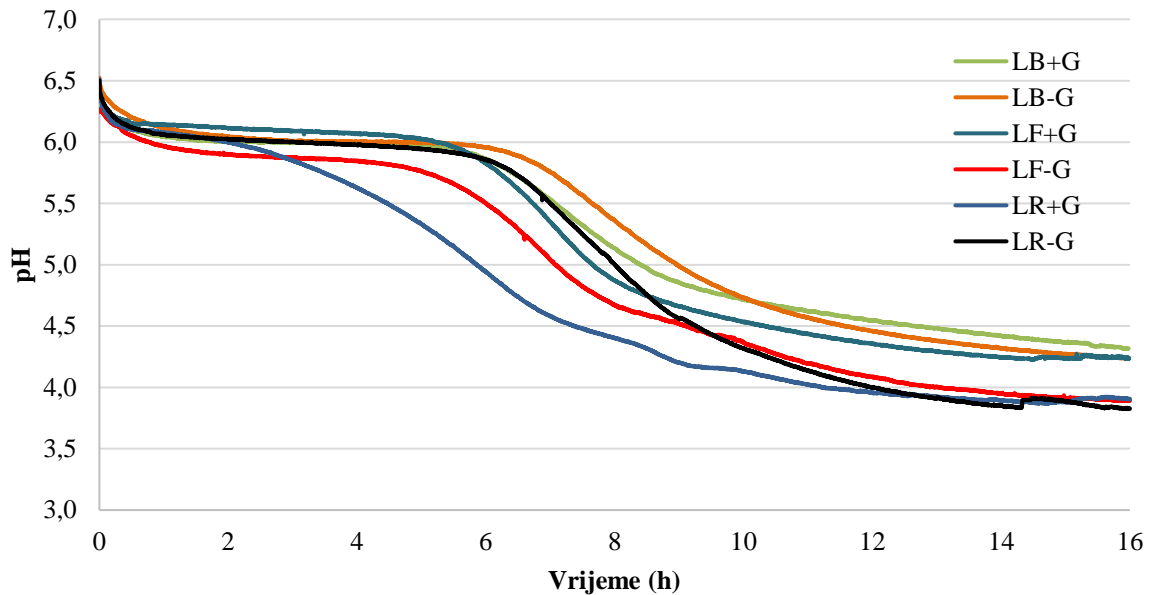
	BMK (KT 0 h)	BMK (KT 16 h)	BMK (TF)	Kvasci (TF)
<b>0-G</b>				7,63 ± 0,03
<b>0+G</b>				7,47 ± 0,07
<b>LR-G</b>	6,15 ± 0,26	9,03 ± 0,06	8,57 ± 0,01	7,70 ± 0,03
<b>LB-G</b>	5,48 ± 0,25	8,68 ± 0,23	7,84 ± 0,06	7,54 ± 0,12
<b>LF-G</b>	6,35 ± 0,21	8,48 ± 0,13	8,30 ± 0,03	7,63 ± 0,00
<b>LR+G</b>	6,28 ± 0,13	9,05 ± 0,29	8,73 ± 0,08	7,59 ± 0,02
<b>LB+G</b>	5,83 ± 0,14	9,08 ± 0,09	8,41 ± 0,16	7,49 ± 0,13
<b>LF+G</b>	5,55 ± 0,08	8,85 ± 0,05	8,29 ± 0,00	7,56 ± 0,00

\*7,54 ± 0,06 log CFU g<sup>-1</sup> kvasaca prije krušne fermentacije

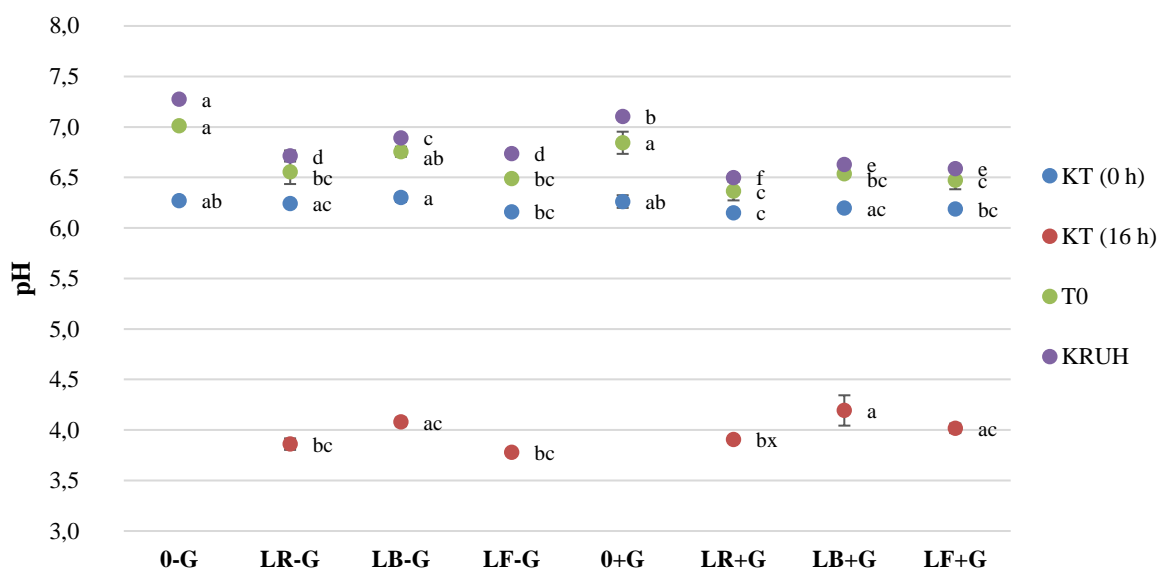
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Tijekom 16 sati fermentacije kiselog tijesta došlo je do porasta broja živih stanica bakterija mliječne kiseline za od 2 do 3 log CFU g<sup>-1</sup>, što je u skladu s porastom od 2 do 4 log CFU g<sup>-1</sup> tijekom od 8 sati do 24 sata fermentacije kiselog tijesta utvrđenim od strane drugih istraživača (Antognoni i sur., 2019; Curiel i sur., 2015; Di Cagno i sur., 2003; Meignen i sur., 2001; Moore i sur., 2007; Ravyts i De Vuyst, 2011; Sterr i sur., 2009). U odnosu na kiselo tijesto nakon 16 sati fermentacije, u krušnom tijestu određen je manji broj živih stanica bakterija mliječne kiseline, a što je posljedica razrjeđenja s 80 % novododanih sirovina.

Brzina zakiseljavanja, ukupna promjena pH, najmanji postignuti pH, ukupna kiselost te koncentracija mliječne i octene kiseline ovise o sirovinama, bakterijama mliječne kiseline i uvjetima primijenjenim za kiseljenje tijesta (Curiel i sur., 2015; Di Cagno i sur., 2003; Moore i sur., 2007; Ripari i sur., 2016; Rizzello i sur., 2014a; Rühmkorf i sur., 2012; Wolter i sur., 2014). Na slici 10 prikazana je kinetika kiseljenja tijesta, a na slici 11 pH u različitim fazama pripreme kruha ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline korištenim za pripremu kiselog tijesta.



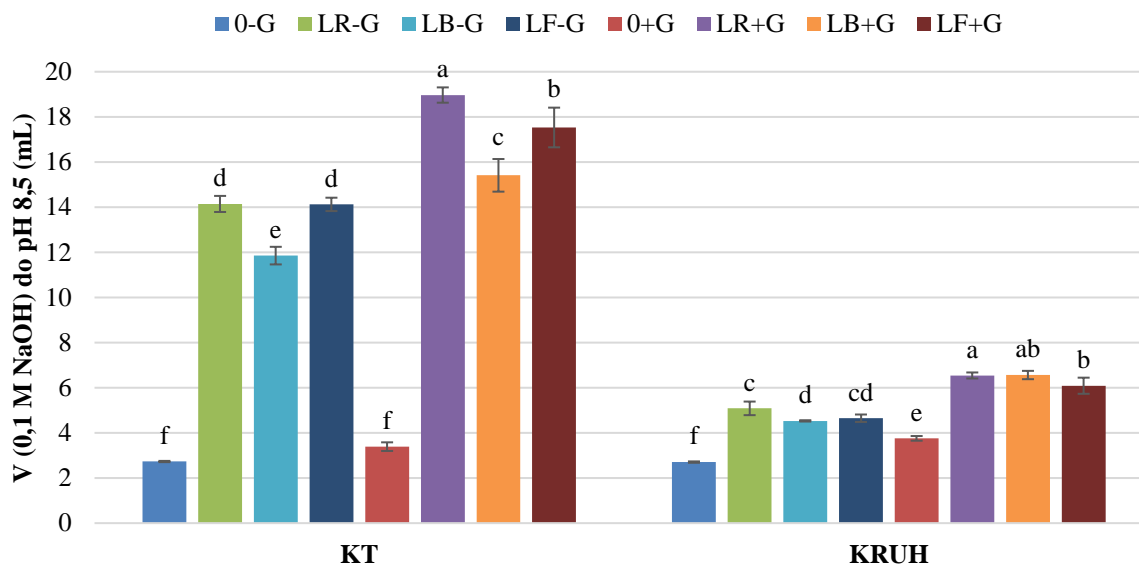
**Slika 10.** Kinetika kiseljenja tijesta različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i primijenjene bakterije mliječne kiseline. Oznake: LR, LB, LF – kiselo tijesto naciijepljeno s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška



**Slika 11.** pH uzoraka kiselog tijesta prije (KT 0 h) i nakon (KT 16 h) fermentacije, krušnog tijesta prije fermentacije (T0) i kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar iste skupine uzoraka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Prije početka kiseljenja, pH svih analiziranih uzoraka nalazio se u rasponu od 6,15 do 6,30. Pri kiseljenju tijesta došlo je do smanjenja pH na od 3,86 do 4,19, ovisno o uzorku. U uzorcima bez dodatka brašna žutog graška utvrđen je manji pH nakon 16 sati kiseljenja u odnosu na uzorke s njegovim dodatkom (faktorska ANOVA,  $p = 0,019$ ). S obzirom na primijenjene bakterije mliječne kiseline, kod *L. fermentum* i *L. reuteri* utvrđeno je sveukupno veće smanjenje pH u odnosu na *L. brevis* (faktorska ANOVA,  $p = 0,003$ ). Dodatak 20 % kiselog tijesta utjecao je na značajno smanjenje pH krušnog tijesta i kruha (faktorska ANOVA,  $p < 0,001$ ). pH kruha bez dodatka kiselog tijesta iznosio je od 7,10 do 7,28, a kruha s dodatkom kiselog tijesta od 6,50 do 6,89. Pri tome je manji pH određen u uzorcima s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. fermentum* i *L. reuteri* nego *L. brevis*, što je u skladu s rezultatima određivanja pH u kiselom tijestu. Dodatak brašna žutog graška utjecao je na smanjenje pH krušnog tijesta i kruha (faktorska ANOVA,  $p = 0,002$  i  $p < 0,001$ ).

Na slici 12 prikazani su rezultati određivanja ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha.



**Slika 12.** Ukupna kiselost uzoraka kiselog tijesta (KT) i kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar skupine uzoraka kiselog tijesta/kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Utvrđena je negativna korelacija između ukupne kiselosti i pH kiselog tijesta i kruha ( $r = -0,930$ ,  $p = 0,001$ ). Ukupna kiselost povećala se s procesom kiseljenja tijesta i dodatkom kiselog tijesta u kruh (faktorska ANOVA,  $p < 0,001$ ). Utvrđena je i značajna korelacija između ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha ( $r = 0,917$ ,  $p = 0,001$ ). U odnosu na kiselo tijesto, u kruhu s njegovim dodatkom utvrđena je manja ukupna kiselost, a što se može pripisati razrjeđenju pri pripremi krušnog tijesta i smanjenju ukupne kiselosti pri pečenju (Corsetti i sur., 2008). S obzirom na utjecaj primijenjenih bakterija mliječne kiseline, do većeg povećanja ukupne kiselosti došlo je kiseljenjem tijesta s *L. fermentum* i *L. reuteri* nego *L. brevis*. Nadalje, utvrđen je značajan utjecaj interakcije brašna žutog graška i procesa kiseljenja tijesta na ukupnu kiselost (faktorska ANOVA,  $p < 0,001$ ). Dodatak brašna žutog graška utjecao je na značajnije povećanje ukupne kiselosti pri kiseljenju tijesta te s dodatkom kiselog tijesta u kruh. U kiselom tijestu i kruhu s njegovim dodatkom te s dodatkom brašna žutog graška utvrđena je od 24 % do 34 % odnosno od 29 % do 45 % veća ukupna kiselost u odnosu na kiselo tijesto i kruh bez brašna žutog graška. Unatoč postignutoj većoj ukupnoj kiselosti kiselog tijesta s dodatkom brašna žutog graška, utvrđen je manji pH kiselog tijesta bez njegovog dodatka. Ravyts i De Vuyst (2011) su takav rezultat u slučaju usporedbe pšeničnog i raženog brašna objasnili većim puferskim kapacitetom raženog brašna radi većeg



udjela mineralnih tvari. Navedeno objašnjenje možda bi se moglo primijeniti i u ovom slučaju budući da brašno žutog graška sadrži veći udjel mineralnih tvari od integralnog rižinog brašna (tablica 9).

Pri fermentaciji bakterije mliječne kiseline metaboliziraju šećere pri čemu kao produkt metabolizma homofermentativnih bakterija nastaje mliječna kiselina, a heterofermentativnih mliječna i octena kiselina (Gobbetti i Gänzle, 2013). U ovom istraživanju su za pripremu kiselog tijesta korištene heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Osim šećera koji su prirodno prisutni u sirovinama te onih dodanih prema recepturi, pri fermentaciji dolazi i do otpuštanja maltoze i glukoze uslijed aktivnosti endogenih amilaza žitarica (Gänzle, 2014). Kvasci također metaboliziraju šećere pri čemu nastaje CO<sub>2</sub> i etanol. Osim toga, pri metaboličkoj aktivnosti bakterija mliječne kiseline i kvasaca nastaju i drugi spojevi odgovorni za aromu i miris konačnog proizvoda (Pico i sur., 2015).

U tablici 11 prikazan je udjel mliječne i octene kiseline u kiselom tijestu te izračunati fermentabilni koeficijenti ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline korištenim za pripremu kiselog tijesta.

**Tablica 11.** Udjel mliječne i octene kiseline (% suhe tvari) te fermentabilni koeficijent u uzorcima kiselog tijesta različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	Mliječna kiselina (% suhe tvari)	Octena kiselina (% suhe tvari)	Fermentabilni koeficijent
<b>LR-G</b>	1,61 ± 0,05 c	0,31 ± 0,02 c	3,5
<b>LB-G</b>	1,46 ± 0,05 c	0,17 ± 0,00 d	5,9
<b>LF-G</b>	2,01 ± 0,06 b	0,14 ± 0,01 d	9,4
<b>LR+G</b>	2,56 ± 0,09 a	0,59 ± 0,04 a	2,9
<b>LB+G</b>	2,06 ± 0,15 b	0,52 ± 0,00 a	2,7
<b>LF+G</b>	2,60 ± 0,12 a	0,42 ± 0,04 b	4,1

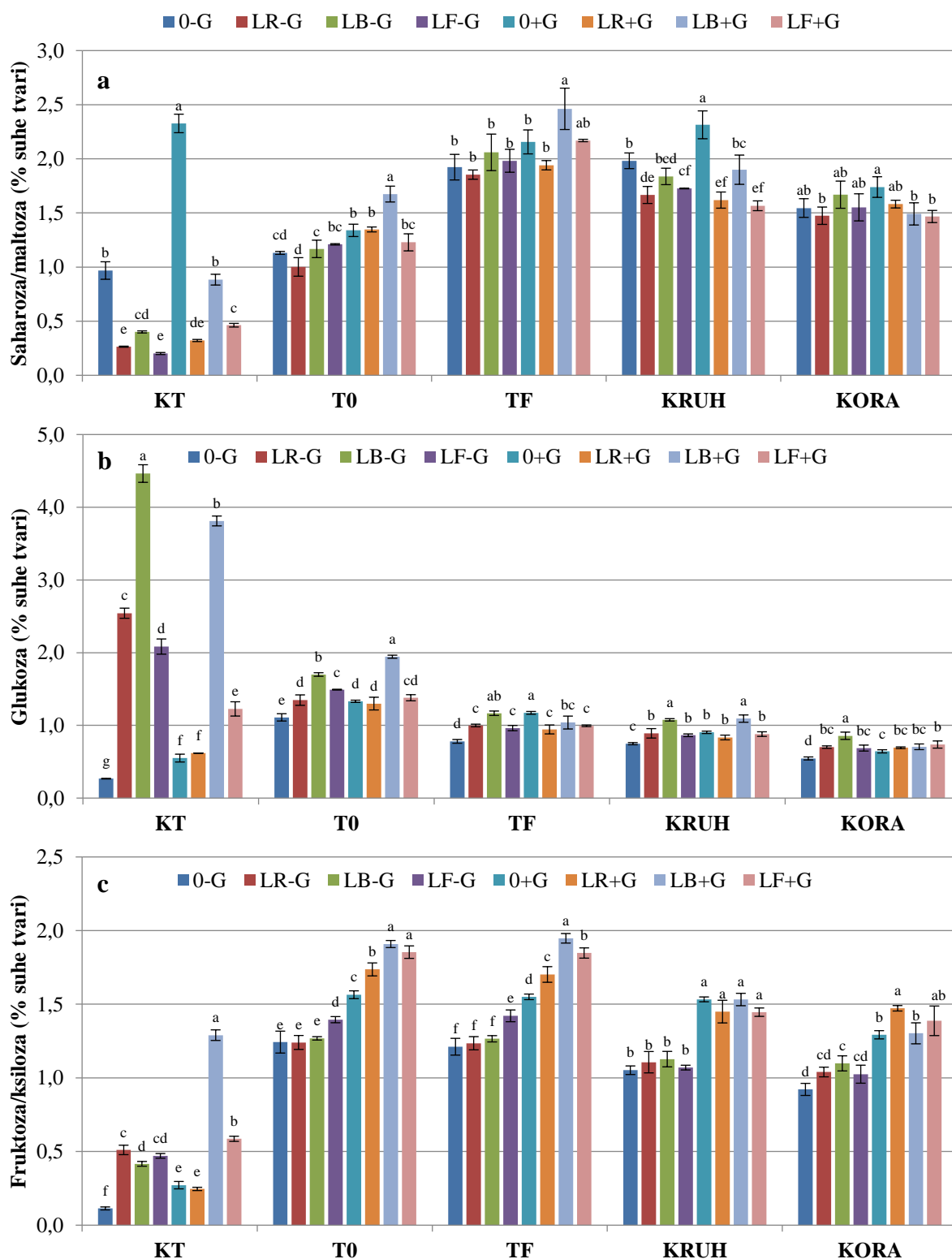
Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test, p < 0,05)

Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Mliječna kiselina nije detektirana u tijestu prije početka kiseljenja, dok je udjel octene kiseline u tijestu s dodatkom brašna žutog graška (0+G) iznosio 0,17 ± 0,01 % suhe tvari (u tijestu 0-G nije detektirana). Pri kiseljenju tijesta došlo je do porasta udjela mliječne i octene kiseline. Do značajnijeg povećanja njihovog udjela došlo je u tijestu s dodatkom brašna žutog graška – od 29 % do 59 % u slučaju mliječne kiseline, od 91 % do 213 % u slučaju octene kiseline. Takav utjecaj dodatka brašna žutog graška mogao bi se objasniti oko dvostruko većim udjelom

šećera kao supstrata za nastanak kiselina u tijestu s njegovim dodatkom u odnosu na tijesto bez njegovog dodatka. Osim toga, veći udjel saharoze i fruktoze dovodi do povećanja proizvodnje octene kiseline budući da fruktoza djeluje kao akceptor vodika (Gobbetti i sur., 1995b; Korakli i sur., 2001). S obzirom na primijenjene bakterije mliječne kiseline, do većeg povećanja udjela mliječne i octene kiseline došlo je pri fermentaciji s *L. reuteri* i *L. fermentum* nego s *L. brevis*. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima određivanja pH i ukupne kiselosti kiselog tijesta te je utvrđena značajna korelacija udjela mliječne kiseline s pH kiselog tijesta ( $r = -0,918$ ,  $p = 0,001$ ) te mliječne i octene kiseline s ukupnom kiselosti kiselog tijesta ( $r = 0,991$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = 0,886$ ,  $p = 0,003$ ). Fermentabilni koeficijent predstavlja omjer množinskih koncentracija mliječne i octene kiseline te se smatra kako fermentabilni koeficijent u rasponu od 1,5 do 4 pozitivno utječe na aromu i strukturu proizvoda (Spicher, 1983). Određeni fermentabilni koeficijent kiselog tijesta se značajno razlikovao ovisno o dodatku brašna žutog graška i primijenjenim bakterijama mliječne kiseline, što je u skladu s rezultatima Curiel i sur. (2015), Ravyts i De Vuyst (2011) i Ventimiglia i sur. (2015). Manji fermentabilni koeficijent utvrđen je za kiselo tijesto s dodatkom brašna žutog graška, a što je posljedica većeg povećanja koncentracije octene u odnosu na mliječnu kiselinu.

Na slici 13 prikazani su rezultati određivanja šećera u fazama pripreme kruha ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline korištenim za pripremu kiselog tijesta.



**Slika 13.** Udjel saharoze/maltoze (a), glukoze (b) i fruktoze/ksiloze (c) (% suhe tvari) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Dodatak brašna žutog graška u tijesto (0+G u odnosu na 0-G) utjecao je na povećanje udjela saharoze/maltoze (140 %), glukoze (106 %) i fruktoze/ksiloze (139 %). Navedeni pozitivan utjecaj je očekivan budući da ono sadrži više jednostavnih šećera u odnosu na integralno rižino brašno (tablica 9). Pri kiseljenju tijesta došlo je do smanjenja udjela saharoze/maltoze te povećanja udjela glukoze i fruktoze/ksiloze (osim u slučaju LR+G u kojem nije utvrđena razlika u udjelu glukoze i fruktoze/ksiloze), a što je u skladu s rezultatima Hidalgo i Brandolini (2011), Ravyts i De Vuyst (2011) te Rühmkorf i sur. (2012). Pri fermentaciji dolazi do degradacije saharoze, škroba, dekstrina, hidrolize maltoze te oslobađanja glukoze i fruktoze (Gänzle, 2014; Hidalgo i Brandolini, 2011). Značajnije smanjenje udjela saharoze/maltoze utvrđeno je kod primjene *L. reuteri* i *L. fermentum* (od 73 % do 86 %) u odnosu na *L. brevis* (od 59 % do 62 %), a značajnije povećanje udjela glukoze i fruktoze/ksiloze utvrđeno je kod primjene *L. brevis* (do 17 puta veći udjel) u odnosu na *L. reuteri* i *L. fermentum* (do 10 puta veći udjel). S obzirom na utjecaj interakcije dodatka brašna žutog graška i procesa kiseljenja tijesta, do značajnijeg smanjenja udjela saharoze/maltoze te povećanja udjela fruktoze/ksiloze došlo je u kiselom tijestu s dodatkom brašna žutog graška, a do značajnijeg povećanja udjela glukoze u kiselom tijestu bez dodatka brašna žutog graška. Ravyts i De Vuyst (2011) su također utvrdili različiti udjel glukoze, fruktoze i maltoze u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim sirovinama i bakterijama mliječne kiseline.

U usporedbi s kiselim tijestom, u krušnom tijestu došlo je do povećanja udjela fruktoze/ksiloze i saharoze/maltoze, osim u slučaju uzorka 0+G u kojem je došlo do smanjenja udjela saharoze/maltoze. U krušnom tijestu došlo je i do povećanja udjela glukoze, ali samo u slučaju uzorka tijesta bez dodatka kiselog tijesta (0+G i 0-G) te tijesta LR+G, moguće radi utjecaja razrjeđenja kiselog tijesta u kojem je utvrđen značajno veći udjel nakon procesa kiseljenja. Na navedeno povećanje udjela šećera utjecao je dodatak novih sirovina u krušno tijesto, uključujući dodatak saharoze. Dodatak brašna žutog graška utjecao je na povećanje udjela saharoze/maltoze, glukoze i fruktoze/ksiloze i u krušnom tijestu prije fermentacije ( $p < 0,001$ ). Utjecaj dodatka kiselog tijesta na udjel navedenih šećera u krušnom tijestu prije fermentacije razlikovao se ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje. Do značajnog utjecaja, odnosno povećanja udjela saharoze/maltoze s dodatkom kiselog tijesta došlo je jedino u slučaju uzorka LB+G. Do povećanja udjela glukoze došlo je u svim uzorcima bez dodatka brašna žutog graška, a s dodatkom brašna žutog graška samo u slučaju uzorka LB+G kod kojeg je utvrđeno najveće povećanje udjela glukoze kiseljenjem tijesta. Nasuprot tome, do povećanja udjela

fruktoze/ksiloze došlo je u svim uzorcima s dodatkom brašna žutog graška, a bez dodatka brašna žutog graška samo u slučaju uzorka LF-G.

Pri krušnoj fermentaciji došlo je do povećanja udjela saharoze/maltoze, smanjenja udjela glukoze, a značajne promjene udjela fruktoze/ksiloze nisu utvrđene. Povećanje udjela maltoze može biti posljedica nastavka aktivnosti enzima amilaza, a smanjenje udjela glukoze posljedica metabolizma bakterija mliječne kiseline i kvasaca (Gänzle, 2014). Hidalgo i Brandolini (2011) su također utvrdili povećanje udjela maltoze te smanjenje udjela glukoze i fruktoze pri fermentaciji krušnog tijesta. Značajno veći udjel saharoze/maltoze ovisno o dodatku kiselog tijesta utvrđen je samo u slučaju uzorka LB+G, što je u skladu s rezultatima određivanja njihovog udjela u krušnom tijestu prije fermentacije. Nadalje, dodatak kiselog tijesta utjecao je na povećanje udjela glukoze u uzorcima s dodatkom brašna žutog graška, a smanjenje u uzorcima bez dodatka brašna žutog graška. Značajan utjecaj brašna žutog graška na povećanje udjela glukoze utvrđen je jedino u slučaju tijesta bez dodatka kiselog tijesta. Budući da pri krušnoj fermentaciji nije došlo do značajnih promjena u udjelu fruktoze/ksiloze, trend ponašanja njihovog udjela bio je u skladu s onim utvrđenim u krušnom tijestu prije fermentacije.

U odnosu na krušno tijesto nakon fermentacije, u kruhu je došlo do smanjenja udjela saharoze/maltoze, glukoze i fruktoze/ksiloze, moguće kao posljedica metabolizma bakterija mliječne kiseline i kvasaca na početku pečenja te Maillardove reakcije i reakcija karamelizacije (Hidalgo i Brandolini, 2011; Parker, 2015). Značajno manji udjel saharoze/maltoze utvrđen je u kruhu s dodatkom kiselog tijesta u odnosu na kruh bez njegovog dodatka. Utjecaj brašna graška na povećanje udjela saharoze/maltoze utvrđen je jedino u slučaju kruha bez dodatka kiselog tijesta. Značajno veći udjel glukoze s dodatkom kiselog tijesta utvrđen je u svim uzorcima bez dodatka brašna žutog graška, a s dodatkom brašna žutog graška samo u slučaju kruha LB+G. Dodatak brašna žutog graška utjecao je na značajno povećanje udjela fruktoze/ksiloze u kruhu, dok utjecaj dodatka kiselog tijesta nije bio značajan.

U odnosu na kruh, u kori je utvrđen manji udjel saharoze/maltoze, glukoze i fruktoze/ksiloze, što je moguća posljedica intenzivnije Maillardove reakcije i reakcija karamelizacije na površini kruha. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Hidalgo i Brandolini (2011). Značajno manji udjel saharoze/maltoze utvrđen je u kori kruha s dodatkom kiselog tijesta LB+G i LF+G u odnosu na koru bez njegovog dodatka. Značajno veći udjel glukoze utvrđen je u kori bez dodatka brašna žutog graška s dodatkom kiselog tijesta, a s dodatkom brašna

žutog graška samo u kori uzorka LF+G. Značajno veći udjel fruktoze/ksiloze utvrđen je u kori LB-G i LR+G s dodatkom kiselog tijesta, u odnosu na koru kruha bez njegovog dodatka. Također, utjecaj brašna graška na povećanje udjela fruktoze/ksiloze bio je očit i u kori kruha.

Veći udjel fermentabilnih šećera na početku fermentacije kiselog i krušnog tijesta značio je i veću količinu dostupnih prekursora za nastanak hlapljivih spojeva arome uslijed metaboličke aktivnosti bakterija mliječne kiseline i kvasaca. Također, veći udjel šećera na kraju krušne fermentacije značio je i veću količinu dostupnih prekursora za nastanak hlapljivih spojeva arome uslijed Maillardove reakcije, reakcija karamelizacije i toplinske degradacije pri pečenju. S obzirom na navedeno, veći udjel šećera u pojedinim fazama pripreme kruha mogao je doprinijeti profilu hlapljivih spojeva arome kruha.

#### 4.2.2. Optimizacija i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome

##### 4.2.2.1. Optimizacija uvjeta SPME ekstrakcije

Razvoj pouzdane i osjetljive SPME metode za analizu hrane zahtijeva odabir i optimizaciju svih ključnih parametara ekstrakcije (Merkle i sur., 2015). Pravilnom optimizacijom parametara ekstrakcije moguće je postići željenu ravnotežu između osjetljivosti, temperature i vremena trajanja ekstrakcije. Brojni parametri utječu na proces ekstrakcije, a neki od njih su vrsta vlakna, temperatura, vrijeme trajanja, volumen uzorka, dodatak soli, pH i prisutnost organskih otapala u vodenoj otopini (Pawliszyn, 2012).

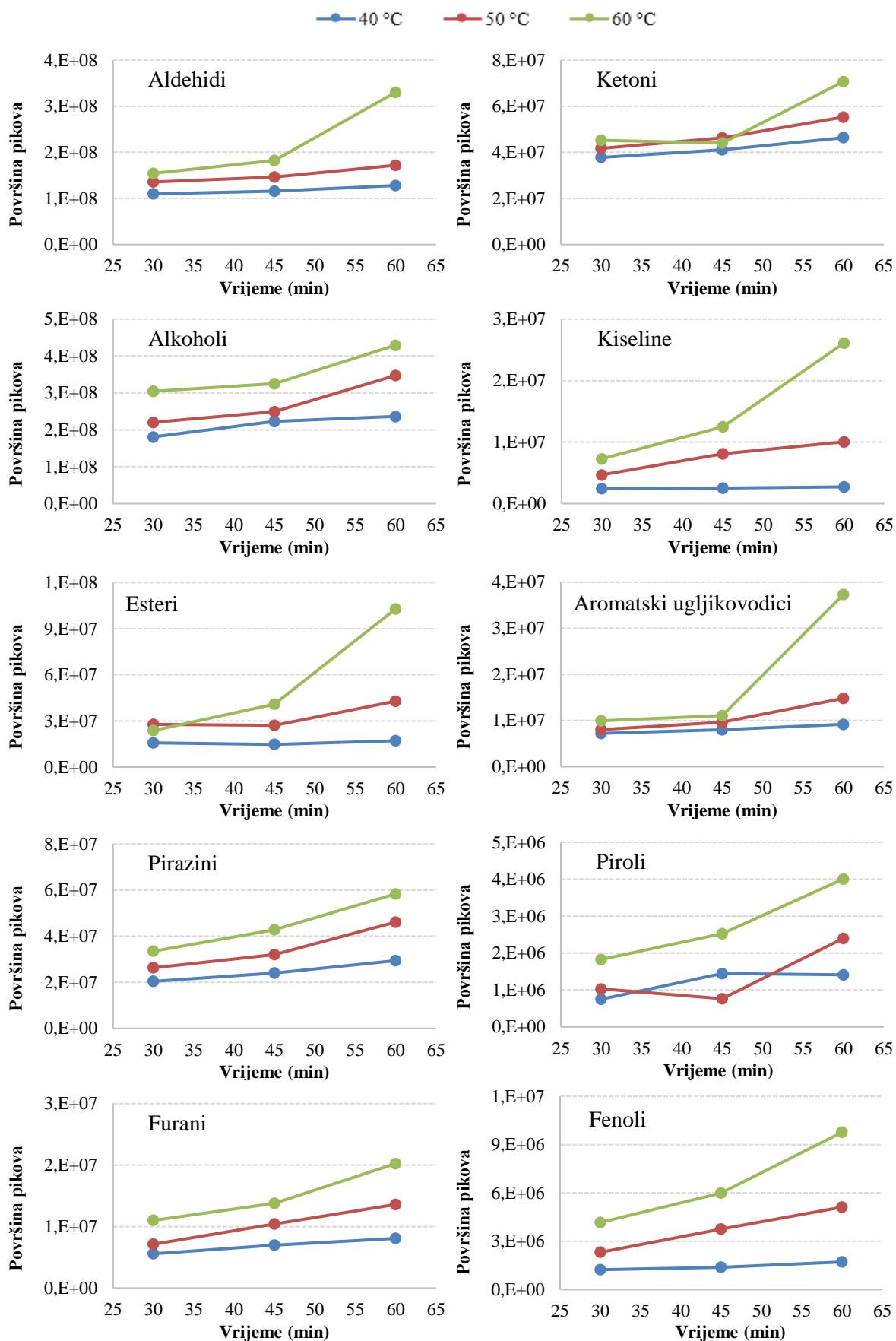
Izbor filma vlakna uglavnom ovisi o prirodi analita koji je potrebno ekstrahirati i svojstvima matrice. Polarnost i hlapljivost ciljanih spojeva su najbitnija svojstva pri odabiru vrste vlakna, a pravilo "slično otapa slično" odnosi se i na izbor odgovarajućeg SPME vlakna za ekstrakciju (Balasubramanian i Panigrahi, 2011; Merkle i sur., 2015). Često korišteni komercijalno dostupni filmovi vlakana s primjenom u analitici hrane su polidimetilsiloksan (PDMS), poliakrilat (PA), karboksen (CAR, ugljično molekularno sito), divinilbenzen (DVB) i karbovaks (CW, polietilen glikol). PDMS je najčešće korišteni adsorpcijski film te je njegova glavna prednost otpornost na visoke temperature i veća stabilnost od CAR/PDMS i DVB/PDMS filmova (Augusto i Luiz Pires Valente, 2002; Balasubramanian i Panigrahi, 2011). CAR ima veliku površinu i mikroporoznu strukturu koja omogućuje adsorpciju hlapljivih spojeva u tragovima i spojeva male molekulske mase (Achouri i sur., 2006; Garcia-Esteban i sur., 2004). DVB je polarni porozni adsorpcijski film kojeg karakteriziraju

makropore te je stoga prikladan za ekstrakciju djelomično hlapljivih spojeva i polarnih spojeva poput disulfida i trisulfida (Achouri i sur., 2006; Cai i sur., 2001).

Optimalna temperatura ekstrakcije ovisi o sastavu matrice i upotrijebljenoj vrsti vlakna (Balasubramanian i Panigrahi, 2011). Povišenjem temperature olakšava se prijenos analita iz otopine u slobodni prostor iznad otopine i tako se ubrzava ekstrakcija analita, no dolazi i do smanjenja osjetljivosti metode (King i sur., 2003). Vrijeme trajanja također utječe na raspodjelu analita između otapala i vlakna. Produljenjem vremena ekstrakcije dolazi do vezanja molekula analita na više mjesta na vlaknu, no pri zasićenju vlakna dodatno vrijeme izlaganja ne dovodi do povećanja njihove koncentracije na vlaknu, već može dovesti do desorpcije analita (Pawliszyn, 2002). Slično se događa i kod previsoke temperature ekstrakcije. Dodatak soli (obično natrijev klorid ili natrijev sulfat) povećava ionsku jakost otopine pri čemu dolazi do smanjenja topljivosti analita i njihove poboljšane hlapljivosti, a što povećava stupanj adsorpcije na vlakno te tako povećava učinkovitost ekstrakcije. Razmjer navedenog utjecaja ovisi o analitu i koncentraciji soli u uzorku (Wu i sur., 2000). pH uzorka je bitan budući da je ekstrakcija učinkovitija kad su spojevi u nedisociranom obliku (Pawliszyn, 2002). Količina uzorka za ekstrakciju je također bitna budući da je cilj analize postići linearno proporcionalan odnos koncentracije analiziranih spojeva u uzorku i količine adsorbirane/apsorbirane na vlakno (Ruiz i sur., 2003).

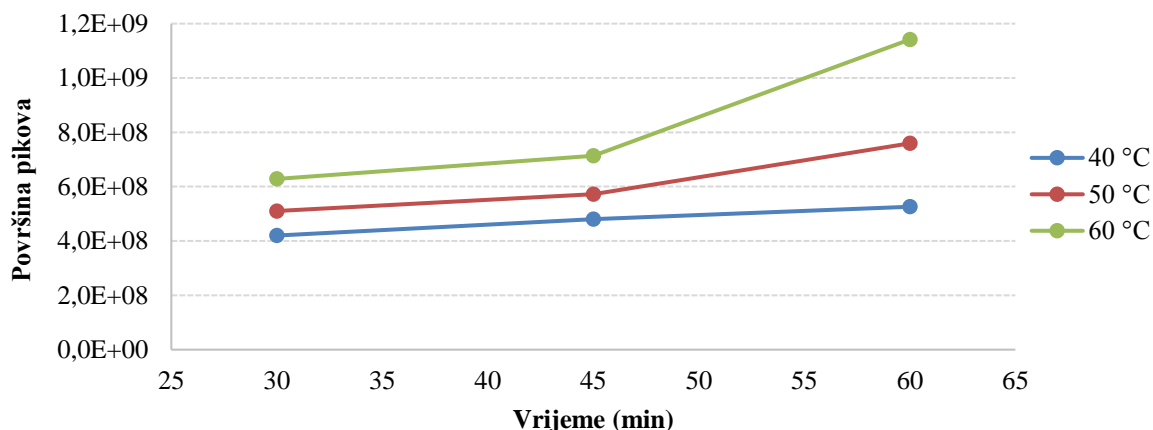
Količina uzorka za ekstrakciju (0,25 g), udjel soli (natrijevog klorida) u otopini (20 %) i pH otopine soli (pH 3) primijenjeni u ovom istraživanju preuzeti su iz istraživanja Ruiz i sur. (2003) koji su optimizirali SPME metodu ekstrakcije hlapljivih spojeva arome koji najviše utječu na miris sredine kruha. Za ekstrakciju je odabrano CAR/PDMS/DVB vlakno budući da osigurava učinkovitost ekstrakcije za širok raspon analita različite polarnosti i molekulske mase (Balasubramanian i Panigrahi, 2011), a u odnosu na CAR/PDMS vlakno omogućuje učinkovitiju ekstrakciju slabije hlapljivih spojeva ključnih za aromu kruha (Raffo i sur., 2015). Prema rezultatima Pico i sur. (2018a), vlakno CAR/PDMS/DVB pokazalo se optimalnim za određivanje profila hlapljivih spojeva arome kruha.

U okviru ovog istraživanja optimizirani su vrijeme trajanja i temperatura ekstrakcije, u rasponu uvjeta prema istraživanjima Paraskevopoulou i sur. (2012), Plessas i sur. (2011), Poinot i sur. (2007) te Ruiz i sur. (2003). Analiziran je utjecaj tri temperature (40 °C, 50 °C i 60 °C) i tri vremena trajanja ekstrakcije (30 min, 45 min i 60 min), uz puni faktorski dizajn pokusa. Rezultati su izraženi preko površina pikova analiziranih spojeva i prikazani su na slikama 14 i 15.



**Slika 14.** Rezultati optimizacije vremena trajanja i temperature SPME ekstrakcije za analizu profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha izraženi po skupinama spojeva





**Slika 15.** Rezultati optimizacije vremena trajanja i temperature SPME ekstrakcije za analizu profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha za sve analizirane spojeve

Prema dobivenim rezultatima zbroja površina analiziranih spojeva, vidljivo je kako je najveća uspješnost ekstrakcije postignuta pri uvjetima 60 °C i 60 min, kako za svaku skupinu analiziranih spojeva (slika 14), tako i za ukupno sve analizirane spojeve (slika 15). Stoga su navedeni uvjeti ekstrakcije (60 °C i 60 min) korišteni u nastavku ovog istraživanja.

Ruiz i sur. (2003) su utvrdili kako se s povećanjem temperature ekstrakcije (od 40 °C do 60 °C) povećava odziv aldehida, kiselina i visokomolekulskih alkohola, dok se odziv ketona i niskomolekulskih alkohola smanjuje. Mogući razlog utvrđenog različitog utjecaja temperature ekstrakcije na odziv ketona i alkohola je analiza različitih spojeva te većeg broja spojeva u ovom istraživanju. Ruiz i sur. (2003) su u optimizaciju uključili dva ketona (2,3-butandion i 3-hidroksi-2-butanon) te šest alkohola (etanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 1-heksanol, fenilmetanol, 2-feniletanol), dok je u ovom istraživanju u optimizaciju bilo uključeno pet ketona i 11 alkohola (prikazani u tablici 5). Poinot i sur. (2007) su utvrdili povećanje intenziteta mirisa (procijenjeno senzorskom analizom ekstrakata hlapljivih spojeva arome) s produljenjem vremena trajanja ekstrakcije (od 15 min do 60 min) i povišenjem temperature ekstrakcije (od 25 °C do 50 °C) pomoću CAR/PDMS/DVB vlakna, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

#### 4.2.2.2. Validacija metode

Validacijski eksperimenti provedeni su pri definiranim optimalnim uvjetima SPME ekstrakcije (60 °C, 60 min), a obuhvaćali su određivanje linearnosti, preciznosti, granice detekcije i granice kvantifikacije. U tablicama 12 i 13 prikazani su rezultati određivanja navedenih validacijskih parametara metode.

**Tablica 12.** Područje, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha

	Konzentracijske razine kalibracijske krivulje	Područje ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Jednadžba kalibracijske krivulje, $y = ax + b$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Koeffcijent korelacije (r)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
			a	b				
<b>Aldehidi</b>								
2-Metilbutanal	11	20,3 – 40600	0,0000410	0,000304	0,9999	4,54	15,1	
3-Metilbutanal	11	14,7 – 14661	0,0000664	-0,000428	1,0000	0,446	1,49	
Pentanal	6	7,76 – 388	0,000183	0,000139	0,9997	0,833	2,78	
Heksanal	9	81,5 – 32614	0,0000831	0,00587	0,9999	0,555	1,85	
(E)-2-Heksenal*	6	2,42 – 16,1	0,000744	0,0000385	0,9998	0,457	1,52	
	5	16,1 – 72,6	0,000485	-0,000267	0,9991			
Heptanal	7	2,50 – 125	0,000584	-0,0000944	1,0000	0,0728	0,243	
(E)-2-Heptenal	8	9,75 – 975	0,000668	-0,000926	1,0000	0,182	0,608	
Oktanal	6	0,386 – 46,3	0,00141	0,000360	0,9999	0,00302	0,0101	
(E)-2-Oktenal	7	0,499 – 748	0,00121	0,000421	1,0000	0,0138	0,0461	
Nonanal	9	0,821 – 328	0,00136	0,00538	1,0000	0,0837	0,279	
(E)-2-Nonenal	7	0,154 – 30,9	0,00153	0,00118	0,9999	0,0161	0,0538	
(E,E)-2,4-Nonadienal	6	2,01 – 201	0,00328	-0,00370	1,0000	0,0920	0,307	
Dekanal	8	0,388 – 77,5	0,000843	0,000423	0,9999	0,00796	0,0265	
(E,E)-2,4-Dekadienal	10	2,07 – 1036	0,00104	0,00548	1,0000	0,0605	0,202	
Benzaldehid	6	0,800 – 160	0,00669	0,00310	1,0000	0,0168	0,0560	
Fenilacetaldehid	7	1,62 – 1623	0,00145	-0,000535	0,9999	0,114	0,381	
<b>Ketoni</b>								
2-Butanon	11	27,6 – 55123	0,0000746	0,00697	0,9997	3,62	12,1	
2,3-Butandion	5	78,0 – 7801	0,0000136	0,00168	1,0000	17,3	57,7	
2,3-Pentandion	7	38,4 – 768	0,0000663	0,0000120	0,9998	7,48	24,9	
2-Heptanon	8	0,398 – 79,6	0,00205	0,00330	0,9999	0,110	0,368	
6-Metil-5-hepten-2-on	7	0,772 – 154	0,00305	0,0000372	1,0000	0,102	0,340	
2-Oktanon	7	0,161 – 32,2	0,00360	0,0000504	1,0000	0,00645	0,0215	

\*dvije kalibracijske krivulje radi postizanja linearnosti u okviru područja metode

**Tablica 12.** Područje, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha – nastavak

	Koncentracijske razine kalibracijske krivulje	Područje ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Jednadžba kalibracijske krivulje, $y = ax + b$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Koefficient korelacije (r)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
			a	b				
<b>Alkoholi</b>								
2-Metil-1-propanol	9	399 – 119760	0,0000126	-0,000400	1,0000	94,5	315	
3-Metil-1-butanol	8	181 – 27150	0,0000525	0,00375	0,9999	17,7	58,9	
1-Pentanol*	5	788 – 7880	0,0000894	0,0275	0,9988	9,33	31,1	
	6	39,4 – 788	0,000116	-0,000148	0,9999			
1-Heksanol	9	167 – 15029	0,000529	0,00816	0,9999	0,509	1,70	
(Z)-3-Heksenol	10	2,27 – 328	0,000236	-0,0000366	0,9999	0,524	1,75	
2-Etil-1-heksanol	6	2,40 – 80,0	0,00487	0,000388	0,9999	0,0000490	0,0001633	
1-Heptanol	9	2,12 – 847	0,00113	0,0246	0,9990	0,489	1,63	
1-Oktanol	8	1,95 – 390	0,00197	0,00642	0,9998	0,424	1,41	
(E)-2-Okten-1-ol	10	2,05 – 819	0,00211	-0,000662	0,9998	0,163	0,543	
1-Okten-3-ol	7	4,04 – 404	0,00467	0,00802	1,0000	0,201	0,669	
(Z)-3-Nonen-1-ol	7	0,776 – 77,6	0,00158	-0,0000139	0,9998	0,227	0,756	
Fenilmetanol	8	39,2 – 7840	0,000161	0,000414	0,9999	5,23	17,4	
2-Feniletanol	5	3,90 – 1170	0,00133	-0,00485	0,9998	0,000198	0,000660	
<b>Kiseline</b>								
2-Metilbutanska kiselina	6	234 – 11701	0,00000919	-0,000814	0,9998	37,2	124	
Pentanska kiselina	5	159 – 1592	0,00000296	-0,0000425	0,9990	12,3	40,9	
Heksanska kiselina	5	1505 – 225792	0,0000216	-0,0317	1,0000	0,476	1,59	
Heptanska kiselina*	5	77,6 – 1164	0,0000152	-0,000428	0,9997	0,466	1,55	
	4	1164 – 23285	0,0000707	-0,0641	0,9999			
Oktanska kiselina	7	15,8 – 1576	0,000551	-0,00429	0,9998	0,0959	0,320	
Dekanska kiselina	9	23,6 – 9441	0,0000642	0,0000363	0,9999	0,0685	0,228	
Benzojeva kiselina	9	160 – 6397	0,0000098	0,000737	0,9999	0,0261	0,0871	

\*dvije kalibracijske krivulje radi postizanja linearnosti u okviru područja metode

**Tablica 12.** Područje, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha – nastavak

	Koncentracijske razine kalibracijske krivulje	Područje ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Jednadžba kalibracijske krivulje, $y = ax + b$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Koefficient korelacije (r)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
			a	b				
<b>Esteri</b>								
Etil-heksanoat	7	0,404 – 24,2	0,0171	-0,00344	1,0000	0,0534	0,178	
Etil-oktanoat	7	0,382 – 153	0,0130	-0,00321	0,9999	0,0106	0,0354	
Etil-tetradekanoat	7	2,21 – 886	0,0000497	0,000144	1,0000	0,617	2,06	
Etil-heksadekanoat	6	0,520 – 20,8	0,00157	0,000157	0,9997	0,00379	0,0126	
Etil-benzoat	6	0,230 – 7,68	0,0151	-0,00166	0,9999	0,0549	0,183	
<b>Aromatski ugljikovodici</b>								
Stiren	8	2,40 – 278	0,00162	-0,00122	0,9997	0,0769	0,256	
Toluen	6	0,0380 – 11,4	0,00287	0,0000440	0,9998	0,00868	0,0289	
<b>Fenoli</b>								
Fenol	6	19,5 – 1950	0,000317	-0,00792	0,9999	0,0691	0,230	
2-Metoksi-4-vinilfenol	6	57,0 – 42720	0,000194	-0,000630	0,9999	0,175	0,584	
<b>Sumporni spojevi</b>								
Dimetil-disulfid	6	3,88 – 621	0,000475	-0,00147	0,9999	0,790	2,63	
<b>Pirazini</b>								
2-Metilpirazin	7	14,7 – 1099	0,000297	0,00135	1,0000	3,88	12,9	
2-Etilpirazin	7	1,68 – 168	0,000716	-0,000292	1,0000	0,367	1,22	
2,5-Dimetilpirazin	8	9,60 – 480	0,000872	-0,00115	0,9999	2,66	8,86	
2,6-Dimetilpirazin	6	3,36 – 336	0,000726	0,000355	0,9999	0,922	3,07	
2,3,5-Trimetilpirazin	6	1,58 – 158	0,00130	0,00158	1,0000	0,420	1,40	
2-Etil-5(6)-etilpirazin	6	1,59 – 318	0,00236	-0,00163	0,9999	0,386	1,29	
<b>Pirol</b>								
2-Acetilpirol	6	16,2 – 2428	0,000127	-0,00181	0,9998	0,168	0,561	
<b>Furani</b>								
2-Acetilfuran	7	1,57 – 118	0,000974	-0,000827	0,9999	0,432	1,44	
Furfural	6	9,41 – 314	0,000702	0,000111	0,9999	2,44	8,13	
2-Furanmetanol	7	115 – 9173	0,0000808	-0,000484	0,9999	28,4	94,7	

\*dviije kalibracijske krivulje radi postizanja linearnosti u okviru područja metode

**Tablica 13.** Preciznost (ponovljivost i međupreciznost) HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha

	Koncentracija ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ponovljivost, RSD (%)	Međupreciznost, RSD (%)
<b>Aldehidi</b>			
<b>2-Metilbutanal</b>	203	2,0	10,1
	20300	3,4	5,7
<b>3-Metilbutanal</b>	73,3	9,9	12,8
	7330	5,3	5,7
<b>Pentanal</b>	38,8	6,3	9,9
	388	4,0	6,0
<b>Heksanal</b>	81,5	3,4	14,2
	8154	2,2	7,2
<b>(E)-2-Heksenal</b>	4,03	5,0	6,4
	72,6	0,5	-
<b>Heptanal</b>	4,16	6,4	7,0
	41,6	5,1	8,9
<b>(E)-2-Heptenal</b>	48,8	0,5	6,7
	488	2,3	3,6
<b>Oktanal</b>	0,386	13,7	18,0
	3,86	6,6	10,5
<b>(E)-2-Oktenal</b>	4,99	4,9	5,3
	499	1,0	2,5
<b>Nonanal</b>	0,000205	3,3	17,2
	0,0205	1,9	5,8
<b>(E)-2-Nonenal</b>	0,772	18,2	21,4
	7,72	1,4	9,7
<b>(E,E)-2,4-Nonadienal</b>	10,0	2,2	17,8
	100	3,6	10,6
<b>Dekanal</b>	1,94	6,5	9,8
	19,4	6,1	6,8
<b>(E,E)-2,4-Dekadienal</b>	10,4	15,9	16,9
	104	2,1	8,2
<b>Benzaldehid</b>	0,800	5,5	9,6
	80,0	0,9	4,2
<b>Fenilacetaldehid</b>	8,11	7,1	10,0
	811	0,8	5,8
<b>Ketoni</b>			
<b>2-Butanon</b>	138	9,7	21,8
	13781	3,7	8,7
<b>2,3-Butandion</b>	78	8,4	14,1
	780	5,8	6,6
<b>2,3-Pentandion</b>	38,4	3,2	10,1
	384	2,4	6,7
<b>2-Heptanon</b>	0,398	6,7	19,1
	39,8	3,2	6,5
<b>6-Metil-5-hepten-2-on</b>	0,772	0,6	12,6
	77,2	3,5	3,6
<b>2-Oktanon</b>	0,161	9,2	10,6
	16,1	2,6	3,3

(-) koncentracija na kojoj je određena međupreciznost izvan kalibracijske krivulje

**Tablica 13.** Preciznost (ponovljivost i međupreciznost) HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha – nastavak

	Koncentracija ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ponovljivost, RSD (%)	Međupreciznost, RSD (%)
<b>Alkoholi</b>			
<b>2-Metil-1-propanol</b>	399	8,1	12,8
	39920	2,7	9,4
<b>3-Metil-1-butanol</b>	181	5,9	12,0
	18100	3,4	11,4
<b>1-Pentanol</b>	39,4	4,9	10,9
	3940	2,6	3,7
<b>1-Heksanol</b>	835	2,6	4,6
	15029	3,6	-
<b>(Z)-3-Heksenol</b>	3,78	5,6	8,5
	37,8	3,2	9,0
<b>2-Etil-1-heksanol</b>	4,00	11,7	12,2
	40,0	5,5	7,5
<b>1-Heptanol</b>	2,12	3,9	4,4
	212	3,6	4,3
<b>1-Oktanol</b>	1,95	5,2	11,9
	195	3,4	3,9
<b>(E)-2-Okten-1-ol</b>	2,05	8,9	10,8
	205	2,4	7,1
<b>1-Okten-3-ol</b>	20,2	0,7	7,0
	202	3,0	4,1
<b>(Z)-3-Nonen-1-ol</b>	3,88	7,5	12,1
	38,8	2,6	5,8
<b>Fenilmetanol</b>	196	5,1	8,9
	1960	2,7	6,9
<b>2-Feniletanol</b>	3,90	10,9	22,9
	390	3,5	11,5
<b>Kiseline</b>			
<b>2-Metilbutanska kiselina</b>	390	7,8	11,6
	3900	1,4	6,3
<b>Pentanska kiselina</b>	796	9,2	10,7
	7960	4,9	7,5
<b>Heksanska kiselina</b>	7526	8,3	9,7
	75264	1,0	9,8
<b>Heptanska kiselina</b>	77,6	11,6	10,9
	7762	0,7	14,0
<b>Oktanska kiselina</b>	78,8	18,9	18,4
	788	0,3	8,5
<b>Dekanska kiselina</b>	23,6	14,4	21,4
	2360	6,3	10,1
<b>Benzojeva kiselina</b>	160	5,9	8,2
	1599	5,0	16,8

(-) koncentracija na kojoj je određena međupreciznost izvan kalibracijske krivulje

**Tablica 13.** Preciznost (ponovljivost i međupreciznost) HS-SPME/GC-MS metode za određivanje profila hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha – nastavak

	Koncentracija ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ponovljivost, RSD (%)	Međupreciznost, RSD (%)
<b>Esteri</b>			
<b>Etil-heksanoat</b>	0,404	8,6	12,2
	4,04	5,5	5,5
<b>Etil-oktanoat</b>	0,382	2,1	11,2
	38,2	3,7	7,8
<b>Etil-tetradekanoat</b>	2,21	4,0	21,3
	221	5,9	31,2
<b>Etil-heksadekanoat</b>	0,520	8,3	23,8
	5,20	4,4	13,0
<b>Etil-benzoat</b>	0,384	4,1	12,8
	3,84	2,2	4,1
<b>Aromatski ugljikovodici</b>			
<b>Stiren</b>	1,60	8,0	17,7
	16,0	5,1	7,3
<b>Toluen</b>	0,0380	10,7	14,6
	0,380	2,8	19,3
<b>Fenoli</b>			
<b>Fenol</b>	19,5	9,8	11,1
	1950	0,3	2,4
<b>2-Metoksi-4-vinilfenol</b>	285	6,8	15,0
	28480	2,9	8,5
<b>Sumporni spojevi</b>			
<b>Dimetil-disulfid</b>	3,88	11,7	17,7
	38,8	5,8	11,9
<b>Pirazini</b>			
<b>2-Metilpirazin</b>	73,3	3,2	6,6
	733	6,8	8,8
<b>2-Etilpirazin</b>	8,40	1,0	3,8
	84,0	2,3	6,8
<b>2,5-Dimetilpirazin</b>	16,0	0,3	16,4
	160	2,6	5,7
<b>2,6-Dimetilpirazin</b>	16,8	2,4	8,2
	168	3,5	7,5
<b>2,3,5-Trimetilpirazin</b>	7,92	1,8	6,3
	79,2	2,9	4,5
<b>2-Etil-5(6)-metilpirazin</b>	1,59	4,2	5,0
	159	1,5	3,0
<b>Pirol</b>			
<b>2-Acetilpirol</b>	16,2	12,0	17,1
	1618	2,2	6,0
<b>Furani</b>			
<b>2-Acetilfuran</b>	7,84	5,3	12,1
	78,4	0,7	4,8
<b>Furfural</b>	15,7	0,9	7,0
	157	1,9	3,9
<b>2-Furanmetanol</b>	764	7,7	11,9
	7644	1,0	-

(-) koncentracija na kojoj je određena međupreciznost izvan kalibracijske krivulje

International Conference on Harmonization (ICH) definira linearnost kao mogućnost postizanja rezultata koji su direktno proporcionalni količini analita u uzorku, unutar definiranog područja metode (ICH, 2005). Općenito se koeficijent korelacije kalibracijske krivulje veći od 0,999 smatra kriterijem prihvatljivosti za linearnost metode (Green, 1996). Dobiveni koeficijent korelacije kalibracijskih krivulja hlapljivih spojeva arome iznosili su  $\geq 0,9990$  (tablica 12) što je u skladu s postavljenim kriterijem prihvatljivosti.

Preciznost predstavlja blizinu slaganja rezultata ponovljenih mjerenja na istom uzorku pri definiranim uvjetima. Ponovljivost obuhvaća preciznost pri istim uvjetima analize u kratkom vremenskom roku, a međupreciznost varijacije pri namjernim promjenama nekih uvjeta unutar laboratorija (različiti dan analize, analitičar, kemikalije, uređaji) (ICH, 2005). Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost metode razlikuju se ovisno o koncentraciji analita: za koncentraciju 100 ppm – RSD do 5,3 %; 10 ppm – RSD do 7,3 %; 1 ppm – RSD do 11 %; 100 ppb – RSD do 15 %; 10 ppb – RSD do 21 %; 1 ppb – RSD do 30 % (AOAC Peer Verified Methods Advisory Committee, 1998). Sve izračunate relativne standardne devijacije u uvjetima ponovljivosti (tablica 13) zadovoljavale su kriterij prihvatljivosti. RSD vrijednost se pri određivanju ponovljivosti metode za sve analizirane spojeve nalazila u rasponu od 0,3 % do 18,9 %, a pri određivanju međupreciznosti od 2,4 % do 31,2 %.

ICH definira granicu detekcije kao najmanju količinu analita u uzorku koju je moguće detektirati, a granicu kvantifikacije kao najmanju količinu analita u uzorku koju je moguće kvantificirati uz prihvatljivu preciznost i točnost (ICH, 2005). Ovisno o analiziranom spoju, granica detekcije nalazila se u rasponu od 49,0 pg kg<sup>-1</sup> do 94,5 µg kg<sup>-1</sup>, a granica kvantifikacije u rasponu od 163 pg kg<sup>-1</sup> do 315 µg kg<sup>-1</sup> (tablica 12).

Budući da su zadovoljeni postavljeni kriteriji prihvatljivosti za sve analizirane validacijske parametre, navedena HS-SPME/GC-MS metoda može se smatrati prikladnom za namijenjenu svrhu.

#### 4.2.3. Profil hlapljivih spojeva arome

##### 4.2.3.1. Profil hlapljivih spojeva arome u različitim fazama pripreme kruha

Tijekom proizvodnje kruha, hlapljivi spojevi arome nastaju uslijed metaboličke aktivnosti kvasaca i bakterija mliječne kiseline, oksidacije lipida, Maillardove reakcije, reakcija karamelizacije i toplinske degradacije šećera i aminokiselina (Pico i sur., 2015). Nastanak i koncentracija nastalih pojedinih hlapljivih spojeva arome ovisi o primijenjenim sirovinama,



odnosno prekursorima hlapljivih spojeva arome i hlapljivim spojevima arome prisutnim u njima, metabolizmu primijenjenih specifičnih bakterija mliječne kiseline i kvasaca, uvjetima proizvodnje i interakcijama navedenih faktora te se razlikuju u različitim fazama proizvodnje kruha (Czerny i Schieberle, 2002; Damiani i sur., 1996; Hansen i Hansen, 1994a; Rehman i sur., 2006). U ovom istraživanju određena je koncentracija 16 aldehida, šest ketona, 13 alkohola, sedam kiselina, pet estera, dva aromatska ugljikovodika, dva fenola, jednog sumpornog spoja, šest pirazina, jednog pirola i tri furana u četiri faze tijekom pripreme kruha – kiselom tijestu, krušnom tijestu prije i nakon krušne fermentacije te u kruhu i kori kruha.

Rezultati određivanja profila hlapljivih spojeva arome u različitim fazama pripreme kruha po skupinama spojeva nalaze se u tablicama od 14 do 20.

**Tablica 14.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	2-Metilbutanal			3-Metilbutanal			Pentanal			Heksanal			(E)-2-Heksenal			Heptanal		
<b>KT</b>																		
<b>0-G</b>	nd			nd			49,3 ± 7,4	b	4421 ± 410	b	4,13 ± 0,43	b	29,47 ± 0,88	c				
<b>LR-G</b>	nd			nd			20,9 ± 1,3	b	735 ± 98	ef	nd	b	16,53 ± 0,98	de				
<b>LB-G</b>	nd			nd			22,6 ± 3,1	b	876 ± 137	ef	nd	b	17,75 ± 2,48	de				
<b>LF-G</b>	nd			nd			15,3 ± 1,9	b	398 ± 45	f	nd	b	9,01 ± 0,21	e				
<b>0+G</b>	nd			nd			274,2 ± 29,4	a	19147 ± 689	a	40,35 ± 3,71	a	121,22 ± 7,75	a				
<b>LR+G</b>	nd			nd			59,4 ± 4,8	b	2325 ± 69	cd	3,44 ± 0,56	b	22,84 ± 4,13	cd				
<b>LB+G</b>	nd			nd			65,8 ± 4,4	b	2911 ± 339	c	4,89 ± 0,21	b	45,71 ± 5,45	b				
<b>LF+G</b>	nd			nd			32,3 ± 3,7	b	1491 ± 193	de	2,90 ± 0,17	b	16,59 ± 0,16	de				
<b>T0</b>																		
<b>0-G</b>	189,5 ± 4,7	c	266,0 ± 9,3	c	28,2 ± 3,7	d	3584 ± 335	b	5,12 ± 0,23	c	42,71 ± 2,90	bc						
<b>LR-G</b>	354,4 ± 37,1	ab	324,5 ± 8,2	c	23,0 ± 2,3	d	2419 ± 457	b	4,42 ± 0,38	c	23,72 ± 2,08	c						
<b>LB-G</b>	252,4 ± 24,0	bc	412,8 ± 23,8	b	20,0 ± 3,4	d	2996 ± 115	b	5,41 ± 0,49	c	24,27 ± 2,67	c						
<b>LF-G</b>	358,1 ± 52,8	a	521,7 ± 13,8	a	17,3 ± 1,0	d	3345 ± 664	b	4,86 ± 0,36	c	21,51 ± 4,31	c						
<b>0+G</b>	197,8 ± 13,3	c	181,6 ± 22,3	d	145,0 ± 13,0	bc	7981 ± 653	a	22,86 ± 1,94	b	67,07 ± 3,94	a						
<b>LR+G</b>	259,3 ± 22,2	ac	248,9 ± 7,4	cd	133,5 ± 16,2	c	9484 ± 1252	a	28,90 ± 3,37	a	55,18 ± 9,60	ab						
<b>LB+G</b>	251,5 ± 27,3	c	306,9 ± 40,6	c	162,3 ± 6,8	b	10153 ± 924	a	30,99 ± 1,78	a	71,16 ± 5,79	a						
<b>LF+G</b>	208,4 ± 8,4	c	274,1 ± 14,3	c	197,4 ± 4,5	a	9961 ± 1288	a	27,75 ± 2,07	ab	70,05 ± 4,96	a						
<b>TF</b>																		
<b>0-G</b>	329,3 ± 35,2	a	274,2 ± 26,7	ab	28,7 ± 3,7	b	1969 ± 256	b	4,32 ± 0,70	c	21,83 ± 1,67	c						
<b>LR-G</b>	266,1 ± 23,1	ab	203,9 ± 13,0	bc	21,7 ± 3,7	b	2227 ± 123	b	4,50 ± 0,31	c	16,42 ± 2,10	c						
<b>LB-G</b>	215,1 ± 36,0	b	243,3 ± 12,7	ac	19,5 ± 1,8	b	2767 ± 340	b	5,83 ± 0,29	c	20,33 ± 1,49	c						
<b>LF-G</b>	224,9 ± 7,7	b	302,4 ± 10,5	a	17,6 ± 1,2	b	2459 ± 263	b	4,93 ± 0,11	c	12,71 ± 1,93	c						
<b>0+G</b>	288,7 ± 23,5	ab	215,8 ± 12,3	bc	164,7 ± 16,8	a	10669 ± 880	a	22,35 ± 2,39	b	73,74 ± 4,43	ab						
<b>LR+G</b>	238,8 ± 34,1	b	206,1 ± 35,4	bc	184,2 ± 7,8	a	12230 ± 1832	a	23,77 ± 2,57	b	65,01 ± 8,40	b						
<b>LB+G</b>	217,4 ± 24,1	b	269,6 ± 5,6	ab	187,5 ± 25,9	a	11160 ± 1805	a	32,33 ± 2,51	a	85,91 ± 7,58	a						
<b>LF+G</b>	114,5 ± 10,5	c	183,3 ± 21,9	c	190,3 ± 28,0	a	11189 ± 1362	a	20,20 ± 2,56	b	62,57 ± 9,92	b						

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 14.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	2-Metilbutanal			3-Metilbutanal			Pentanal			Heksanal			(E)-2-Heksenal			Heptanal								
<b>KRUH</b>																								
<b>0-G</b>	70,7	±	8,3	de	65,3	±	10,5	ef	28,3	±	1,8	b	1058	±	37	d	2,48	±	0,19	d	54,92	±	1,65	b
<b>LR-G</b>	57,3	±	5,4	e	51,1	±	5,9	f	21,4	±	4,4	b	724	±	47	e	2,44	±	0,05	d	33,50	±	3,57	c
<b>LB-G</b>	191,8	±	8,0	b	163,9	±	23,0	c	16,2	±	1,6	b	864	±	29	ef	1,67	±	0,20	d	38,89	±	0,35	c
<b>LF-G</b>	111,5	±	9,0	cd	120,2	±	14,1	d	23,8	±	4,5	b	880	±	40	f	2,18	±	0,18	d	30,84	±	4,61	c
<b>0+G</b>	108,0	±	2,3	cd	98,4	±	15,1	de	46,1	±	3,0	a	3067	±	112	a	5,89	±	0,28	ab	65,33	±	3,32	b
<b>LR+G</b>	150,8	±	19,9	bc	90,7	±	3,3	df	51,5	±	3,9	a	2491	±	63	bc	5,88	±	0,66	b	61,80	±	4,00	b
<b>LB+G</b>	323,4	±	43,7	a	292,3	±	16,2	a	52,4	±	5,3	a	2603	±	23	b	7,12	±	0,30	a	79,29	±	7,55	a
<b>LF+G</b>	277,3	±	16,8	a	222,2	±	12,9	b	52,6	±	3,7	a	2391	±	151	c	3,82	±	0,41	c	62,93	±	5,45	b
<b>KORA</b>																								
<b>0-G</b>	394,9	±	50,2	de	256,6	±	16,1	e	37,6	±	1,2	b	1153	±	179	c	1,78	±	0,24	e	59,60	±	5,16	b
<b>LR-G</b>	336,5	±	37,2	e	184,0	±	27,7	e	41,1	±	2,9	b	1034	±	166	c	2,68	±	0,22	de	45,99	±	3,72	cd
<b>LB-G</b>	847,4	±	112,7	c	652,9	±	52,6	c	26,5	±	5,0	c	1012	±	32	c	1,93	±	0,17	e	49,05	±	1,25	bd
<b>LF-G</b>	544,7	±	50,8	d	533,9	±	27,4	d	32,1	±	2,5	bc	919	±	90	c	1,60	±	0,02	e	26,09	±	1,06	e
<b>0+G</b>	519,8	±	20,9	de	253,7	±	22,2	e	58,9	±	3,4	b	3047	±	108	ab	4,16	±	0,16	bc	56,28	±	3,86	bc
<b>LR+G</b>	1119,9	±	99,9	b	513,4	±	35,5	d	77,1	±	5,7	a	3379	±	231	a	5,21	±	0,47	a	71,03	±	8,05	a
<b>LB+G</b>	2157,1	±	100,7	a	1524,1	±	91,7	a	65,4	±	4,0	b	2926	±	212	ab	4,94	±	0,54	ab	75,19	±	4,21	a
<b>LF+G</b>	1184,4	±	69,5	b	932,2	±	57,6	b	66,2	±	2,2	b	2811	±	381	b	3,55	±	0,52	cd	47,96	±	3,64	bd

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 14.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	<i>(E)</i> -2-Heptenal			Oktanal			<i>(E)</i> -2-Oktenal			Nonanal			<i>(E)</i> -2-Nonenal		
<b>KT</b>															
<b>0-G</b>	42,0	± 1,9	cd	8,02	± 0,42	cd	28,46	± 1,87	c	19,07	± 1,34	cd	8,071	± 0,527	c
<b>LR-G</b>	41,7	± 1,4	cd	8,45	± 0,14	cd	16,51	± 1,24	cd	17,83	± 0,75	cd	6,914	± 0,191	c
<b>LB-G</b>	48,0	± 8,0	cd	9,37	± 0,39	bd	23,90	± 4,17	c	19,19	± 5,78	cd	7,663	± 0,376	c
<b>LF-G</b>	17,5	± 1,1	d	4,40	± 0,37	e	6,53	± 0,85	d	3,38	± 0,57	e	1,058	± 0,135	e
<b>0+G</b>	670,7	± 34,4	a	19,62	± 1,66	a	294,57	± 15,93	a	87,05	± 4,57	a	25,670	± 1,976	a
<b>LR+G</b>	69,5	± 8,0	c	9,94	± 0,74	bc	29,08	± 4,81	c	23,28	± 2,48	c	5,983	± 0,315	cd
<b>LB+G</b>	124,2	± 23,2	b	11,69	± 0,35	b	64,08	± 2,13	b	46,38	± 5,73	b	13,840	± 0,853	b
<b>LF+G</b>	40,2	± 6,0	d	5,38	± 0,65	e	20,92	± 3,61	c	11,31	± 0,79	de	3,673	± 0,090	de
<b>T0</b>															
<b>0-G</b>	23,9	± 1,8	c	5,05	± 0,53	d	12,99	± 0,19	d	10,25	± 1,27	c	8,217	± 0,474	d
<b>LR-G</b>	27,0	± 4,6	c	5,31	± 0,72	d	15,34	± 2,49	d	11,32	± 1,78	c	5,082	± 0,276	de
<b>LB-G</b>	26,4	± 2,3	c	5,50	± 0,62	d	15,05	± 1,03	d	10,21	± 1,52	c	7,785	± 0,899	d
<b>LF-G</b>	16,1	± 2,9	c	3,78	± 0,33	d	9,75	± 0,39	d	4,74	± 0,22	c	3,934	± 0,236	e
<b>0+G</b>	302,5	± 9,2	b	8,19	± 0,62	c	105,92	± 5,97	c	27,50	± 3,02	b	13,278	± 0,822	c
<b>LR+G</b>	409,8	± 19,4	a	12,14	± 1,21	b	126,95	± 7,70	bc	37,43	± 5,07	a	18,579	± 1,564	b
<b>LB+G</b>	440,4	± 34,8	a	16,33	± 1,30	a	185,58	± 10,32	a	45,27	± 5,95	a	28,440	± 1,849	a
<b>LF+G</b>	420,6	± 43,4	a	14,43	± 0,64	ab	141,07	± 14,30	b	45,19	± 4,75	a	18,110	± 2,405	b
<b>TF</b>															
<b>0-G</b>	21,6	± 2,2	c	4,43	± 0,32	c	11,23	± 1,56	c	5,63	± 0,82	d	4,998	± 0,459	d
<b>LR-G</b>	27,3	± 1,9	c	4,94	± 0,21	c	14,32	± 1,25	c	3,41	± 0,08	d	4,562	± 0,411	d
<b>LB-G</b>	27,0	± 1,7	c	4,96	± 0,41	c	14,53	± 1,79	c	6,28	± 0,00	d	6,266	± 0,688	d
<b>LF-G</b>	16,6	± 2,6	c	3,12	± 0,34	c	8,20	± 1,15	c	1,54	± 0,06	d	3,107	± 0,316	d
<b>0+G</b>	334,9	± 15,1	b	14,24	± 1,68	b	128,83	± 1,92	b	35,17	± 0,96	bc	12,317	± 1,024	c
<b>LR+G</b>	496,4	± 25,2	a	15,24	± 0,86	b	169,34	± 19,28	a	37,27	± 1,00	ab	19,880	± 2,093	ab
<b>LB+G</b>	471,3	± 40,8	a	20,41	± 2,81	a	191,65	± 17,01	a	46,19	± 5,46	a	22,435	± 2,006	a
<b>LF+G</b>	334,7	± 32,8	b	17,58	± 2,48	ab	113,47	± 10,41	b	25,81	± 3,49	c	14,946	± 2,286	bc

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 14.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	<i>(E)</i> -2-Heptenal			Oktanal			<i>(E)</i> -2-Oktenal			Nonanal			<i>(E)</i> -2-Nonenal							
<b>KRUH</b>																				
<b>0-G</b>	31,3	±	2,7	de	8,73	±	0,38	cef	9,88	±	0,39	de	14,58	±	1,29	d	2,009	±	0,185	d
<b>LR-G</b>	38,1	±	5,5	cd	8,91	±	1,13	bdf	13,48	±	2,41	d	16,09	±	2,15	cd	4,082	±	0,159	c
<b>LB-G</b>	26,1	±	1,1	ef	7,15	±	0,61	de	8,00	±	0,25	de	10,33	±	0,35	e	1,694	±	0,161	d
<b>LF-G</b>	22,7	±	1,7	f	8,60	±	1,17	cd	7,55	±	1,13	e	11,17	±	0,53	e	1,370	±	0,161	d
<b>0+G</b>	42,8	±	3,7	c	10,47	±	0,89	bc	26,59	±	2,67	c	19,62	±	1,54	bc	4,154	±	0,384	c
<b>LR+G</b>	75,3	±	5,2	a	11,34	±	0,54	b	48,50	±	4,09	a	21,94	±	0,52	b	10,712	±	0,917	a
<b>LB+G</b>	58,8	±	1,3	b	14,23	±	1,11	a	38,80	±	4,53	b	30,50	±	1,92	a	6,630	±	0,752	b
<b>LF+G</b>	44,5	±	4,3	c	10,79	±	1,18	bc	24,90	±	2,26	c	19,42	±	1,55	bc	3,915	±	0,467	c
<b>KORA</b>																				
<b>0-G</b>	34,5	±	2,7	e	7,76	±	0,20	bd	7,83	±	0,97	d	12,51	±	1,64	d	2,504	±	0,287	d
<b>LR-G</b>	49,0	±	2,7	bc	9,77	±	1,05	bc	13,65	±	1,01	c	12,92	±	0,03	d	4,878	±	0,728	c
<b>LB-G</b>	33,1	±	2,6	e	7,47	±	0,94	cd	7,95	±	0,35	d	9,77	±	0,95	d	2,636	±	0,372	d
<b>LF-G</b>	20,1	±	2,2	f	5,19	±	0,44	d	4,49	±	0,23	d	4,36	±	0,31	e	0,793	±	0,138	e
<b>0+G</b>	44,6	±	1,8	cd	9,35	±	0,56	bc	19,66	±	2,01	b	17,64	±	0,73	c	4,296	±	0,177	c
<b>LR+G</b>	74,7	±	2,5	a	13,98	±	1,63	a	35,00	±	2,24	a	23,29	±	0,98	b	11,020	±	0,623	a
<b>LB+G</b>	56,2	±	2,3	b	15,18	±	1,04	a	32,02	±	1,16	a	31,69	±	1,87	a	9,183	±	0,510	b
<b>LF+G</b>	36,6	±	5,7	de	10,60	±	1,51	b	17,29	±	2,62	bc	12,84	±	0,79	d	3,867	±	0,350	cd

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 14.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	<i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal				Dekanal			<i>(E,E)</i> -2,4-Dekadienal			Benzaldehid			Fenilacetaldehid						
<b>KT</b>																				
<b>0-G</b>	9,22	±	0,30	c	11,89	±	0,56	cd	7,92	±	0,43	c	23,31	±	0,95	a	10,83	±	0,29	cd
<b>LR-G</b>	5,49	±	0,47	cd	13,91	±	0,59	bc	10,03	±	1,31	c	13,36	±	2,13	b	11,46	±	2,16	c
<b>LB-G</b>	6,40	±	0,70	cd	14,12	±	0,12	bc	17,15	±	2,52	c	16,19	±	1,23	b	9,22	±	1,09	cd
<b>LF-G</b>	2,82	±	0,21	d	6,03	±	0,44	e	< LOQ			c	7,29	±	1,74	c	6,32	±	0,81	d
<b>0+G</b>	108,39	±	3,61	a	18,18	±	0,60	a	186,74	±	21,90	a	24,86	±	4,20	a	13,19	±	2,05	bc
<b>LR+G</b>	10,40	±	1,61	c	15,77	±	1,84	ab	23,21	±	0,78	c	21,92	±	2,26	a	28,48	±	2,27	a
<b>LB+G</b>	38,04	±	5,88	b	18,29	±	1,08	a	95,40	±	15,68	b	15,40	±	0,88	b	17,29	±	1,76	b
<b>LF+G</b>	7,94	±	1,18	c	8,11	±	0,22	de	13,33	±	0,17	c	13,07	±	1,68	bc	10,72	±	2,13	cd
<b>T0</b>																				
<b>0-G</b>	6,18	±	0,64	c	18,38	±	2,05	bc	4,64	±	0,55	d	41,79	±	1,22	bcd	38,55	±	2,73	bc
<b>LR-G</b>	6,43	±	0,86	c	13,56	±	1,39	cd	4,40	±	2,58	d	34,67	±	4,10	d	48,56	±	6,83	ab
<b>LB-G</b>	6,92	±	1,38	c	13,29	±	1,64	cd	6,99	±	0,79	d	48,29	±	1,28	abc	55,14	±	1,50	a
<b>LF-G</b>	3,81	±	0,73	c	8,27	±	0,73	d	6,60	±	1,47	d	25,40	±	4,70	e	32,77	±	1,06	ce
<b>0+G</b>	61,17	±	2,93	b	22,26	±	0,95	ab	151,93	±	6,05	c	45,63	±	1,54	abc	17,66	±	0,91	f
<b>LR+G</b>	78,91	±	2,88	ab	20,08	±	3,02	b	262,65	±	20,55	a	54,23	±	5,75	a	33,73	±	5,23	ce
<b>LB+G</b>	87,61	±	12,77	a	29,12	±	2,84	a	213,32	±	7,71	b	50,44	±	5,19	ab	34,81	±	0,95	cd
<b>LF+G</b>	68,57	±	8,98	b	17,46	±	3,36	bc	195,57	±	17,93	b	38,56	±	2,74	cd	22,32	±	2,84	def
<b>TF</b>																				
<b>0-G</b>	5,10	±	0,62	d	15,12	±	1,90	d	3,02	±	0,14	d	34,91	±	5,63	bc	44,04	±	1,97	ab
<b>LR-G</b>	5,17	±	0,40	d	13,82	±	1,61	d	23,24	±	4,02	d	37,61	±	3,61	bc	45,57	±	0,37	ab
<b>LB-G</b>	5,29	±	0,46	d	17,41	±	2,00	cd	17,16	±	3,31	d	44,45	±	3,95	ab	52,27	±	2,81	a
<b>LF-G</b>	3,45	±	0,41	d	7,09	±	1,41	e	4,35	±	0,06	d	23,67	±	2,15	c	33,49	±	4,93	cd
<b>0+G</b>	58,52	±	5,61	c	27,96	±	1,83	a	82,72	±	9,12	c	58,91	±	8,67	a	27,16	±	0,56	d
<b>LR+G</b>	81,53	±	7,90	b	20,59	±	0,77	bc	139,67	±	5,22	ab	48,06	±	5,98	ab	39,64	±	4,66	bc
<b>LB+G</b>	96,49	±	6,34	a	23,60	±	1,36	ab	168,59	±	24,15	a	48,16	±	5,29	ab	34,58	±	1,43	bd
<b>LF+G</b>	54,66	±	4,38	c	7,09	±	0,42	e	105,74	±	10,52	bc	34,27	±	3,72	bc	23,29	±	1,61	d

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 14.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	<i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal			Dekanal			<i>(E,E)</i> -2,4-Dekadienal			Benzaldehid			Fenilacetaldehid							
<b>KRUH</b>																				
<b>0-G</b>	3,47	±	0,14	df	18,56	±	1,50	bc	32,66	±	3,23	e	28,44	±	1,53	ce	20,29	±	0,51	de
<b>LR-G</b>	4,63	±	0,40	cef	16,38	±	1,57	cd	106,83	±	9,69	d	32,49	±	2,00	ac	18,52	±	2,09	e
<b>LB-G</b>	3,01	±	0,06	ef	12,99	±	0,70	de	26,68	±	1,99	e	23,47	±	2,38	def	38,74	±	4,06	b
<b>LF-G</b>	2,84	±	0,37	f	10,36	±	1,75	e	18,29	±	1,93	e	20,47	±	1,76	f	28,38	±	2,18	cd
<b>0+G</b>	5,79	±	0,82	c	21,91	±	1,53	b	158,32	±	15,21	c	38,33	±	0,65	ab	30,26	±	0,69	bd
<b>LR+G</b>	17,34	±	1,94	a	18,46	±	1,56	bc	432,53	±	41,07	a	40,09	±	6,22	a	34,95	±	5,92	bc
<b>LB+G</b>	8,10	±	0,97	b	32,39	±	1,76	a	312,79	±	11,95	b	30,35	±	2,17	bcd	81,25	±	5,97	a
<b>LF+G</b>	5,47	±	0,26	cd	13,20	±	1,00	de	204,16	±	17,51	c	21,91	±	0,60	def	40,27	±	1,80	b
<b>KORA</b>																				
<b>0-G</b>	3,27	±	0,39	d	16,22	±	2,61	bc	17,82	±	2,54	f	45,32	±	1,55	bc	48,89	±	3,90	d
<b>LR-G</b>	5,16	±	0,20	c	20,90	±	1,48	b	63,21	±	7,40	e	55,37	±	4,08	ab	35,73	±	2,02	d
<b>LB-G</b>	3,41	±	0,23	d	11,72	±	1,09	d	21,70	±	1,27	f	39,00	±	2,86	cd	119,11	±	12,30	b
<b>LF-G</b>	2,15	±	0,14	e	6,13	±	0,36	e	5,86	±	0,51	f	22,48	±	4,06	e	54,80	±	2,13	d
<b>0+G</b>	5,47	±	0,35	c	15,13	±	1,02	bd	127,91	±	19,54	d	57,48	±	1,56	a	64,82	±	3,65	cd
<b>LR+G</b>	11,71	±	0,60	a	18,08	±	1,70	b	473,24	±	17,35	a	61,57	±	4,66	a	118,95	±	18,40	b
<b>LB+G</b>	8,41	±	0,49	b	28,89	±	0,92	a	314,42	±	8,24	b	53,26	±	4,22	ab	246,01	±	9,37	a
<b>LF+G</b>	4,99	±	0,36	c	11,38	±	2,50	cde	170,93	±	14,82	c	31,98	±	1,03	d	99,45	±	15,95	bc

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 15.** Koncentracija ketona ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	2-Butanon		2,3-Butandion		2,3-Pentandion		2-Heptanon		6-Metil-5-hepten-2-on			2-Oktanon						
<b>KT</b>																		
<b>0-G</b>	nd	c	80,0	± 8,3	cd	nd	b	5,99	± 0,59	c	6,67	± 0,22	b	1,408	± 0,067	bc		
<b>LR-G</b>	2164,2	± 39,0	a	< LOQ	d	nd	b	4,30	± 0,38	c	6,29	± 0,86	bc	1,104	± 0,069	c		
<b>LB-G</b>	nd	c	190,8	± 32,4	bc	nd	b	4,71	± 0,40	c	5,45	± 0,59	cd	1,301	± 0,065	bc		
<b>LF-G</b>	nd	c	< LOQ		d	nd	b	4,78	± 0,62	c	2,81	± 0,11	f	0,613	± 0,061	d		
<b>0+G</b>	nd	c	857,1	± 104,4	a	164,8	± 27,0	a	8,37	± 0,51	a	9,34	± 0,41	a	3,547	± 0,279	a	
<b>LR+G</b>	371,9	± 55,5	b	< LOQ	d	nd		b	2,27	± 0,36	b	4,04	± 0,20	e	1,057	± 0,162	c	
<b>LB+G</b>	nd	c	250,7	± 12,6	b	59,7	± 10,5	b	2,42	± 0,28	b	4,65	± 0,32	de	1,545	± 0,100	bc	
<b>LF+G</b>	nd	c	< LOQ		d	nd		b	8,06	± 0,67	a	3,83	± 0,50	ef	1,666	± 0,103	b	
<b>T0</b>																		
<b>0-G</b>	nd	b	810,9	± 58,4	c	< LOQ		b	5,66	± 0,21	c	6,41	± 0,53	bc	3,835	± 0,191	b	
<b>LR-G</b>	1275,4	± 154,6	a	574,6	± 6,5	cd	< LOQ	b	5,35	± 0,40	c	5,62	± 0,13	c	3,693	± 0,491	b	
<b>LB-G</b>	nd	b	699,4	± 97,4	c	< LOQ		b	5,84	± 0,10	c	5,75	± 0,47	c	3,563	± 0,258	b	
<b>LF-G</b>	nd	b	427,9	± 73,9	d	< LOQ		b	4,05	± 0,32	d	3,38	± 0,21	d	2,931	± 0,120	b	
<b>0+G</b>	nd	b	1570,2	± 115,8	a	128,1	± 11,1	a	7,93	± 0,18	ab	7,82	± 0,54	ab	5,077	± 0,393	a	
<b>LR+G</b>	1392,2	± 94,3	a	1193,0	± 136,0	b	129,7	± 19,4	a	7,83	± 0,35	ab	6,64	± 0,29	bc	3,596	± 0,377	b
<b>LB+G</b>	nd	b	1550,6	± 144,9	a	125,6	± 16,1	a	8,48	± 0,28	a	9,41	± 0,27	a	5,009	± 0,522	a	
<b>LF+G</b>	nd	b	1357,7	± 16,9	ab	133,1	± 12,7	a	7,03	± 0,50	b	8,31	± 1,11	a	3,604	± 0,295	b	
<b>TF</b>																		
<b>0-G</b>	nd	b	1793,8	± 167,9	d	32,9	± 5,7	c	6,25	± 0,47	bc	6,35	± 0,41	bc	5,339	± 0,557	cd	
<b>LR-G</b>	1685,6	± 243,7	a	1031,1	± 111,8	e	44,5	± 7,2	c	5,78	± 0,42	cd	5,60	± 0,26	ce	4,579	± 0,359	de
<b>LB-G</b>	nd	b	2445,6	± 107,6	c	50,9	± 4,6	c	5,62	± 0,76	c	6,00	± 0,75	ce	5,591	± 0,542	cd	
<b>LF-G</b>	nd	b	1116,5	± 74,5	e	48,6	± 6,5	c	4,18	± 0,74	d	3,81	± 0,27	e	3,669	± 0,584	e	
<b>0+G</b>	nd	b	3049,2	± 128,4	b	141,5	± 10,0	b	8,81	± 0,54	a	7,99	± 1,16	ab	9,827	± 0,340	a	
<b>LR+G</b>	1842,7	± 210,7	a	2060,1	± 237,2	cd	141,2	± 14,3	b	8,17	± 0,59	a	6,83	± 0,69	bc	7,258	± 0,685	b
<b>LB+G</b>	nd	b	3925,8	± 130,1	a	197,8	± 4,1	a	8,55	± 0,23	a	9,40	± 0,84	a	9,404	± 0,538	a	
<b>LF+G</b>	nd	b	3427,8	± 332,4	ab	203,3	± 16,3	a	7,79	± 0,39	ab	7,54	± 0,12	ac	6,934	± 0,557	bc	

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška



**Tablica 15.** Koncentracija ketona ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	2-Butanon		2,3-Butandion		2,3-Pentandion		2-Heptanon		6-Metil-5-hepten-2-on		2-Oktanon							
<b>KRUH</b>																		
<b>0-G</b>	nd	c	559,3	± 88,9	cd	60,0	± 4,9	de	7,62	± 1,15	eg	5,04	± 0,24	ace	3,387	± 0,449	bc	
<b>LR-G</b>	44,4	± 7,6	b	487,1	± 13,9	d	67,0	± 9,0	ce	5,49	± 0,25	f	5,29	± 0,14	abe	2,939	± 0,167	cd
<b>LB-G</b>	nd	c	702,6	± 45,6	bc	52,1	± 8,1	e	6,18	± 0,40	fg	4,13	± 0,16	bde	2,857	± 0,120	cd	
<b>LF-G</b>	nd	c	756,9	± 112,6	b	56,6	± 6,7	e	5,65	± 0,72	fg	3,60	± 0,29	d	2,454	± 0,113	d	
<b>0+G</b>	nd	c	834,9	± 124,4	ab	96,3	± 4,7	a	27,58	± 0,42	a	4,81	± 0,33	ace	5,349	± 0,325	a	
<b>LR+G</b>	148,1	± 10,5	a	731,4	± 50,2	bc	76,4	± 1,6	bcd	13,78	± 1,60	d	5,08	± 0,77	ab	4,255	± 0,601	b
<b>LB+G</b>	nd	c	1078,5	± 33,3	a	91,0	± 7,7	ab	22,02	± 0,51	b	5,32	± 0,35	a	5,807	± 0,368	a	
<b>LF+G</b>	nd	c	1068,2	± 80,4	a	83,5	± 6,2	ac	18,00	± 1,36	c	3,66	± 0,31	cd	3,915	± 0,346	bc	
<b>KORA</b>																		
<b>0-G</b>	nd	c	837,0	± 37,3	bc	195,4	± 1,4	d	10,03	± 1,26	b	3,95	± 0,44	c	2,380	± 0,285	cd	
<b>LR-G</b>	24,9	± 10,6	b	696,7	± 50,9	c	217,3	± 30,3	cd	8,72	± 1,06	b	5,63	± 0,44	ab	2,696	± 0,324	cd
<b>LB-G</b>	nd	c	854,7	± 54,4	bc	231,1	± 23,9	cd	9,08	± 0,16	b	3,43	± 0,18	cd	2,092	± 0,086	de	
<b>LF-G</b>	nd	c	767,4	± 28,3	c	204,6	± 10,5	d	7,03	± 0,98	b	2,44	± 0,29	d	1,425	± 0,163	e	
<b>0+G</b>	nd	c	1253,5	± 117,9	a	260,0	± 17,0	bc	34,51	± 1,35	a	4,55	± 0,51	bc	3,714	± 0,251	b	
<b>LR+G</b>	75,3	± 12,9	a	1049,6	± 9,6	ab	311,8	± 22,5	a	29,70	± 2,67	a	6,88	± 0,90	a	3,655	± 0,503	ab
<b>LB+G</b>	nd	c	1269,2	± 75,2	a	331,8	± 11,8	a	34,20	± 0,54	a	5,82	± 0,13	ab	4,367	± 0,396	a	
<b>LF+G</b>	nd	c	1270,5	± 128,3	a	292,2	± 10,2	ab	31,72	± 3,42	a	2,50	± 0,23	d	3,130	± 0,206	bc	

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 16.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	2-Metil-1-propanol			3-Metil-1-butanol			1-Pentanol			1-Heksanol			(Z)-3-Heksenol		2-Etil-1-heksanol	
<b>KT</b>																
<b>0-G</b>	nd			nd			83,1 ± 4,0	e	199 ± 5	e	nd	d	10,24 ± 0,67	ce		
<b>LR-G</b>	nd			nd			114,3 ± 5,6	d	915 ± 96	ab	nd	d	11,99 ± 0,78	bcf		
<b>LB-G</b>	nd			< LOQ			96,4 ± 2,0	de	630 ± 12	c	nd	d	10,16 ± 1,00	ce		
<b>LF-G</b>	nd			< LOQ			90,5 ± 9,6	de	789 ± 46	b	nd	d	8,33 ± 1,33	def		
<b>0+G</b>	nd			< LOQ			435,6 ± 7,2	a	454 ± 33	d	12,74 ± 1,02	a	14,47 ± 0,97	ab		
<b>LR+G</b>	nd			< LOQ			169,8 ± 6,8	bc	911 ± 88	ab	10,39 ± 0,21	b	12,70 ± 1,69	ac		
<b>LB+G</b>	nd			< LOQ			155,0 ± 24,8	c	981 ± 13	a	7,61 ± 0,53	c	15,97 ± 1,86	a		
<b>LF+G</b>	nd			< LOQ			193,7 ± 6,8	b	1086 ± 40	a	11,29 ± 1,29	ab	12,20 ± 1,07	acf		
<b>T0</b>																
<b>0-G</b>	956 ± 84	b	2233 ± 40	ace	83,8 ± 2,9	c	1052 ± 124	c	nd	c	15,40 ± 0,72	bc				
<b>LR-G</b>	1333 ± 44	ab	2675 ± 201	a	104,1 ± 8,1	c	863 ± 141	c	nd	c	14,68 ± 0,78	bd				
<b>LB-G</b>	1337 ± 182	ab	2488 ± 199	ab	79,4 ± 2,6	c	859 ± 81	c	nd	c	13,83 ± 0,96	cde				
<b>LF-G</b>	1210 ± 68	ab	2224 ± 162	bc	81,4 ± 5,3	c	857 ± 41	c	nd	c	11,73 ± 0,36	d				
<b>0+G</b>	962 ± 94	b	1975 ± 127	cd	509,6 ± 29,7	b	3258 ± 93	a	101,51 ± 5,36	a	18,48 ± 1,65	ab				
<b>LR+G</b>	1253 ± 222	ab	1679 ± 213	d	501,9 ± 27,1	b	2440 ± 307	b	79,03 ± 3,39	b	18,06 ± 0,59	ab				
<b>LB+G</b>	1353 ± 82	ab	2310 ± 52	ac	614,6 ± 30,7	a	3418 ± 200	a	79,23 ± 4,76	b	19,89 ± 0,91	a				
<b>LF+G</b>	1532 ± 173	a	1721 ± 150	de	640,0 ± 20,2	a	2908 ± 128	ab	79,34 ± 1,30	b	16,03 ± 1,42	be				
<b>TF</b>																
<b>0-G</b>	5356 ± 493	ab	7676 ± 517	bc	84,3 ± 8,8	d	950 ± 94	c	nd	c	14,68 ± 1,05	b				
<b>LR-G</b>	5750 ± 391	a	6148 ± 437	def	97,7 ± 21,3	d	856 ± 129	c	nd	c	13,87 ± 0,24	b				
<b>LB-G</b>	5864 ± 265	a	10376 ± 623	a	71,2 ± 8,0	d	853 ± 64	c	nd	c	15,31 ± 0,53	b				
<b>LF-G</b>	4412 ± 419	b	7088 ± 464	cd	79,7 ± 12,0	d	752 ± 20	c	nd	c	12,38 ± 0,20	b				
<b>0+G</b>	5003 ± 238	ab	6393 ± 367	ce	508,5 ± 16,4	c	3015 ± 67	a	92,71 ± 2,43	a	19,69 ± 2,59	a				
<b>LR+G</b>	5189 ± 311	ab	5721 ± 251	eg	547,5 ± 26,4	bc	2261 ± 87	b	69,46 ± 3,03	b	16,72 ± 1,45	ab				
<b>LB+G</b>	5208 ± 202	ab	8849 ± 228	b	579,2 ± 10,2	ab	3137 ± 321	a	72,43 ± 3,55	b	20,20 ± 1,70	a				
<b>LF+G</b>	4597 ± 250	b	6655 ± 352	cfg	595,5 ± 21,4	a	3085 ± 110	a	73,74 ± 9,63	b	16,38 ± 1,82	ab				

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 16.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	2-Metil-1-propanol			3-Metil-1-butanol			1-Pentanol			1-Heksanol			(Z)-3-Heksenol		2-Etil-1-heksanol			
<b>KRUH</b>																		
<b>0-G</b>	2812	± 85	ab	4680	± 304	b	59,9	± 2,8	c	541	± 24	d	nd	d	14,23	± 1,40	bc	
<b>LR-G</b>	2431	± 173	cd	3340	± 255	c	62,9	± 5,7	c	482	± 14	d	nd	d	12,33	± 0,74	c	
<b>LB-G</b>	3127	± 70	a	6174	± 141	a	46,6	± 3,1	c	536	± 17	d	nd	d	13,46	± 0,38	c	
<b>LF-G</b>	2267	± 261	ce	4748	± 162	b	60,6	± 6,3	c	533	± 16	d	nd	d	12,99	± 1,07	c	
<b>0+G</b>	2672	± 79	bc	3963	± 44	bc	178,9	± 13,0	ab	1528	± 174	ab	72,23	± 2,10	a	18,57	± 1,70	a
<b>LR+G</b>	2143	± 82	def	3194	± 305	c	166,5	± 6,3	b	1203	± 30	c	57,96	± 0,63	bc	14,59	± 0,32	bc
<b>LB+G</b>	2945	± 39	ab	5730	± 552	a	188,9	± 11,4	a	1537	± 92	a	60,90	± 4,04	b	16,85	± 1,01	ab
<b>LF+G</b>	1884	± 103	f	3591	± 268	c	185,7	± 10,5	ab	1328	± 78	bc	52,28	± 3,23	c	16,89	± 0,80	ab
<b>KORA</b>																		
<b>0-G</b>	924	± 21	d	1649	± 57	cd	32,5	± 0,8	b	193	± 8	c	nd	d	12,32	± 1,25	cd	
<b>LR-G</b>	1163	± 71	a	1461	± 181	d	41,9	± 1,0	b	264	± 33	c	nd	d	12,49	± 0,13	cd	
<b>LB-G</b>	1018	± 32	bcd	2240	± 165	a	36,3	± 4,7	b	215	± 13	c	nd	d	11,94	± 0,65	d	
<b>LF-G</b>	927	± 50	d	1904	± 139	ac	40,0	± 2,5	b	217	± 34	c	nd	d	9,05	± 0,80	e	
<b>0+G</b>	1031	± 101	ad	1654	± 105	bcd	91,3	± 2,2	a	720	± 33	a	38,29	± 0,82	a	18,52	± 0,87	a
<b>LR+G</b>	1041	± 36	ac	1486	± 158	d	95,0	± 5,7	a	576	± 34	b	31,79	± 0,58	b	14,94	± 1,45	bc
<b>LB+G</b>	1075	± 57	ab	2067	± 286	ab	96,7	± 7,0	a	605	± 55	b	26,71	± 1,58	c	15,52	± 0,69	b
<b>LF+G</b>	927	± 3	cd	1512	± 162	cd	93,5	± 4,7	a	598	± 42	b	24,69	± 1,53	c	15,63	± 1,05	ab

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 16.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	1-Heptanol				1-Oktanol				(E)-2-Okten-1-ol				1-Okten-3-ol				(Z)-3-Nonen-1-ol				Fenilmetanol				2-Feniletanol			
<b>KT</b>																												
<b>0-G</b>	3,72	±	2,10	d	12,86	±	0,71	d	4,02	±	0,14	f	18,28	±	1,14	e	nd	e	55,7	±	7,0	d	7,51	±	0,50	c		
<b>LR-G</b>	19,78	±	2,08	b	27,18	±	2,22	bc	30,81	±	1,65	b	26,52	±	2,77	cd	1,804	±	0,026	d	86,7	±	6,7	b	21,06	±	3,03	b
<b>LB-G</b>	11,13	±	2,19	c	23,04	±	2,25	c	8,36	±	0,38	ef	22,58	±	2,50	de	nd	e	59,4	±	9,3	cd	11,03	±	0,29	c		
<b>LF-G</b>	6,01	±	0,52	dc	12,25	±	0,55	d	16,45	±	0,77	cd	11,86	±	0,41	f	< LOQ	e	48,2	±	7,6	d	12,72	±	0,66	c		
<b>0+G</b>	23,51	±	1,63	b	34,41	±	2,18	a	19,35	±	3,52	c	126,69	±	4,89	a	1,828	±	0,033	d	80,8	±	3,0	bc	12,73	±	0,35	c
<b>LR+G</b>	39,07	±	4,13	a	30,79	±	4,76	ab	37,40	±	5,04	a	32,45	±	3,13	c	3,766	±	0,281	a	118,9	±	9,2	a	42,51	±	3,95	a
<b>LB+G</b>	24,83	±	2,27	b	37,85	±	0,85	a	12,82	±	0,86	de	43,22	±	2,23	b	3,139	±	0,156	b	85,8	±	5,8	b	26,81	±	2,17	b
<b>LF+G</b>	36,07	±	3,60	a	24,69	±	3,10	bc	31,28	±	4,36	ab	27,02	±	3,33	cd	2,424	±	0,311	c	66,5	±	6,1	bd	21,08	±	1,63	b
<b>T0</b>																												
<b>0-G</b>	68,07	±	6,39	c	21,09	±	1,58	c	6,74	±	0,66	c	17,15	±	1,01	d	3,129	±	0,343	bc	510,1	±	21,6	c	170,05	±	6,83	c
<b>LR-G</b>	52,80	±	5,41	c	26,79	±	1,03	c	5,83	±	0,53	c	20,44	±	3,61	d	3,375	±	0,113	b	515,8	±	23,6	c	176,01	±	17,27	c
<b>LB-G</b>	38,08	±	2,16	c	19,88	±	1,55	c	5,70	±	0,56	c	17,24	±	0,88	d	3,332	±	0,526	b	565,6	±	14,7	bc	179,42	±	15,35	ac
<b>LF-G</b>	32,13	±	1,95		13,85	±	0,26	c	3,66	±	0,34	c	13,34	±	0,29	d	1,880	±	0,205	d	270,7	±	43,4	d	115,00	±	19,39	d
<b>0+G</b>	288,66	±	28,09	b	70,12	±	5,97	b	45,41	±	2,62	b	124,90	±	1,30	c	3,817	±	0,489	ab	606,5	±	50,7	bc	205,36	±	19,31	bc
<b>LR+G</b>	277,18	±	15,05	b	77,54	±	7,75	b	43,61	±	1,83	b	144,51	±	8,52	b	4,481	±	0,561	a	719,6	±	60,5	a	197,60	±	23,53	ac
<b>LB+G</b>	343,25	±	22,37	a	97,32	±	9,43	a	57,13	±	4,92	a	169,87	±	4,61	a	4,713	±	0,277	a	643,5	±	52,6	ab	222,25	±	12,53	ab
<b>LF+G</b>	253,88	±	19,01	b	75,09	±	9,61	b	48,95	±	8,70	ab	151,46	±	10,45	b	4,246	±	0,573	ab	514,1	±	62,6	bc	184,29	±	26,54	ac
<b>TF</b>																												
<b>0-G</b>	62,13	±	3,93	d	24,79	±	2,37	c	5,63	±	0,53	c	16,65	±	1,22	c	4,946	±	0,074	bc	575,2	±	42,4	b	432,60	±	4,02	ab
<b>LR-G</b>	55,27	±	1,28	d	26,87	±	0,10	c	5,41	±	0,70	c	20,01	±	0,22	c	3,852	±	0,208	cd	859,1	±	38,8	a	339,51	±	29,71	bc
<b>LB-G</b>	40,70	±	1,28	d	22,65	±	0,45	c	4,94	±	0,43	c	16,49	±	0,74	c	4,168	±	0,360	cd	650,4	±	46,0	b	420,19	±	10,88	a
<b>LF-G</b>	35,70	±	3,14	d	15,69	±	0,35	c	3,21	±	0,16	c	13,73	±	0,34	c	2,618	±	0,502	d	336,0	±	36,1	c	241,70	±	21,89	d
<b>0+G</b>	343,56	±	7,86	ab	94,01	±	1,98	ab	40,46	±	3,38	ab	140,42	±	4,67	b	5,806	±	0,943	ac	761,4	±	25,4	a	485,92	±	52,30	a
<b>LR+G</b>	302,38	±	16,52	bc	88,78	±	7,33	b	36,26	±	4,99	b	148,00	±	9,58	b	6,227	±	0,693	ab	820,2	±	22,5	a	393,32	±	40,10	ab
<b>LB+G</b>	360,92	±	31,47	a	115,67	±	13,03	a	45,60	±	2,64	a	174,67	±	12,42	a	6,974	±	0,875	a	798,0	±	25,2	a	444,91	±	46,68	a
<b>LF+G</b>	299,53	±	24,05	c	92,65	±	10,47	b	37,13	±	2,84	b	143,27	±	8,89	b	5,589	±	0,909	ac	571,3	±	34,8	b	291,73	±	19,96	cd

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 16.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	1-Heptanol			1-Oktanol			<i>(E)</i> -2-Okten-1-ol			1-Okten-3-ol			<i>(Z)</i> -3-Nonen-1-ol			Fenilmetanol			2-Feniletanol		
<b>KRUH</b>																					
<b>0-G</b>	19,63	± 1,25	c	13,85	± 1,47	c	3,92	± 0,21	c	17,28	± 1,44	c	2,826	± 0,148	b	539,8	± 12,8	d	353,31	± 15,40	ab
<b>LR-G</b>	25,58	± 2,54	c	16,27	± 0,73	c	4,17	± 0,51	c	15,40	± 1,55	c	2,526	± 0,424	bc	884,9	± 39,6	a	303,33	± 29,70	bc
<b>LB-G</b>	18,32	± 2,47	c	12,63	± 0,62	c	3,45	± 0,14	cd	15,29	± 0,80	c	2,544	± 0,195	bc	610,0	± 41,4	cd	342,75	± 19,86	ab
<b>LF-G</b>	23,27	± 3,24	c	10,69	± 0,84	c	2,87	± 0,20	d	14,75	± 2,65	c	1,982	± 0,200	c	357,4	± 12,4	e	212,08	± 23,08	d
<b>0+G</b>	148,71	± 2,91	b	31,96	± 3,32	b	7,56	± 0,61	b	49,17	± 4,93	b	3,662	± 0,248	a	921,7	± 2,2	a	395,27	± 4,20	a
<b>LR+G</b>	150,30	± 16,95	b	32,63	± 3,90	b	8,15	± 0,29	b	49,99	± 2,98	b	3,513	± 0,327	a	684,1	± 69,6	bc	345,17	± 43,95	ab
<b>LB+G</b>	178,91	± 13,40	a	41,32	± 1,47	a	10,36	± 0,35	a	59,00	± 5,59	a	4,082	± 0,282	a	734,1	± 55,1	b	365,02	± 5,89	ab
<b>LF+G</b>	125,66	± 6,72	b	28,15	± 2,64	b	7,29	± 0,46	b	44,57	± 3,35	b	2,693	± 0,228	bc	528,1	± 18,1	d	232,51	± 3,85	cd
<b>KORA</b>																					
<b>0-G</b>	< LOQ		d	7,14	± 0,50	d	3,76	± 0,24	c	11,22	± 0,83	cd	1,405	± 0,105	eg	925,5	± 50,0	cd	285,19	± 25,54	a
<b>LR-G</b>	< LOQ		d	12,97	± 2,00	c	3,81	± 0,47	c	14,02	± 1,70	c	1,801	± 0,169	bcd	1747,5	± 217,0	a	243,80	± 25,71	a
<b>LB-G</b>	< LOQ		d	7,97	± 0,55	d	3,59	± 0,37	c	10,27	± 0,96	cd	1,683	± 0,104	df	891,5	± 53,9	cd	294,12	± 24,68	a
<b>LF-G</b>	< LOQ		d	3,20	± 0,14	e	1,98	± 0,36	d	6,90	± 0,87	d	0,863	± 0,048	h	322,6	± 31,8	e	144,68	± 5,36	b
<b>0+G</b>	59,56	± 1,16	bc	19,13	± 0,74	b	5,55	± 0,53	b	26,06	± 2,31	ab	1,979	± 0,067	ac	1585,0	± 51,5	a	276,13	± 18,06	a
<b>LR+G</b>	63,10	± 3,64	ab	19,83	± 0,58	b	6,22	± 0,43	ab	29,27	± 3,54	ab	2,243	± 0,111	a	1227,3	± 146,3	b	247,97	± 17,71	a
<b>LB+G</b>	67,86	± 2,20	a	24,39	± 0,76	a	6,63	± 0,58	a	28,75	± 1,62	a	2,108	± 0,109	ab	1113,0	± 120,3	bc	271,22	± 12,70	a
<b>LF+G</b>	53,01	± 2,82	c	17,48	± 1,95	b	4,79	± 0,39	bc	23,14	± 3,27	b	1,682	± 0,193	cfg	674,7	± 82,8	d	173,31	± 25,41	b

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 17.** Koncentracija kiselina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	2-Metilbutanska kiselina			Pentanska kiselina			Heksanska kiselina			Heptanska kiselina			Oktanska kiselina			Dekanska kiselina			Benzojeva kiselina		
<b>KT</b>																					
<b>0-G</b>	147	± 4	e	nd	c	3991	± 205	c	570	± 23	e	65,3	± 2,4	d	141	± 6	e	663	± 26	d	
<b>LR-G</b>	1162	± 70	bc	4334	± 209	a	22644	± 1410	a	1880	± 34	a	403,2	± 8,9	a	493	± 55	a	2215	± 150	a
<b>LB-G</b>	964	± 37	cd	3454	± 136	b	17777	± 2003	b	1518	± 13	c	293,9	± 44,4	b	319	± 36	bc	1188	± 51	c
<b>LF-G</b>	956	± 22	d	3440	± 60	b	16607	± 827	b	1509	± 49	c	217,3	± 3,8	c	201	± 25	cd	1059	± 141	c
<b>0+G</b>	206	± 13	e	nd	c	6743	± 806	c	714	± 56	d	99,4	± 11,2	d	179	± 15	de	1719	± 63	b	
<b>LR+G</b>	1312	± 72	b	3756	± 231	b	22014	± 1799	a	1767	± 113	ab	417,7	± 39,6	a	325	± 13	bc	2453	± 109	a
<b>LB+G</b>	1550	± 157	a	3850	± 260	b	21739	± 1698	a	1773	± 43	a	432,5	± 20,4	a	423	± 47	ab	1795	± 229	b
<b>LF+G</b>	1357	± 88	ab	4633	± 380	a	18753	± 134	ab	1609	± 33	bc	331,2	± 10,2	b	247	± 39	cd	1953	± 183	ab
<b>T0</b>																					
<b>0-G</b>	170	± 11	f	nd		2098	± 44	d	202	± 17	d	93,3	± 3,1	bc	417	± 31	bc	684	± 87	c	
<b>LR-G</b>	287	± 23	be	nd		2836	± 151	bc	374	± 43	c	141,6	± 7,1	a	483	± 26	ab	1122	± 127	ab	
<b>LB-G</b>	255	± 23	de	nd		2425	± 179	cd	341	± 39	bc	126,7	± 18,2	a	505	± 41	a	597	± 89	c	
<b>LF-G</b>	274	± 11	de	nd		2558	± 89	bd	258	± 30	bd	141,5	± 3,3	a	291	± 27	de	410	± 18	c	
<b>0+G</b>	235	± 15	e	nd		2933	± 235	b	255	± 23	bd	77,6	± 13,0	c	233	± 24	e	1467	± 91	a	
<b>LR+G</b>	388	± 28	ac	nd		4553	± 410	a	590	± 57	a	157,5	± 16,5	a	425	± 50	abd	1341	± 179	ab	
<b>LB+G</b>	301	± 30	bd	nd		4162	± 143	a	501	± 68	a	125,0	± 5,5	ab	345	± 22	cd	1074	± 166	b	
<b>LF+G</b>	348	± 18	abc	nd		4472	± 232	a	507	± 38	a	131,5	± 14,6	ab	256	± 9	de	1425	± 121	ab	
<b>TF</b>																					
<b>0-G</b>	191	± 17	d	nd		2156	± 113	e	203	± 11	f	114,0	± 5,6	e	569	± 62	c	772	± 78	c	
<b>LR-G</b>	402	± 33	b	nd		3540	± 224	c	506	± 14	cd	250,4	± 18,1	bc	1008	± 112	a	1107	± 101	b	
<b>LB-G</b>	294	± 30	c	nd		2759	± 56	d	403	± 31	de	185,6	± 6,3	d	777	± 37	b	717	± 15	c	
<b>LF-G</b>	323	± 9	c	nd		2872	± 97	d	332	± 11	ef	197,0	± 32,9	cd	555	± 91	c	432	± 28	d	
<b>0+G</b>	253	± 19	cd	nd		2981	± 112	d	305	± 32	ef	112,7	± 8,5	e	583	± 51	c	1471	± 79	a	
<b>LR+G</b>	556	± 49	a	nd		6553	± 275	a	1064	± 100	a	344,3	± 28,8	a	1075	± 88	a	1430	± 63	a	
<b>LB+G</b>	438	± 20	b	nd		5313	± 170	b	724	± 36	b	289,6	± 33,9	ab	1078	± 40	a	1123	± 84	b	
<b>LF+G</b>	443	± 17	b	nd		5242	± 317	b	624	± 46	bc	233,3	± 10,7	bd	639	± 50	bc	1161	± 119	b	

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 17.** Koncentracija kiselina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	2-Metilbutanska kiselina				Pentanska kiselina				Heksanska kiselina				Heptanska kiselina				Oktanska kiselina				Dekanska kiselina				Benzojeva kiselina			
<b>KRUH</b>																												
<b>0-G</b>	218	±	21	e	nd	2239	±	128	d	224	±	34	f	82,1	±	1,3	e	328	±	7	b	719	±	55	cd			
<b>LR-G</b>	420	±	10	c	nd	3406	±	281	b	481	±	77	cd	142,9	±	20,5	c	461	±	20	a	863	±	102	bc			
<b>LB-G</b>	310	±	16	d	nd	2744	±	43	c	403	±	32	de	108,2	±	4,6	de	266	±	20	bc	435	±	83	e			
<b>LF-G</b>	355	±	18	d	nd	2897	±	239	c	368	±	50	de	100,7	±	11,5	e	246	±	30	c	409	±	76	e			
<b>0+G</b>	300	±	7	d	nd	2597	±	149	cd	300	±	42	ef	135,6	±	10,4	cd	292	±	24	bc	1016	±	104	ab			
<b>LR+G</b>	605	±	36	a	nd	4481	±	147	a	752	±	35	a	284,3	±	16,2	a	469	±	29	a	1132	±	56	a			
<b>LB+G</b>	482	±	39	bc	nd	3698	±	212	b	604	±	54	b	237,8	±	16,5	b	451	±	22	a	766	±	88	c			
<b>LF+G</b>	527	±	15	b	nd	3824	±	100	b	588	±	37	bc	231,9	±	14,1	b	323	±	30	b	562	±	57	de			
<b>KORA</b>																												
<b>0-G</b>	274	±	21	e	nd	2465	±	89	c	279	±	35	ef	108,8	±	6,5	c	342	±	21	b	659	±	66	c			
<b>LR-G</b>	441	±	21	bc	nd	3965	±	275	b	689	±	68	b	179,6	±	21,0	b	508	±	24	a	1188	±	86	a			
<b>LB-G</b>	339	±	15	de	nd	2970	±	108	c	412	±	63	cd	125,0	±	13,0	c	318	±	24	bc	472	±	30	de			
<b>LF-G</b>	345	±	36	cde	nd	2744	±	178	c	272	±	32	de	82,9	±	5,2	c	171	±	17	d	392	±	17	e			
<b>0+G</b>	334	±	26	cde	nd	2721	±	260	c	333	±	19	f	129,6	±	5,6	c	273	±	15	bd	1084	±	49	ab			
<b>LR+G</b>	643	±	61	a	nd	5167	±	491	a	900	±	58	a	282,0	±	16,4	a	494	±	36	a	1233	±	111	a			
<b>LB+G</b>	439	±	54	bd	nd	3951	±	240	b	720	±	19	b	232,9	±	36,0	a	470	±	66	a	992	±	99	b			
<b>LF+G</b>	492	±	45	b	nd	4035	±	480	b	531	±	17	c	173,7	±	18,9	b	210	±	22	cd	667	±	45	cd			

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 18.** Koncentracija estera ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	Etil-heksanoat				Etil-oktanoat				Etil-tetradekanoat				Etil-heksadekanoat				Etil-benzoat			
<b>KT</b>																				
<b>0-G</b>	0,263	±	0,007	c	0,351	±	0,004	bc	9,60	±	0,00	c	2,12	±	0,40	e	0,300	±	0,010	e
<b>LR-G</b>	1,103	±	0,113	a	0,421	±	0,021	ab	171,76	±	25,63	a	47,26	±	7,29	a	0,983	±	0,098	b
<b>LB-G</b>	0,354	±	0,037	c	0,296	±	0,006	c	19,24	±	1,57	c	6,49	±	0,60	de	0,360	±	0,060	e
<b>LF-G</b>	0,704	±	0,040	b	0,369	±	0,024	bc	108,68	±	18,42	b	23,50	±	4,55	bc	0,738	±	0,048	d
<b>0+G</b>	0,352	±	0,037	c	0,346	±	0,046	c	nd			c	2,06	±	0,37	e	0,388	±	0,009	e
<b>LR+G</b>	1,068	±	0,111	a	0,460	±	0,018	a	106,35	±	5,93	b	33,05	±	2,95	b	1,323	±	0,071	a
<b>LB+G</b>	0,665	±	0,020	b	0,388	±	0,002	ac	39,55	±	2,78	c	6,07	±	0,80	de	0,784	±	0,039	cd
<b>LF+G</b>	0,929	±	0,011	a	0,477	±	0,029	a	54,54	±	1,41	bc	15,88	±	1,01	cd	0,973	±	0,007	bc
<b>T0</b>																				
<b>0-G</b>	2,408	±	0,204	a	3,423	±	0,300	c	15,29	±	4,46	c	2,72	±	0,24	df	0,820	±	0,055	bc
<b>LR-G</b>	1,860	±	0,080	ab	4,065	±	0,209	bc	42,52	±	0,44	a	6,93	±	0,21	a	1,066	±	0,140	a
<b>LB-G</b>	1,732	±	0,252	b	4,218	±	0,351	ab	27,03	±	4,22	b	5,06	±	0,75	b	0,850	±	0,038	ac
<b>LF-G</b>	2,276	±	0,086	a	4,947	±	0,222	a	23,78	±	2,02	bc	3,52	±	0,46	cde	0,973	±	0,020	ab
<b>0+G</b>	0,627	±	0,057	c	0,868	±	0,107	d	nd			d	2,26	±	0,28	ef	0,601	±	0,030	c
<b>LR+G</b>	0,916	±	0,102	c	1,319	±	0,166	d	15,88	±	2,46	c	4,43	±	0,76	bc	1,064	±	0,093	ab
<b>LB+G</b>	0,683	±	0,006	c	1,160	±	0,056	d	16,53	±	4,91	c	4,04	±	0,41	bd	0,991	±	0,058	ab
<b>LF+G</b>	0,804	±	0,039	c	1,277	±	0,150	d	24,56	±	2,08	bc	1,35	±	0,26	f	0,828	±	0,049	ac
<b>TF</b>																				
<b>0-G</b>	2,752	±	0,463	b	6,183	±	0,494	b	50,49	±	4,10	bc	5,92	±	0,55	bc	2,417	±	0,142	a
<b>LR-G</b>	4,426	±	0,350	a	9,399	±	0,874	a	91,71	±	12,09	a	10,47	±	0,57	a	2,311	±	0,057	a
<b>LB-G</b>	5,092	±	0,171	a	10,448	±	0,245	a	74,56	±	6,48	ab	10,86	±	1,22	a	2,239	±	0,035	a
<b>LF-G</b>	5,649	±	0,759	a	11,263	±	1,384	a	72,05	±	11,55	ab	6,53	±	0,66	b	2,139	±	0,060	ab
<b>0+G</b>	1,757	±	0,115	b	4,187	±	0,108	b	31,92	±	7,30	cd	3,95	±	0,12	c	1,332	±	0,051	d
<b>LR+G</b>	2,505	±	0,418	b	6,037	±	0,307	b	52,10	±	7,10	be	7,02	±	0,76	b	1,743	±	0,085	bc
<b>LB+G</b>	2,802	±	0,322	b	6,068	±	0,902	b	46,49	±	6,48	ce	6,51	±	0,66	b	1,550	±	0,176	cd
<b>LF+G</b>	2,656	±	0,166	b	5,626	±	0,801	b	46,80	±	3,21	bde	6,93	±	0,62	b	1,273	±	0,123	d

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška



**Tablica 18.** Koncentracija estera ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	Etil-heksanoat			Etil-oktanoat			Etil-tetradekanoat			Etil-heksadekanoat			Etil-benzoat							
<b>KRUH</b>																				
<b>0-G</b>	0,438	±	0,019	c	1,444	±	0,089	bc	84,76	±	7,55	bc	10,85	±	1,00	b	1,301	±	0,090	a
<b>LR-G</b>	0,550	±	0,072	ab	2,008	±	0,218	a	124,88	±	10,57	a	16,13	±	1,75	a	1,318	±	0,135	a
<b>LB-G</b>	0,450	±	0,020	c	1,472	±	0,053	bc	83,54	±	14,17	bd	11,85	±	1,26	b	1,011	±	0,016	bc
<b>LF-G</b>	0,480	±	0,008	bc	1,649	±	0,260	ab	107,64	±	7,55	ab	8,69	±	0,53	bc	1,185	±	0,074	ab
<b>0+G</b>	0,542	±	0,041	a	1,250	±	0,118	c	45,65	±	2,56	e	6,55	±	0,35	c	0,836	±	0,135	c
<b>LR+G</b>	0,625	±	0,054	a	1,897	±	0,165	ab	58,02	±	6,04	de	7,45	±	0,49	c	1,030	±	0,155	ac
<b>LB+G</b>	0,625	±	0,026	a	1,859	±	0,104	a	71,98	±	6,12	cd	11,55	±	1,12	b	0,953	±	0,077	bc
<b>LF+G</b>	0,599	±	0,042	a	1,697	±	0,133	ac	44,99	±	4,03	e	6,54	±	0,49	c	0,804	±	0,052	c
<b>KORA</b>																				
<b>0-G</b>	0,312	±	0,013	e	0,887	±	0,100	b	93,57	±	10,18	b	11,15	±	1,11	b	0,622	±	0,057	bc
<b>LR-G</b>	0,525	±	0,055	ab	1,752	±	0,272	a	149,39	±	7,00	a	18,37	±	1,19	a	0,929	±	0,099	a
<b>LB-G</b>	0,322	±	0,006	e	1,040	±	0,120	b	109,23	±	11,67	b	13,29	±	1,75	b	0,556	±	0,012	cd
<b>LF-G</b>	0,310	±	0,007	e	0,818	±	0,024	b	53,63	±	3,29	cd	5,91	±	0,41	c	0,526	±	0,055	cd
<b>0+G</b>	0,426	±	0,010	abd	0,757	±	0,027	b	43,01	±	1,98	cd	5,83	±	0,65	c	0,457	±	0,036	d
<b>LR+G</b>	0,514	±	0,059	a	1,581	±	0,195	a	91,16	±	5,24	b	11,90	±	1,94	b	0,766	±	0,109	ab
<b>LB+G</b>	0,440	±	0,016	bc	1,082	±	0,149	b	56,96	±	3,97	c	11,30	±	0,35	b	0,559	±	0,037	cd
<b>LF+G</b>	0,413	±	0,044	cd	1,003	±	0,094	b	37,31	±	4,60	d	3,44	±	0,67	c	0,484	±	0,057	cd

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 19.** Koncentracija aromatskih ugljikovodika, fenola i sumpornih spojeva ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	Stiren			Toluen			Fenol			2-Metoksi-4-vinilfenol			Dimetil-disulfid							
<b>KT</b>																				
<b>0-G</b>	9,78	±	1,09	bc	8,10	±	0,36	ab	43,7	±	1,6	d	66,2	±	3,2	f	4,30	±	1,38	d
<b>LR-G</b>	13,64	±	0,84	a	8,12	±	1,53	ab	300,8	±	16,2	c	19527,2	±	1661,3	b	9,86	±	1,05	bc
<b>LB-G</b>	8,04	±	1,13	c	6,58	±	0,97	b	111,4	±	8,3	d	35530,8	±	878,3	a	4,14	±	1,54	d
<b>LF-G</b>	4,81	±	0,32	d	5,99	±	1,08	b	104,9	±	12,0	d	16938,7	±	717,4	bc	7,38	±	0,18	cd
<b>0+G</b>	14,03	±	0,40	a	10,41	±	1,52	a	51,8	±	5,1	d	52,7	±	8,0	f	10,43	±	1,21	bc
<b>LR+G</b>	11,86	±	0,79	ab	8,14	±	1,35	ab	659,1	±	49,7	a	5495,0	±	311,5	e	17,15	±	0,79	a
<b>LB+G</b>	13,53	±	0,31	a	8,28	±	0,24	ab	430,4	±	13,6	b	15295,1	±	1371,8	cd	9,81	±	0,68	bc
<b>LF+G</b>	9,84	±	0,42	bc	6,87	±	0,65	b	446,8	±	11,4	b	12269,9	±	1147,9	d	11,72	±	2,06	b
<b>T0</b>																				
<b>0-G</b>	19,85	±	1,39	de	8,59	±	0,35	b	52,5	±	3,0	d	119,7	±	17,6	c	8,18	±	1,46	bcd
<b>LR-G</b>	32,44	±	3,16	bc	9,80	±	0,22	ab	90,9	±	3,0	a	2387,4	±	293,5	b	8,10	±	2,54	bcd
<b>LB-G</b>	22,43	±	3,92	ce	8,51	±	0,93	b	65,2	±	4,7	c	8428,7	±	849,5	a	8,97	±	1,54	acd
<b>LF-G</b>	13,52	±	0,57	e	8,39	±	0,38	b	53,9	±	2,8	d	2501,8	±	52,5	b	5,50	±	1,34	d
<b>0+G</b>	28,66	±	1,48	cd	11,55	±	1,38	a	51,8	±	3,1	d	32,3	±	6,1	c	10,85	±	0,75	abc
<b>LR+G</b>	44,38	±	6,85	a	10,92	±	1,53	ab	87,4	±	4,0	a	79,9	±	19,0	c	14,09	±	2,62	a
<b>LB+G</b>	43,89	±	1,32	ab	9,40	±	0,35	ab	71,1	±	2,9	bc	98,9	±	7,1	c	10,41	±	1,58	abc
<b>LF+G</b>	21,95	±	3,66	ce	9,67	±	0,51	ab	75,1	±	1,4	b	316,3	±	59,6	c	7,55	±	1,78	cd
<b>TF</b>																				
<b>0-G</b>	43,43	±	6,73	cd	10,10	±	1,06	a	52,0	±	2,8	c	131,0	±	6,0	c	10,04	±	0,56	ac
<b>LR-G</b>	62,32	±	5,00	bc	8,87	±	0,75	a	88,0	±	8,3	a	1950,0	±	150,3	b	7,60	±	1,46	bc
<b>LB-G</b>	67,27	±	2,95	b	11,15	±	1,61	a	72,1	±	2,1	b	8791,9	±	444,3	a	6,25	±	1,22	c
<b>LF-G</b>	29,08	±	4,88	d	8,19	±	0,24	a	55,1	±	2,6	c	2432,8	±	125,9	b	10,23	±	0,91	ab
<b>0+G</b>	65,15	±	9,11	b	10,85	±	0,40	a	51,5	±	2,6	c	19,2	±	3,2	c	12,31	±	1,05	a
<b>LR+G</b>	96,48	±	4,21	a	8,96	±	0,61	a	88,9	±	4,5	a	56,6	±	4,8	c	11,68	±	1,50	a
<b>LB+G</b>	92,00	±	13,38	a	10,15	±	1,57	a	84,8	±	3,4	ab	154,4	±	17,4	c	12,43	±	1,36	a
<b>LF+G</b>	50,67	±	4,37	bd	9,69	±	0,82	a	71,4	±	5,4	b	106,6	±	3,3	c	13,18	±	0,15	a

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 19.** Koncentracija aromatskih ugljikovodika, fenola i sumpornih spojeva ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	Stiren			Toluen			Fenol			2-Metoksi-4-vinilfenol			Dimetil-disulfid							
<b>KRUH</b>																				
<b>0-G</b>	9,52	±	1,57	e	4,24	±	0,52	def	55,0	±	2,0	d	546,9	±	45,1	c	11,62	±	0,14	d
<b>LR-G</b>	10,71	±	0,43	de	4,57	±	0,11	ce	87,9	±	6,2	a	2389,2	±	133,7	b	20,67	±	2,33	b
<b>LB-G</b>	13,96	±	1,13	cd	6,51	±	0,36	a	64,9	±	3,3	cd	7026,5	±	688,6	a	3,86	±	0,87	e
<b>LF-G</b>	10,11	±	1,09	de	6,19	±	0,46	ab	59,9	±	7,0	cd	2667,2	±	58,7	b	14,96	±	1,34	cd
<b>0+G</b>	17,92	±	1,78	bc	5,99	±	0,05	ac	57,1	±	2,3	d	395,0	±	17,8	c	20,22	±	1,67	b
<b>LR+G</b>	20,23	±	1,28	b	3,28	±	0,51	f	81,7	±	5,9	ab	502,5	±	62,1	c	27,36	±	1,15	a
<b>LB+G</b>	25,10	±	1,05	a	5,18	±	0,42	bcd	89,5	±	5,2	a	1194,4	±	77,7	c	17,30	±	0,58	bc
<b>LF+G</b>	13,52	±	1,24	d	5,81	±	0,24	ac	73,0	±	2,0	bc	437,3	±	48,6	c	20,24	±	2,03	b
<b>KORA</b>																				
<b>0-G</b>	8,31	±	0,35	c	4,74	±	0,64	c	66,0	±	2,8	de	1422,6	±	76,6	cd	49,69	±	3,16	b
<b>LR-G</b>	13,45	±	1,68	b	6,63	±	0,89	ab	98,0	±	5,0	a	3163,1	±	96,6	b	62,58	±	4,39	b
<b>LB-G</b>	8,78	±	0,26	c	5,32	±	0,43	bc	69,8	±	2,3	d	5937,0	±	702,5	a	61,51	±	3,29	b
<b>LF-G</b>	4,08	±	0,33	d	6,29	±	0,19	b	57,8	±	1,8	e	1738,8	±	178,3	c	53,98	±	4,12	b
<b>0+G</b>	11,63	±	1,29	bc	5,13	±	0,24	bc	72,2	±	1,3	cd	809,9	±	76,6	cd	61,53	±	5,25	b
<b>LR+G</b>	19,70	±	2,00	a	5,28	±	0,56	bc	101,0	±	3,2	a	1454,1	±	47,2	cd	83,22	±	9,10	a
<b>LB+G</b>	14,42	±	0,94	b	7,53	±	0,51	a	84,4	±	6,4	b	1626,7	±	97,8	cd	68,64	±	12,26	ab
<b>LF+G</b>	8,99	±	1,83	c	6,38	±	0,72	ab	80,2	±	3,3	bc	605,6	±	32,2	d	54,40	±	5,84	b

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 20.** Koncentracija pirazina, pirola i furana ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

	2-Metilpirazin			2-Etilpirazin			2,5-Dimetilpirazin			2,6-Dimetilpirazin			2,3,5-Trimetilpirazin			2-Etil-5(6)-metilpirazin								
<b>KRUH</b>																								
<b>0-G</b>	25,2	±	4,5	cde	4,02	±	0,48	cd	17,6	±	2,0	ab	6,08	±	0,78	cd	< LOQ	d	3,19	±	0,30	d		
<b>LR-G</b>	17,1	±	1,3	df	2,03	±	0,09	f	13,4	±	0,9	b	5,27	±	0,31	d	1,52	±	0,14	c	3,42	±	0,21	d
<b>LB-G</b>	32,6	±	1,3	bcf	4,99	±	0,09	b	17,1	±	0,7	ab	7,01	±	0,54	bd	1,89	±	0,28	bc	4,72	±	0,02	b
<b>LF-G</b>	21,5	±	2,7	ef	2,41	±	0,37	f	13,8	±	1,0	b	5,68	±	0,65	d	2,74	±	0,28	ab	3,02	±	0,25	d
<b>0+G</b>	34,8	±	1,3	b	4,66	±	0,19	bce	22,3	±	2,2	a	8,50	±	0,32	bc	2,04	±	0,05	bc	3,61	±	0,32	cd
<b>LR+G</b>	26,9	±	1,6	bdf	4,02	±	0,21	de	17,4	±	3,3	ab	7,71	±	1,24	bd	1,63	±	0,32	c	4,47	±	0,23	bc
<b>LB+G</b>	45,4	±	7,0	a	6,59	±	0,32	a	21,0	±	2,7	a	9,38	±	1,42	bd	3,10	±	0,42	a	5,60	±	0,35	a
<b>LF+G</b>	31,7	±	0,9	bcf	4,75	±	0,16	bce	21,0	±	0,6	a	12,23	±	0,66	a	2,80	±	0,28	ab	4,45	±	0,23	bc
<b>KORA</b>																								
<b>0-G</b>	67,2	±	3,8	c	12,37	±	0,84	c	54,7	±	4,2	b	20,00	±	1,86	cd	5,69	±	0,88	c	10,62	±	1,28	de
<b>LR-G</b>	63,6	±	1,5	c	14,02	±	0,23	c	25,7	±	2,0	d	12,18	±	1,08	e	3,05	±	0,24	d	8,10	±	0,47	e
<b>LB-G</b>	64,1	±	3,7	c	13,27	±	0,72	c	44,0	±	2,9	c	18,64	±	0,88	de	5,62	±	0,43	c	11,79	±	0,75	d
<b>LF-G</b>	61,2	±	1,7	c	13,97	±	0,14	c	30,1	±	1,4	d	12,89	±	1,82	e	3,32	±	0,22	d	7,80	±	1,04	e
<b>0+G</b>	66,4	±	5,3	c	11,75	±	1,92	c	63,3	±	5,2	b	26,71	±	1,68	c	7,74	±	0,37	bc	13,60	±	1,20	d
<b>LR+G</b>	133,4	±	7,2	a	32,67	±	0,90	a	86,3	±	3,3	a	50,02	±	4,04	a	13,22	±	0,42	a	36,60	±	3,05	a
<b>LB+G</b>	98,5	±	3,5	b	22,11	±	0,65	b	84,1	±	2,2	a	41,79	±	1,62	b	13,13	±	1,00	a	25,63	±	1,20	b
<b>LF+G</b>	84,1	±	5,5	b	19,54	±	1,08	b	62,3	±	5,4	b	41,85	±	3,13	b	9,40	±	1,40	b	19,85	±	1,19	c

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

**Tablica 20.** Koncentracija pirazina, pirola i furana ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta – nastavak

	2-Acetilpirol			2-Acetilfuran			Furfural			2-Furanmetanol		
<b>KRUH</b>												
<b>0-G</b>	30,7	± 2,3	c	4,11	± 0,45	b	21,2	± 1,6	c	588	± 78	ac
<b>LR-G</b>	39,6	± 2,1	c	5,06	± 0,02	ab	14,6	± 0,7	e	327	± 31	b
<b>LB-G</b>	46,7	± 2,5	c	5,38	± 0,77	ab	27,4	± 0,9	a	786	± 59	a
<b>LF-G</b>	34,0	± 0,6	c	4,44	± 0,59	b	16,5	± 2,0	de	593	± 111	ac
<b>0+G</b>	69,3	± 10,4	b	4,75	± 0,26	b	22,1	± 0,9	bc	690	± 104	a
<b>LR+G</b>	73,8	± 0,2	b	4,88	± 0,40	b	19,9	± 1,4	cd	540	± 59	ab
<b>LB+G</b>	120,0	± 7,6	a	6,29	± 0,46	a	25,7	± 0,5	ab	617	± 61	a
<b>LF+G</b>	69,1	± 5,5	b	5,01	± 0,16	ab	18,3	± 1,2	ce	424	± 32	bc
<b>KORA</b>												
<b>0-G</b>	110,2	± 12,5	f	12,18	± 0,44	b	74,7	± 1,9	a	3368	± 170	a
<b>LR-G</b>	119,8	± 11,1	ef	8,60	± 0,71	c	47,3	± 2,1	bc	1801	± 78	de
<b>LB-G</b>	158,3	± 6,2	e	12,23	± 0,69	b	67,7	± 2,6	abd	2308	± 56	cd
<b>LF-G</b>	88,1	± 9,8	f	7,62	± 0,18	c	36,2	± 3,2	c	1418	± 220	e
<b>0+G</b>	210,2	± 19,0	d	13,12	± 1,09	b	75,7	± 11,6	a	2839	± 247	ac
<b>LR+G</b>	520,2	± 11,6	b	19,38	± 0,37	a	75,9	± 13,2	a	3024	± 383	ab
<b>LB+G</b>	576,7	± 54,3	a	17,07	± 1,47	a	74,8	± 5,9	a	2676	± 151	bc
<b>LF+G</b>	270,7	± 18,2	c	12,56	± 1,71	b	48,3	± 6,4	cd	1858	± 188	de

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano

Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Na temelju rezultata statističke analize, utvrđeno je kako su na koncentraciju svih analiziranih spojeva značajno utjecali faza pripreme kruha, uzorak (različiti s obzirom na dodatak brašna žutog graška i kiselog tijesta) te njihova interakcija (faktorska ANOVA,  $p < 0,05$ ). U nastavku ovog poglavlja slijedi rasprava o utjecaju pojedine faze pripreme kruha na koncentraciju analiziranih spojeva po kemijskim skupinama.

Prema literaturi, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, benzaldehid i fenilacetaldehid nastaju pri fermentaciji i Maillardovoj reakciji, a benzaldehid može nastati i oksidacijom lipida (Birch i sur., 2014; Pétel i sur., 2017; Pico i sur., 2017a). Pri metaboličkoj aktivnosti kvasaca, Erlichovim putem iz izoleucina nastaje 2-metilbutanal, iz leucina 3-metilbutanal, a iz fenilalanina benzaldehid i fenilacetaldehid (Birch i sur., 2014). U ovom istraživanju 2-metilbutanal i 3-metilbutanal nisu detektirani u kiselom tijestu. Prema Kirchhoff i Schieberle (2002), 3-metilbutanal može nastati pri procesu kiseljenja tijesta, no njegov nastanak ovisi o soju bakterija mliječne kiseline primijenjenom za kiseljenje. Damiani i sur. (1996) su utvrdili povećanje njegove koncentracije samo u slučaju primjene jednog od pet ispitanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Kiseljenje tijesta također nije utjecalo na značajnu

promjenu koncentracije fenilacetaldehida kod većine uzoraka. Nasuprot tome, u kiselom tijestu došlo je do smanjenja koncentracije benzaldehida. Settanni i sur. (2013) su također utvrdili smanjenje koncentracije benzaldehida pri kiseljenju tijesta s pojedinim ispitivanim sojevima bakterija mliječne kiseline. Do povećanja koncentracije navedenih aldehida došlo je u krušnom tijestu prije fermentacije u odnosu na kiselo tijesto, dok je pri krušnoj fermentaciji došlo do smanjenja njihove koncentracije ili nije utvrđena značajna promjena. Moguće objašnjenje takvog utjecaja je nastanak navedenih aldehida pri aktivnosti kvasca tijekom zamjesa krušnog tijesta (Pico i sur., 2017b), a tijekom krušne fermentacije je moglo doći do njihove konverzije u pripadajuće alkohole (Birch i sur., 2014). Kod većine uzoraka pri pečenju nije došlo do značajne promjene ili je pak došlo do blagog smanjenja koncentracije navedenih spojeva, što može biti posljedica hlapljenja pri visokim temperaturama (Martínez-Anaya, 1996). 2-Metilbutanal, 3-metilbutanal, benzaldehid i fenilacetaldehid su u konačnici bili zastupljeniji u kori u odnosu na cijeli kruh, što ukazuje na njihov nastanak Maillardovom reakcijom. Većina analiziranih aldehida – pentanal, heksanal, (*E*)-2-heksenal, heptanal, (*E*)-2-heptenal, oktanal, (*E*)-2-oktenal, nonanal, (*E*)-2-nonenal, dekanal, (*E,E*)-2,4-nonadienal i (*E,E*)-2,4-dekadienal prema literaturi nastaje oksidacijom lipida (Birch i sur., 2014; Nor Qhairul Izzreen i sur., 2016; Parker i sur., 2000). Osim oksidacijom lipida, (*E*)-2-heptenal može nastati i uslijed fermentacije (Damiani i sur., 1996). Unatoč tome što svi navedeni aldehidi nastaju oksidacijom lipida, proces kiseljenja, miješanje tijesta, krušna fermentacija i pečenje različito su utjecali na njihovu koncentraciju u pojedinim fazama pripreme kruha. Neovisno o dodatku brašna žutog graška, u kiselom tijestu utvrđeno je smanjenje koncentracije pentanala, heksanala, (*E*)-2-heksanala, heptanala, (*E*)-2-oktenala i (*E,E*)-2,4-nonadienala. Do značajnog smanjenja koncentracije (*E*)-2-heptenala, oktanela, nonanala, (*E*)-2-nonenala i (*E,E*)-2,4-dekadienala u kiselom tijestu došlo je kod svih uzoraka s dodatkom brašna žutog graška i uzoraka bez dodatka brašna žutog graška pripremljenog s *L. fermentum* (LF-G). Kod ostalih kiselih tijesta, koncentracija navedenih spojeva ostala je nepromijenjena. Smanjenje koncentracije dekanala utvrđeno je jedino u kiselom tijestu pripremljenom s *L. fermentum*, neovisno o dodatku brašna žutog graška. Smanjenje koncentracije aldehida porijeklom iz oksidacije lipida pri kiseljenju tijesta s heterofermentativnim bakterijama mliječne kiseline je očekivano budući da heterofermentativni laktobacili hidriraju nezasićene masne kiseline i time smanjuju nastanak lipidnih peroksida koji su prekursori za nastanak aldehida (Gänzle, 2014). Osim toga, alkohol dehidrogenaza prisutna kod heterofermentativnih laktobacila reducira nastale aldehide u

pripadajuće alkohole (Vermeulen i sur., 2007). Drugi istraživači su također utvrdili smanjenje koncentracije heksanala, (*E*)-2-nonenala i (*E,E*)-2,4-dekadienala u kiselom tijestu (Kirchhoff i Schieberle, 2002; Settanni i sur., 2013; Vermeulen i sur., 2007). Pri tome je utjecaj procesa kiseljenja na koncentraciju navedenih aldehida uvelike ovisio o primijenjenom soju bakterije mliječne kiseline (Damiani i sur., 1996; Settanni i sur., 2013). Za oksidaciju lipida je miješanje tijesta ključan korak budući da dolazi do ugrađivanja zraka, povećanja kontaktne površine između kisika i nezasićenih masnih kiselina te povećanja aktivnosti enzima lipoksigenaze (Maire i sur., 2013). Aktivnost lipoksigenaze se smanjuje s produljenjem vremena miješanja radi denaturacije enzima (Delcros i sur., 1998), a tijekom pečenja dolazi do njegove inaktivacije (Maire i sur., 2013). Kod uzoraka s dodatkom brašna žutog graška, u većini krušnih tijesta prije fermentacije s dodatkom kiselog tijesta došlo je do povećanja koncentracije pentanala, heksanala, (*E*)-2-heksenala, heptanala, (*E*)-2-heptenala, oktanala, (*E*)-2-oktenala, nonanala, (*E*)-2-nonenala, (*E,E*)-2,4-nonadienala i (*E,E*)-2,4-dekadienala, što je očekivana posljedica oksidacije lipida (Maire i sur., 2013), dok je kod uzorka bez dodatka kiselog tijesta došlo do smanjenja njihove koncentracije. Koncentracija pentanala, heksanala i (*E,E*)-2,4-nonadienala u uzorcima krušnog tijesta prije fermentacije bez dodatka brašna žutog graška je bila u skladu s trendom ponašanja kod uzoraka s dodatkom brašna žutog graška. Povećanje koncentracije navedenih produkata oksidacije lipida samo u slučaju dodatka kiselog tijesta upućuje da ili je kiselo tijesto potpomoglo njihov nastanak, ili je kod uzorka bez dodatka kiselog tijesta došlo do intenzivnije konverzije aldehida nastalih oksidacijom lipida u alkohole, kiseline i estere (Birch i sur., 2014; Martínez-Anaya, 1996). Kod uzoraka krušnog tijesta prije fermentacije bez dodatka brašna žutog graška je koncentracija (*E*)-2-oktenala, dekanala i (*E,E*)-2,4-dekadienala bila različita ovisno o dodanom kiselom tijestu; koncentracija (*E*)-2-heksenala se povećala kod uzoraka s dodatkom kiselog tijesta, a ostala nepromijenjena u uzorku bez njegovog dodatka; koncentracija heptanala se povećala neovisno o dodatku kiselog tijesta; a koncentracija (*E*)-2-heptenala, oktanala, nonanala, (*E*)-2-nonenala se smanjila ili pak ostala nepromijenjena. Do smanjenja koncentracije navedenih aldehida moglo je doći uslijed njihove konverzije u alkohole, kiseline i estere (Birch i sur., 2014; Martínez-Anaya, 1996). Utjecaj krušne fermentacije bio je različit ovisno o analiziranom spoju i uzorku. Utvrđeni različiti utjecaj može biti posljedica različite dostupnosti prekursora za nastanak svakog od navedenih spojeva te moguće degradacije/konverzije u neki drugi spoj. Također, pri pečenju je došlo do smanjenja, izostanka promjene ili povećanja koncentracije navedenih aldehida ovisno o analiziranom spoju, dodatku brašna žutog graška i dodanom

kiselom tijestu. Posljedično se i zastupljenost navedenih aldehida u kori u odnosu na kruh razlikovala ovisno o analiziranom spoju i uzorku. Smanjenje koncentracije pojedinih aldehida u kruhu je moguća posljedica hlapljenja pri pečenju (Martínez-Anaya, 1996) ili njihove konverzije u druge spojeve (Adams i sur., 2011b, 2011a). Pri zagrijavanju, iz aldehida nastalih oksidacijom lipida mogu nastati novi karbonilni spojevi, furani i drugi spojevi, pri čemu aminokiseline djeluju kao katalizatori reakcije (Adams i sur., 2011b). Osim toga, tijekom pečenja, aldehidi mogu nastati i uslijed autooksidacije lipida i pucanja hidroperoksida nastalih oksidacijom lipida što onda doprinosi povećanju njihove koncentracije (Maire i sur., 2013; Pico i sur., 2017b).

Keton 2-butanon koji prema literaturi nastaje fermentacijom, oksidacijom lipida i Maillardovom reakcijom (Guerzoni i sur., 2007; Pétel i sur., 2017; Poinot i sur., 2010) detektiran je jedino u uzorcima kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* i onima s njegovim dodatkom. Gómez-Torres i sur. (2016) su također utvrdili povećanje njegove koncentracije u siru pripremljenom s *L. reuteri*. U krušnom tijestu bez brašna žutog graška došlo je do smanjenja, a s dodatkom brašna žutog graška do povećanja njegove koncentracije. Do povećanja njegove koncentracije došlo je i tijekom krušne fermentacije, moguće uslijed nastavka metaboličke aktivnosti *L. reuteri*. Prilikom pečenja se koncentracija 2-butanona značajno smanjila te je u konačnici bio manje zastupljen u kori u odnosu na kruh. S obzirom na to da je detektiran jedino u uzorcima s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri*, može se zaključiti da je 2-butanon u ovom istraživanju nastao isključivo uslijed fermentacije s *L. reuteri*. Prema literaturi, 2,3-butandion nastaje metabolizmom bakterija mliječne kiseline i kvasaca te Maillardovom reakcijom (Birch i sur., 2014; Hansen i Schieberle, 2005; Kirchhoff i Schieberle, 2002). Damiani i sur. (1996) su detektirali 2,3-butandion u kiselim tijestima pripremljenim s homofermentativnim, no ne i s heterofermentativnim bakterijama mliječne kiseline. Prema rezultatima ovog istraživanja se pri kiseljenju koncentracija 2,3-butandiona smanjila ili ostala nepromijenjena u slučaju uzorka LB-G. Smanjenje njegove koncentracije pri kiseljenju moguća je posljedica konverzije u druge spojeve kao što su 2-butanon i 2-butanol pomoću bakterija mliječne kiseline (Keen i sur., 1974). Povećanje njegove koncentracije utvrđeno je u krušnom tijestu prije i nakon fermentacije, što je i očekivano budući da nastaje metabolizmom kvasaca (Birch i sur., 2013b). U kruhu je utvrđeno smanjenje njegove koncentracije, a budući da je zastupljeniji u kori nego u cijelom kruhu, može se zaključiti da nastaje tijekom Maillardove reakcije. Pico i sur. (2017b) su također utvrdili povećanje njegove koncentracije tijekom krušne fermentacije te smanjenje nakon



pečenja. 2,3-Pentandion u proizvodnji kruha prema literaturi nastaje Maillardovom reakcijom (Nor Qhairul Izzreen i sur., 2016; Poinot i sur., 2010). Pri kiseljenju uzoraka s dodatkom brašna žutog graška utvrđeno je smanjenje koncentracije 2,3-pentandiona, što je moguća posljedica njegove konverzije u druge spojeve (Hummel i sur., 1990). U uzorcima krušnog tijesta prije fermentacije s dodatkom kiselog tijesta utvrđeno je povećanje njegove koncentracije, kao i u uzorcima nakon krušne fermentacije. Kod uzoraka bez dodatka brašna žutog graška, 2,3-pentandion je detektiran tek nakon krušne fermentacije. Prema Krogerus i Gibson (2013), 2,3-pentandion nastaje metabolizmom kvasaca pri fermentaciji piva. Liu i sur. (2018) su također utvrdili povećanje koncentracije 2,3-pentandiona u kineskom parenom kruhu fermentiranom s kvascima što upućuje da je njegov nastanak pri krušnoj fermentaciji u ovom istraživanju također moguća posljedica metabolizma kvasaca. Pri pečenju uzoraka s dodatkom brašna žutog graška došlo je do značajnog smanjenja koncentracije 2,3-pentandiona, a kod uzoraka bez njegovog dodatka do blagog povećanja ili pak nije utvrđena značajna promjena koncentracije. Veća zastupljenost 2,3-pentandiona u kori u odnosu na kruh upućuje na njegov nastanak tijekom Maillardove reakcije te je u skladu s rezultatima Chiavaro i sur. (2008). U većini uzoraka je tijekom kiseljenja došlo do smanjenja koncentracije 2-heptanona, moguće radi konverzije u druge spojeve pod utjecajem bakterija mliječne kiseline, a krušna fermentacija nije utjecala na značajnu promjenu njegove koncentracije. Do povećanja njegove koncentracije došlo je prilikom pečenja te je njegova zastupljenost bila veća u kori nego u cijelom kruhu. Budući da prema literaturi nastaje oksidacijom lipida (Nor Qhairul Izzreen i sur., 2016), povećanje njegove koncentracije pečenjem moguća je posljedica degradacije hidroperoksida nastalih oksidacijom lipida pri visokim temperaturama (Pico i sur., 2017b). Chiavaro i sur. (2008) su također utvrdili njegovu veću zastupljenost u kori u odnosu na sredinu kruha. Pri kiseljenju tijesta došlo je do smanjenja koncentracije 6-metil-5-hepten-2-ona (osim kod uzorka LR-G u kojem je ostala nepromijenjena), moguće radi konverzije u druge spojeve pomoću bakterija mliječne kiseline. Do povećanja njegove koncentracije u krušnom tijestu prije fermentacije došlo je samo kod uzoraka s dodatkom brašna žutog graška i kiselog tijesta, što je i očekivano budući da prema literaturi nastaje fermentacijom i oksidacijom lipida (Gheysen i sur., 2018; Pétel i sur., 2017). Krušna fermentacija nije utjecala na značajnu promjenu koncentracije 6-metil-5-hepten-2-ona. U kruhu je došlo do smanjenja njegove koncentracije, a njegova zastupljenost u kori u odnosu na kruh se razlikovala ovisno o analiziranom uzorku. Paraskevopoulou i sur. (2012) su u sredini kruha utvrdili veću, a Chiavaro i sur. (2008) manju zastupljenost 6-metil-5-hepten-2-

ona u odnosu na koru kruha. Koncentracija 2-oktanona u kiselom tijestu je ostala nepromijenjena ili je došlo do njenog smanjenja, vjerojatno radi konverzije u druge spojeve pomoću bakterija mliječne kiseline. Do njenog povećanja došlo je u krušnom tijestu prije i poslije fermentacije, što je i očekivano budući da prema literaturi nastaje fermentacijom i oksidacijom lipida (Birch i sur., 2013b; Pétel i sur., 2017). U kruhu je utvrđena značajno manja koncentracija u odnosu na krušno tijesto nakon fermentacije te je njegova zastupljenost u kruhu bila veća nego u kori.

Alkohol 2-metil-1-propanol nije detektiran u kiselom tijestu, 3-metil-1-butanol ili nije detektiran ili je njegova koncentracija u kiselom tijestu bila ispod granice kvantifikacije, a 2-feniletanol je određen u niskoj koncentraciji. Prisutnost, odnosno povećanje njihove koncentracije utvrđeno je u krušnom tijestu prije početka te nakon fermentacije krušnog tijesta. Navedeno povećanje koncentracije bilo je očekivano budući da se radi o alkoholima koji nastaju uslijed metaboličke aktivnosti kvasca pri fermentaciji Erlichovim putem. Pri tome 2-metil-1-propanol nastaje iz valina, 3-metil-1-butanol iz leucina, a 2-feniletanol iz fenilalanina (Birch i sur., 2014). Settanni i sur. (2013) su utvrdili povećanje koncentracije 3-metil-1-butanola i u kiselom tijestu ovisno o primijenjenim bakterijama mliječne kiseline, što ukazuje na mogućnost njegovog nastanka uslijed metabolizma specifičnih bakterija. Prisutnost 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola i 2-feniletanola u krušnom tijestu na početku fermentacije moguća je posljedica aktivnosti kvasaca prilikom zamjesa krušnog tijesta (Pico i sur., 2017b). Pico i sur. (2017b) su također utvrdili prisutnost navedenih alkohola u tijestu prije početka krušne fermentacije i povećanje njihove koncentracije tijekom krušne fermentacije. U kruhu je utvrđeno značajno smanjenje koncentracije navedenih alkohola, što se može objasniti hlapljenjem pri pečenju (Pico i sur., 2015). Pico i sur. (2017b) su utvrdili smanjenje koncentracije 2-metil-1-propanola i 3-metil-1-butanola te povećanje koncentracije 2-feniletanola u kruhu u odnosu na krušno tijesto na kraju fermentacije. 2-Feniletanol prema literaturi može nastati i Maillardovom reakcijom (Pico i sur., 2017b; Poinot i sur., 2010), no u ovom istraživanju nije utvrđeno povećanje njegove koncentracije u kruhu ili kori kruha u odnosu na krušno tijesto nakon fermentacije. 2-Metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol i 2-feniletanol bili su zastupljeniji u cijelom kruhu u odnosu na koru kruha, što je u skladu s rezultatima Paraskevopoulou i sur. (2012) te Chiavaro i sur. (2008) za 2-metil-1-propanol i 3-metil-1-butanol. Prema literaturi, alkoholi 1-pentanol, 1-heksanol, 1-heptanol, 1-oktanol i 1-okten-3-ol mogu nastati tijekom fermentacije i oksidacije lipida (Damiani i sur., 1996; Hansen i Hansen, 1994b; Pétel i sur., 2017). U skladu s tim, u ovom

istraživanju je u kiselom tijestu utvrđena veća koncentracija 1-heksanola i 1-heptanola (osim kod uzoraka LB+G i LF-G za 1-heptanol). Nadalje, do značajnog povećanja njihove koncentracije došlo je u krušnom tijestu prije fermentacije (osim uzorka LR-G za 1-heksanol), što se može objasniti nastavkom metaboličke aktivnosti bakterija mliječne kiseline i reakcijama oksidacije lipida prilikom zamjesa. Koncentracija 1-pentanola i 1-okten-3-ola razlikovala se u fazama pripreme kruha ovisno o dodatku brašna žutog graška. Kod uzoraka s dodatkom brašna žutog graška, utvrđeno je smanjenje koncentracije navedenih alkohola u kiselom tijestu te povećanje u krušnom tijestu prije fermentacije s dodatkom kiselog tijesta. Nasuprot tome, kod uzoraka bez dodatka brašna žutog graška, u kiselom tijestu utvrđeno je blago povećanje ili nepromijenjena koncentracija, ovisno o primijenjenim bakterijama mliječne kiseline, a u krušnom tijestu prije fermentacije blago smanjenje ili nepromijenjena koncentracija. Značajna promjena koncentracije 1-oktanola u kiselom tijestu u većini slučajeva nije utvrđena, no ovisno o primijenjenim bakterijama mliječne kiseline i dodatku brašna žutog graška, kod nekih uzoraka utvrđeno je blago smanjenje (LF+G) ili povećanje (LR-B, LB-G) njegove koncentracije. Settanni i sur. (2013) su također utvrdili različiti utjecaj kiseljenja tijesta na koncentraciju 1-pentanola, 1-heksanola, 1-heptanola, 1-oktanola i 1-okten-3-ola ovisno o primijenjenim bakterijama mliječne kiseline. U odnosu na kiselo tijesto, u krušnom tijestu prije fermentacije te tijekom fermentacije krušnog tijesta došlo je do značajnog povećanja koncentracije 1-oktanola jedino u slučaju uzoraka s dodatkom brašna žutog graška. Koncentracija navedenih alkohola mijenjala se različito tijekom krušne fermentacije, ovisno o analiziranom spoju, dodatku brašna žutog graška i kiselog tijesta te nije uočen jednaki trend kretanja. Utvrđene razlike u koncentracijama navedenih spojeva u pojedinim fazama pripreme kruha ovisno o dodatku brašna žutog graška i kiselog tijesta mogu biti posljedica razlike u prisutnosti nezasićenih masnih kiselina i drugih prekursora za nastanak navedenih spojeva, antioksidansa (Pico i sur., 2017a) i enzima lipoksigenaza u rižinom brašnu u odnosu na brašno žutog graška (Domoney i sur., 1990; Malekian i sur., 2000), različita metabolička aktivnost primijenjenih bakterija mliječne kiseline (Damiani i sur., 1996) te njena interakcija s korištenim sirovinama (Czerny i Schieberle, 2002; Rehman i sur., 2006). Prema literaturi, 2-etil-1-heksanol nastaje prilikom oksidacije lipida (Liu i sur., 2017; Maire i sur., 2013). Značajno povećanje koncentracije 2-etil-1-heksanola utvrđeno je jedino u krušnom tijestu prije fermentacije u odnosu na kiselo tijesto, što ukazuje na njegov očekivani nastanak prilikom oksidacije lipida tijekom miješanja (Liu i sur., 2017) i/ili veću koncentraciju u sirovinama dodanim u krušno tijesto. (Z)-3-heksenol je detektiran jedino kod

uzoraka s dodatkom brašna žutog graška, a prema literaturi nastaje oksidacijom lipida (Kobayashi i sur., 1994). Utvrđeno je smanjenje njegove koncentracije u uzorcima kiselog tijesta LR+G i LB+G. Park i sur. (2017) su također utvrdili smanjenje koncentracije (Z)-3-heksenola tijekom fermentacije soka bobičastog voća pomoću bakterija mliječne kiseline. Utvrđeno smanjenje koncentracije (Z)-3-heksenola u kiselom tijestu može biti posljedica djelovanja bakterija mliječne kiseline na hidriranje nezasićenih masnih kiselina i time smanjenje dostupnosti prekursora za njegov nastanak (Gänzle, 2014). U odnosu na kiselo tijesto, u krušnom tijestu prije fermentacije došlo je do očekivanog povećanja njegove koncentracije budući da je miješanje tijesta ključan korak za oksidaciju lipida (Maire i sur., 2013). Povećana koncentracija (E)-2-oktenola utvrđena je u svim uzorcima kiselog tijesta, što je u skladu s rezultatima Settanni i sur. (2013), osim u uzorku LB+G u kojem je utvrđeno smanjenje njegove koncentracije. U odnosu na kiselo tijesto, u uzorcima krušnog tijesta prije fermentacije došlo je do povećanja njegove koncentracije kod uzoraka s dodatkom brašna žutog graška, a smanjenja koncentracije kod uzoraka bez dodatka brašna žutog graška. Smanjenje koncentracije (E)-2-oktenola utvrđeno je i u krušnom tijestu nakon fermentacije. Budući da (Z)-3-nonenol također nastaje oksidacijom lipida (Nor Qhairul Izzreen i sur., 2016), do očekivanog povećanja njegove koncentracije došlo je u krušnom tijestu prije te nakon fermentacije. Osim toga, i kiseljenje tijesta s *L. reuteri* utjecalo je na povećanje koncentracije (Z)-3-nonenola. Settanni i sur. (2013) su također utvrdili povećanje koncentracije 3-nonenola u pšeničnom kiselom tijestu pripremljenom s *L. citreum* PON10079 i *L. mesenteroides* PON10031. U kruhu je utvrđeno značajno smanjenje koncentracije većine do sad navedenih alkohola što bi se moglo objasniti hlapljenjem pri pečenju (Pico i sur., 2015). Usporedbom zastupljenosti u cijelom kruhu i kori, utvrđena je njihova veća zastupljenost u sredini kruha. Prema literaturi, fenilmetanol može nastati tijekom fermentacije, oksidacije lipida i Maillardove reakcije (Pétel i sur., 2017; Pico i sur., 2017b). U skladu s tim, u ovom istraživanju utvrđeno je povećanje njegove koncentracije u krušnom tijestu prije fermentacije u odnosu na kiselo tijesto te tijekom krušne fermentacije. Za većinu uzoraka, u kruhu nije došlo do značajne razlike u koncentraciji fenilmetanola u odnosu na krušno tijesto nakon fermentacije, što bi se moglo objasniti hlapljenjem fenilmetanola nastalog fermentacijom i oksidacijom lipida te njegovim nastankom Maillardovom reakcijom (Martínez-Anaya, 1996). Također, za većinu uzoraka utvrđena je veća koncentracija fenilmetanola u kori u odnosu na cijeli kruh, što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja (Paraskevopoulou i sur., 2012; Pico i sur., 2018a).

Pri kiseljenju tijesta došlo je do povećanja koncentracije svih analiziranih kiselina (2-metilbutanske, pentanske, heksanske, heptanske, oktanske, dekanske i benzojeve kiseline). Pentanska kiselina detektirana je jedino u kiselom tijestu. Drugi istraživači su također utvrdili povećanje koncentracije 2-metilbutanske, pentanske, heksanske, oktanske, dekanske i benzojeve kiseline u kiselom tijestu (Axel i sur., 2016; Czerny i Schieberle, 2002; Ravvys i De Vuyst, 2011; Settanni i sur., 2013; Vernocchi i sur., 2008). Onyango i sur. (2004) su utvrdili povećanje koncentracije heptanske kiseline pri fermentaciji afričke kisele kaše Uji pomoću bakterija mliječne kiseline. Do smanjenja koncentracije kiselina došlo je u krušnom tijestu prije fermentacije, osim u slučaju dekanske kiseline kod koje je utvrđeno smanjenje, povećanje ili nepromijenjena koncentracija ovisno o analiziranom uzorku. Smanjenje koncentracije kiselina može biti posljedica razrjeđenja sirovinama dodanim u krušno tijesto ili konverzije u estere metabolizmom kvasaca (Pico i sur., 2017b), a povećanje posljedica daljnjeg nastanka metabolizmom bakterija mliječne kiseline. Tijekom krušne fermentacije došlo je do povećanja koncentracije navedenih kiselina – samo u slučaju dodatka kiselog tijesta za 2-metilbutansku, heksansku i heptansku kiselinu, a neovisno o dodatku kiselog tijesta za oktansku, dekansku i benzojevu kiselinu. 2-Metilbutanska kiselina može nastati oksidacijom 2-metilbutanala nastalog Erlichovim putem tijekom fermentacije (Berry i Watson, 1987), a heksanska kiselina oksidacijom heksanala tijekom oksidacije lipida pomoću enzima aldehyd dehidrogenaze (Pico i sur., 2017b). Prema Berry i Watson (1987), karboksilne kiseline (heksanska, oktanska, dekanska kiselina) nastaju metabolizmom kvasaca iz supstrata malonil koenzima A pomoću enzima sintetaze masnih kiselina. Dobiveni rezultati za oktansku i dekansku kiselinu su u skladu s očekivanim budući da je do povećanja njihove koncentracije došlo neovisno o dodatku kiselog tijesta. Nasuprot tome, nije utvrđeno moguće povećanje koncentracije 2-metilbutanske i heksanske kiseline u uzorcima bez dodatka kiselog tijesta. Pico i sur. (2017b) također nisu utvrdili povećanje koncentracije 2-metilbutanske i heksanske kiseline tijekom fermentacije krušnog tijesta samo s kvascem. U kruhu je došlo do smanjenja ili nepromijenjene koncentracije navedenih kiselina u odnosu na krušno tijesto na kraju fermentacije, što je i očekivano budući da većinom nastaju tijekom fermentacije.

U većini kiselih tijesta došlo je do povećanja koncentracije etil-benzoata, etil-heksanoata, etil-tetradekanoata i etil-heksadekanoata (osim kod uzorka LB-G kod kojeg je koncentracija ostala nepromijenjena) te povećanja ili nepromijenjene koncentracije etil-oktanoata. Prema literaturi, nastanak i koncentracija nastalih estera u kiselom tijestu ovisi o primijenjenom soju bakterija mliječne kiseline (Hansen i Hansen, 1994b; Seitz i sur., 1998). Hansen i Hansen (1994b),

Kaseleht i sur. (2011) te Settanni i sur. (2013) su utvrdili nastanak etil-heksanoata, etil-oktanoata i etil-heksadekanoata pri kiseljenju tijesta. Esteri nastaju i u stanicama kvasaca enzimskom reakcijom acetil-koenzima A derivata masnih kiselina C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> i alkohola koju kataliziraju alkohol acetiltransferaze (Birch i sur., 2014; Pico i sur., 2015). Karboksilne kiseline su također važni prekursori za nastanak estera (Berry i Watson, 1987). Ovisno o dostupnim kiselinama i alkoholima kao prekursorima, nastaju različiti esteri. U ovom istraživanju je u krušnom tijestu prije fermentacije u većini analiziranih uzoraka došlo do povećanja koncentracije etil-benzoata, etil-oktanoata i etil-heksanoata te smanjenja ili nepromijenjene koncentracije etil-tetradekaonata i etil-heksadekanoata. Tijekom fermentacije krušnog tijesta došlo je do očekivanog povećanja koncentracije svih analiziranih estera. Esteri manjih molekulskih masa su jako hlapljivi i ishlape tijekom pečenja (Birch i sur., 2014). U skladu s tim je u većini slučajeva tijekom pečenja došlo do smanjenja koncentracije etil-benzoata, etil-oktanoata i etil-heksanoata. Pico i sur. (2017b) su također utvrdili smanjenje koncentracije etil-oktanoata pri pečenju. Osim toga, zastupljenost navedenih estera bila je manja u kori u odnosu na kruh, što je u skladu s rezultatima Paraskevopoulou i sur. (2012). Za razliku od navedenih estera, koncentracija etil-tetradekanoata i etil-heksadekanoata je ostala nepromijenjena u odnosu na koncentraciju u krušnom tijestu na kraju fermentacije, moguće radi više temperature vrelišta u odnosu na estere manjih molekulskih masa.

Kod većine analiziranih uzoraka, pri kiseljenju tijesta nije došlo do značajne promjene koncentracije stirena i toluena, dok je povećanje koncentracije analiziranih aromatskih ugljikovodika utvrđeno u većini krušnih tijesta prije fermentacije u odnosu na kiselo tijesto. Povećanje koncentracije stirena utvrđeno je i tijekom krušne fermentacije, dok je za toluen utvrđen različit utjecaj ovisno o analiziranom uzorku. Do smanjenja njihove koncentracije došlo je u kruhu, a razlika u zastupljenosti stirena i toluena u kori u odnosu na kruh ovisila je o analiziranom uzorku. Seitz i sur. (1998) su također utvrdili različitu zastupljenost stirena u sredini i kori kruha ovisno o analiziranom uzorku.

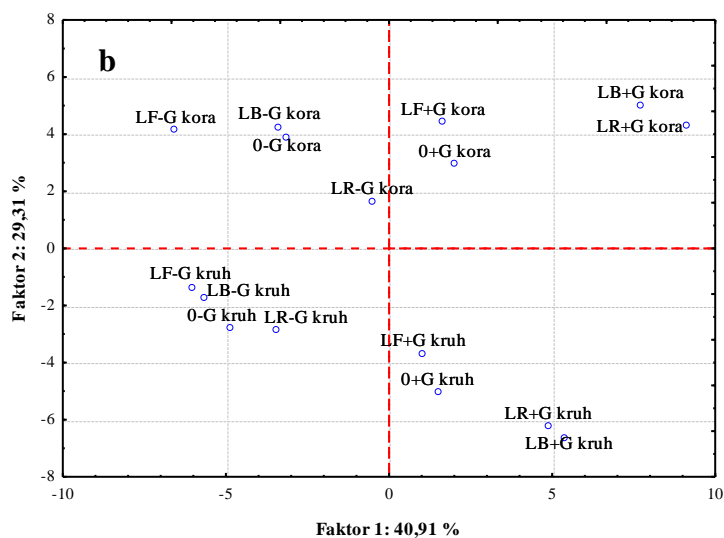
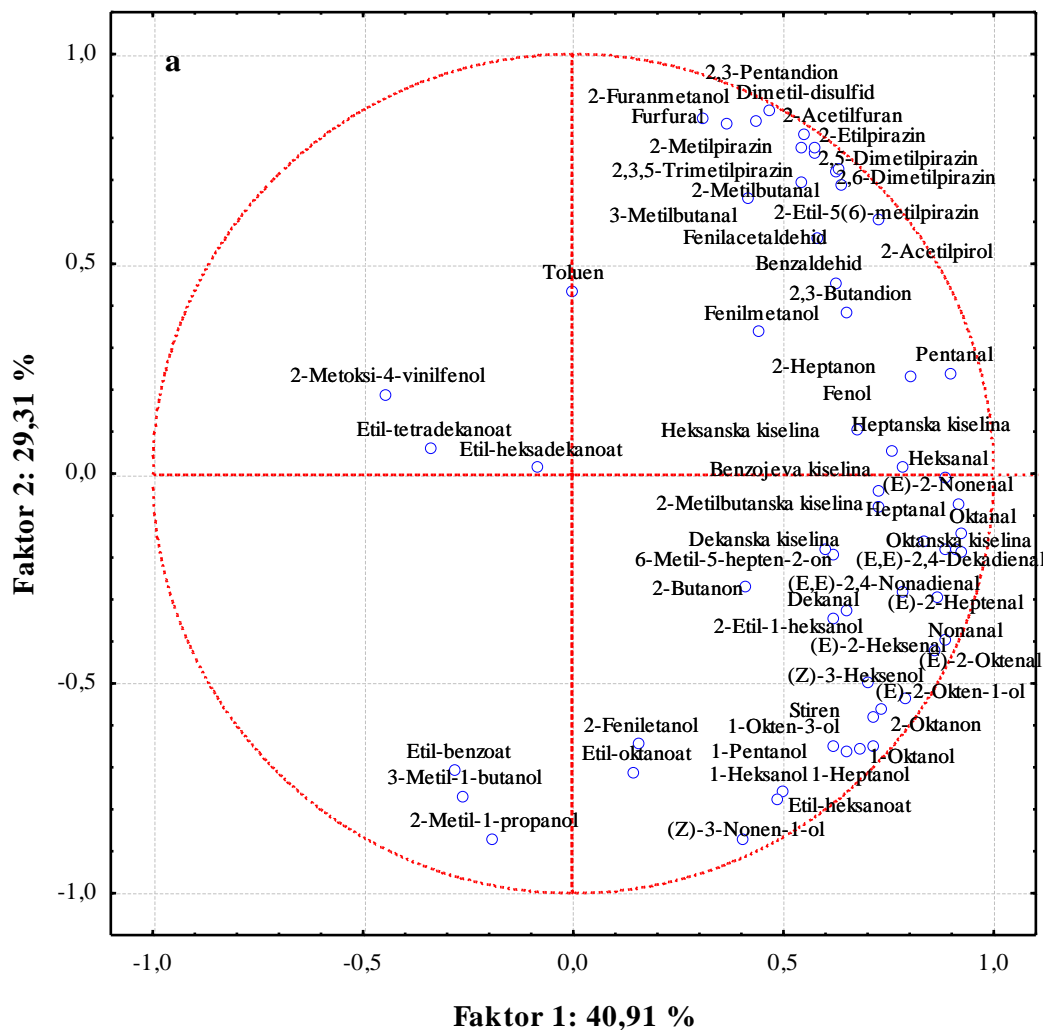
Prema literaturi, fenol nastaje tijekom fermentacije i Maillardove reakcije (Pétel i sur., 2017; Poinot i sur., 2010). U ovom istraživanju utvrđeno je očekivano povećanje njegove koncentracije u kiselom tijestu neovisno o primijenjenim bakterijama mliječne kiseline. U krušnom tijestu prije fermentacije došlo je do smanjenja njegove koncentracije, vjerojatno kao posljedica razrjeđenja, odnosno dodatka sirovina koji ga ne sadrže ili sadrže u manjoj koncentraciji. Prilikom krušne fermentacije i pečenja nije došlo do značajne promjene koncentracije fenola, iako je očekivano njeno povećanje uslijed Maillardove reakcije tijekom

pečenja. 2-Metoksi-4-vinilfenol prema literaturi nastaje Maillardovom reakcijom (Birch i sur., 2014). Tijekom fermentacije kiselog tijesta došlo je do povećanja koncentracije slobodne ferulinske kiseline čijom toplinski induciranom dekarboksilacijom pri pečenju nastaje 2-metoksi-4-vinilfenol (Hansen i Schieberle, 2005). U skladu s tim, povećanje koncentracije 2-metoksi-4-vinilfenola u kruhu i kori kruha utvrđeno je za većinu analiziranih uzoraka. Zanimljivo je što je za 2-metoksi-4-vinilfenol utvrđen isti trend ponašanja koncentracije u kiselom tijestu i krušnom tijestu prije fermentacije, kao i za fenol. U kiselom tijestu je također došlo do značajnog povećanja njegove koncentracije što upućuje da 2-metoksi-4-vinilfenol može nastati i metabolizmom primijenjenih bakterija mliječne kiseline. Prema Van Beek i Priest (2000), određeni sojevi bakterija mliječne kiseline imaju enzim dekarboksilazu hidroksicimete kiseline koji može dekarboksilacijom konvertirati *p*-kumarinsku i/ili ferulinsku kiselinu u 2-metoksi-4-vinilfenol, što objašnjava njegov nastanak pri kiseljenju tijesta u ovom istraživanju.

U kiselom tijestu pripremljenom s *L. reuteri* utvrđeno je povećanje koncentracije dimetil-disulfida, dok u ostalim uzorcima kiselog tijesta nije utvrđena značajna promjena koncentracije. Kaseleht i sur. (2011) su također utvrdili povećanje koncentracije dimetil-disulfida u kiselom tijestu pripremljenom s bakterijama mliječne kiseline. Povećanje njegove koncentracije utvrđeno je i u većini uzoraka kruha u odnosu na krušno tijesto nakon fermentacije te u kori u odnosu na kruh, što je i očekivano budući da sumporni spojevi nastaju Maillardovom reakcijom (Martínez-Anaya, 1996). Seitz i sur. (1998) su također utvrdili veću koncentraciju dimetil-disulfida u kori u odnosu na sredinu kruha.

Piroli, furani i pirazini su spojevi koji nastaju prilikom pečenja na površini kruha uslijed neenzimske Maillardove reakcije (Pozo-Bayón i sur., 2006). Furani mogu nastati i karamelizacijom šećera na površini kruha i toplinskom degradacijom šećera i aminokiselina pri pečenju (Pico i sur., 2015). Stoga je očekivana najveća koncentracija navedenih spojeva u kori kruha. U skladu s tim, u odnosu na kruh, u kori kruha je utvrđena značajno veća koncentracija svih analiziranih spojeva iz navedenih skupina – 2-acetilpirola, 2-acetilfurana, 2-metilpirazina, 2-etilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina, 2-etil-(5,6)-metilpirazina, furfurala i 2-furanmetanola. Paraskevopoulou i sur. (2012), Pico i sur. (2018a) te Schieberle i Grosch (1991) su također utvrdili veću koncentraciju pirolina, piridina, pirazina, pirana, pirola i furana u kori u usporedbi sa sredinom kruha.

Na slici 16 prikazani su rezultati PCA analize profila hlapljivih spojeva arome kruha i kore.



**Slika 16.** Faktorsko opterećenje (engl. *loadings*) (a) i bodovi (engl. *scores*) (b) dobiveni PCA analizom profila hlapljivih spojeva arome uzoraka kruha i kore različitih prema dodatku brašna žutog graška i BMK za pripremu kiselog tijesta (KT). Oznake: 0 – bez KT; LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška



Prikazani faktori 1 i 2 opisuju 70,22 % varijance te je iz navedene slike vidljiva jasna podjela uzoraka kore i sredine po faktoru 2. Koru kruha su više karakterizirali spojevi koji nastaju pri pečenju uslijed Maillardove reakcije, reakcija karamelizacije i toplinske degradacije (pirazini, pirol, furani i pojedini aldehidi, ketoni, alkoholi), a kruh (sredinu i koru) spojevi koji nastaju pri fermentaciji i oksidaciji lipida (aldehidi, ketoni, alkoholi, kiseline i pojedini esteri).

Uspoređujući profil hlapljivih spojeva arome kiselog tijesta, krušnog tijesta, kruha i kore, može se zaključiti kako su kiselo tijesto najviše karakterizirale kiseline koje nastaju uslijed metaboličke aktivnosti bakterija mliječne kiseline; krušno tijesto prije i nakon fermentacije alkoholi, aldehidi, ketoni i esteri koji nastaju fermentacijom i oksidacijom lipida; kruh također alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri te pirazini, pirol i furani; a koru pirazini, pirol i furani koji nastaju Maillardovom i drugim toplinski ovisnim reakcijama.

#### 4.2.3.2. Utjecaj dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline na profil hlapljivih spojeva arome kruha

Rezultati određivanja profila hlapljivih spojeva arome uzoraka različitih prema dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta nalaze se u tablicama od 14 do 20. S obzirom na rezultate određivanja profila hlapljivih spojeva arome tijesta prije početka kiseljenja bez i s dodatkom brašna žutog graška (0-G i 0+G), utvrđena je veća koncentracija većine analiziranih aldehida i alkohola, svih analiziranih ketona, heptanske i benzojeve kiseline, dimetil-disulfida i stirena u brašnu žutog graška u odnosu na integralno rižino brašno. (Z)-3-heksenol i 2,3-pentandion detektirani su jedino u uzorku kiselog tijesta s dodatkom brašna žutog graška. Koncentracija alkohola 2-feniletanola; aldehida 2-metilbutanala, 3-metilbutanala, benzaldehida, benzacetaldehida; svih analiziranih fenola i estera te većine kiselina i toluena nije se značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška u tijesto prije početka kiseljenja što upućuje na to da se njihova koncentracija u integralnom rižinom brašnu i brašnu žutog graška nije značajno razlikovala.

Koncentracija 2-metilbutanala, 3-metilbutanala i fenilacetaldehida u uzorcima kruha bez dodatka kiselog tijesta (0+G i 0-G) se nije značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška. Dodatak kiselog tijesta utjecao je na povećanje njihove koncentracije, moguće radi proteolize pri kiseljenju tijesta (Gänzle i sur., 2008) te oslobađanja prekursora izoleucina, leucina i fenilalanina (Birch i sur., 2014). Izraženije povećanje koncentracije 2-metilbutanala, 3-metilbutanala i fenilacetaldehida s dodatkom kiselog tijesta utvrđeno je kod kruha s dodatkom brašna žutog graška, moguće radi prirodno većeg udjela izoleucina, leucina i

fenilalanina u brašnu žutog graška u odnosu na integralno rižino brašno (FAO, 1970; Millar i sur., 2019). Najveće povećanje koncentracije 2-metilbutanala, 3-metilbutanala i fenilacetaldehida utvrđeno je kod uzorka kruha LB+G u kojem je njihova koncentracija bila od 2,7 do 3 puta veća u odnosu na kruh s dodatkom brašna žutog graška, bez dodatka kiselog tijesta (0+G), odnosno od 1,7 do 2,1 puta veća u odnosu na kruh bez dodatka brašna žutog graška, s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* (LB-G). U skladu s tim, u uzorku kore kruha LB+G je također utvrđena najveća koncentracija 2-metilbutanala ( $2157,1 \pm 100,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), 3-metilbutanala ( $1524,1 \pm 91,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i fenilacetaldehida ( $264,01 \pm 9,37 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Osim za fenilacetaldehid, aminokiselina fenilalanin je prekursor i za nastanak benzaldehida (Birch i sur., 2014). U odnosu na kruh bez dodatka kiselog tijesta i brašna žutog graška (0-G), u kruhu s dodatkom brašna žutog graška (0+G) utvrđena je 35 % veća koncentracija benzaldehida. Što se tiče utjecaja dodatka kiselog tijesta, jedino je u kruhu s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. fermentum* zamijećeno smanjenje njegove koncentracije oko od 50 % do 70 % ovisno o dodatku brašna žutog graška, što je moguća posljedica najvećeg smanjenja njegove koncentracije pri kiseljenju tijesta. U kruhu s dodatkom brašna žutog graška, bez dodatka kiselog tijesta (0+G) utvrđena je veća koncentracija (*E*)-2-heptenala, (*E*)-2-oktenala, (*E*)-2-nonenala, (*E,E*)-2,4-nonadienala i (*E,E*)-2,4-dekadienala u odnosu na kruh bez njegovog dodatka (0-G). Iako je pri kiseljenju tijesta došlo do značajnog smanjenja njihove koncentracije, pri zamjesu krušnog tijesta i krušnoj fermentaciji se njihova koncentracija ponovno povećala te je u konačnici koncentracija navedenih aldehida bila veća u kruhu s dodatkom brašna žutog graška. Dodatak kiselog tijesta utjecao je na koncentraciju navedenih spojeva u kruhu, no njegov utjecaj razlikovao se ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta. Dodatak kiselog tijesta utjecao je na značajniju razliku u koncentraciji navedenih aldehida u kruhu s dodatkom brašna žutog graška, pri čemu je povećanje njihove koncentracije utvrđeno uzorcima kruha LR+G i LB+G, uz najveću koncentraciju utvrđenu u uzorku LR+G. Povećanje koncentracija (*E*)-2-nonenala, (*E,E*)-2,4-nonadienala i (*E,E*)-2,4-dekadienala utvrđeno je i u kruhu bez dodatka brašna žutog graška, s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* (LR-G). Kao i u slučaju prethodno navedenih aldehida, i koncentracija pentanala, heksanala i (*E*)-2-heksenala bila je veća u kruhu s dodatkom brašna žutog graška. Dodatak kiselog tijesta utjecao je na smanjenje koncentracije heksanala u kruhu od 17 % do 32 %, neovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje. Nasuprot tome, dodatak kiselog

tijesta nije imao značajan utjecaj na koncentraciju pentanala i (*E*)-2-heksenala (osim uzorka LF+G u kojem je utvrđeno smanjenje njegove koncentracije). Koncentracija heptanala, oktanala i dekanala u uzorcima kruha bez dodatka kiselog tijesta (0+G i 0-G) se nije značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška, dok je za nonanal utvrđeno povećanje koncentracije s dodatkom brašna žutog graška. Za razliku od uzoraka kruha bez dodatka brašna žutog graška u kojima je utvrđen izostanak značajnog utjecaja ili smanjenje koncentracije navedenih spojeva s dodatkom kiselog tijesta, kod uzoraka s dodatkom brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* (LB+G) utvrđeno je povećanje njihove koncentracije od 21 % do 55 % u odnosu na kruh bez kiselog tijesta (0+G).

Kao što je prethodno navedeno, keton 2-butanon detektiran je jedino u kruhu s dodatkom tijesta pripremljenog s *L. reuteri*, pri čemu je dodatak brašna žutog graška značajno utjecao na njegovu koncentraciju. U kruhu i kori kruha s dodatkom brašna žutog graška utvrđena je oko tri puta veća koncentracija 2-butanona u odnosu na kruh i koru bez njegovog dodatka, moguće kao posljedica veće dostupnosti prekursora za njegov nastanak u brašnu žutog graška. Unatoč razlikama u koncentraciji u fazama koje prethode pečenju, u konačnici dodatak kiselog tijesta nije utjecao na značajnu promjenu koncentracije 2,3-butandiona u kruhu. Jedino je u slučaju uzorka kruha LF-G utvrđeno značajno povećanje njegove koncentracije za 35 % u odnosu na kruh bez dodatka kiselog tijesta (0-G). Hansen i Hansen (1996) su utvrdili veću koncentraciju 2,3-butandiona u sredini kruha s dodatkom 15 % kiselog tijesta samo kod primjene *L. sanfrancisco* za pripremu kiselog tijesta. U sredini kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, *L. delbruecki* i *L. plantarum* nisu utvrdili značajnu razliku u koncentraciji 2,3-butandiona. Dodatak brašna žutog graška je neovisno o dodatku kiselog tijesta utjecao na povećanje koncentracije 2,3-butandiona u kruhu (od 41 % do 54 %) i kori kruha (od 48 % do 66 %), što ukazuje da je ono sadržavalo više prekursora za nastanak 2,3-butandiona. Jednak utjecaj dodatka brašna žutog graška utvrđen je i na koncentraciju 2,3-pentandiona, 2-heptanona i 2-oktanona. Ovisno o spoju, primijenjenim bakterijama mliječne kiseline za pripremu kiselog tijesta i dodatku brašna žutog graška, njihova se koncentracija s dodatkom kiselog tijesta nije značajno mijenjala ili je došlo do njenog smanjenja (50 %). Smanjenje njihove koncentracije potencijalno može biti posljedica konverzije u druge spojeve pod utjecajem bakterija mliječne kiseline. Za razliku od prethodno navedenih spojeva, dodatak brašna žutog graška nije utjecao na značajnu promjenu koncentracije 6-metil-5-hepten-2-ona u kruhu, a značajan utjecaj kiselog tijesta utvrđen je

samo u slučaju uzorka kruha LF-G u kojem je došlo do smanjenja njegove koncentracije u odnosu na uzorak bez kiselog tijesta (0-G).

Koncentracija 2-metil-1-propanola i 3-metil-1-butanola u kruhu bez dodatka kiselog tijesta (0+G i 0-G) se nije značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška. Dodatak kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* i *L. fermentum* utjecao je na smanjenje koncentracije 2-metil-1-propanola u kruhu (do 13 % do 29 %). Budući da se koncentracija 2-metil-1-butanola nije značajno razlikovala u uzorcima tijesta nakon krušne fermentacije, razlike u njegovoj koncentraciji u kruhu moguća su posljedica različitog gubitka hlapljenjem pri pečenju. Za 3-metil-1-butanol utvrđeno je smanjenje koncentracije u kruhu LR-G (29 %), a povećanje koncentracije u uzorcima kruha LB-G (32 %) i LB+G (45 %). Navedeni rezultati su i očekivani s obzirom na to da 3-metil-1-butanol nastaje pri fermentaciji (Birch i sur., 2014) te da je u uzorku tijesta LR-G na kraju krušne fermentacije njegova koncentracija bila 20 % manja, a u uzorcima tijesta LB-G i LB+G 35 % i 38 % veća od koncentracije u uzorku bez dodatka kiselog tijesta. Hansen i Hansen (1996) su utvrdili povećanje koncentracije 3-metil-1-butanola u sredini kruha s dodatkom 15 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. sanfrancisco*, *L. delbruecki* i *L. plantarum*, dok kod dodatka kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* nisu utvrdili značajnu razliku u njegovoj koncentraciji. U usporedbi s kruhom bez dodatka brašna žutog graška, koncentracija 1-pentanola, 1-heksanola, 1-heptanola, 1-oktanola, (*E*)-2-okten-1-ola, 1-okten-3-ola u svim analiziranim uzorcima te 2-etil-1-heksanola, (*Z*)-3-nonenola i fenilmetanola u većini analiziranih uzoraka je bila značajno veća u kruhu s njegovim dodatkom, neovisno o dodatku kiselog tijesta. (*Z*)-3-heksenol je detektiran samo u uzorcima s dodatkom brašna žutog graška, a koncentracija 2-feniletanola nije se značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška. Veća koncentracija navedenih alkohola prirodno prisutnih u sirovini i/ili veća dostupnost prekursora za njihov nastanak u procesu pripreme je mogući razlog veće koncentracije navedenih alkohola u kruhu. Utvrđen je različit utjecaj dodatka kiselog tijesta na koncentraciju navedenih alkohola u kruhu, a razlikovao se s obzirom na analizirani spoj, bakterije mliječne kiseline primijenjene za kiseljenje te dodatak brašna žutog graška. Unatoč razlikama u koncentraciji u fazama koje prethode pečenju, u konačnici dodatak kiselog tijesta nije utjecao na značajnu promjenu koncentracije 1-pentanola u kruhu. Za 1-heksanol i 2-etil-1-heksanol je utvrđeno značajno smanjenje koncentracije samo u slučaju kruha LR+G (21 %). Značajno povećanje koncentracije 1-heptanola (20 %), 1-oktanola (29 %), (*E*)-2-okten-1-ola (37 %) i 1-okten-3-ola (20 %) s dodatkom kiselog tijesta utvrđeno je samo u kruhu LB+G. U kruhu s brašnom žutog graška se s dodatkom kiselog

tijesta koncentracija (Z)-3-heksenola i fenilmetanola smanjila od 16 % do 28 % odnosno od 20 % do 43 %, neovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje. Jedino je dodatak kiselog tijesta pripremljenog s *L. fermentum* utjecao na značajno smanjenje koncentracije (E)-2-okten-1-ola (27 %), (Z)-3-nonenola (30 %), fenilmetanola (34 %) i 2-feniletanola (40 %) u kruhu bez brašna žutog graška te (Z)-3-nonenola (26 %) i 2-feniletanola (41 %) u kruhu s njegovim dodatkom. Hansen i Hansen (1996) su utvrdili povećanje koncentracije 2-feniletanola u sredini kruha s dodatkom 15 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* i *L. plantarum*, dok kod dodatka kiselog tijesta pripremljenog s *L. sanfrancisco* i *L. delbruecki* nisu utvrdili značajnu razliku u njegovoj koncentraciji.

Prema dobivenim rezultatima, utvrđeno je povećanje koncentracije 2-metilbutanske, heksanske, heptanske i oktanske kiseline u kruhu s dodatkom kiselog tijesta (od 23 % do 151 %). Utvrđeni utjecaj kiselog tijesta je bio očekivan budući da je u kiselom tijestu utvrđeno povećanje koncentracije navedenih kiselina. Najveće koncentracije navedenih kiselina određene su u kruhu s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri*. Dodatak brašna žutog graška je također značajno utjecao na koncentraciju navedenih kiselina. Povećanje koncentracije 2-metilbutanske i oktanske kiseline utvrđeno je u svim uzorcima kruha neovisno o dodatku kiselog tijesta. Koncentracija heksanske i heptanske kiseline u uzorcima kruha bez dodatka kiselog tijesta (0+G i 0-G) se nije značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška, no kod kruha s dodatkom kiselog tijesta utvrđeno je značajnije povećanje njihove koncentracije u kruhu s brašnom žutog graška (od 23 % do 52 % za heksansku kiselinu i od 64 % do 115 % za heptansku kiselinu u odnosu na od 42 % do 73 % za heksansku kiselinu i od 96 % do 151 % za heptansku kiselinu). Dodatak brašna žutog graška utjecao je i na značajno povećanje koncentracije benzojeve kiseline u kruhu, neovisno o dodatku kiselog tijesta. No nasuprot prethodno navedenim kiselinama, u kruhu s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* ili *L. fermentum* došlo je do smanjenja koncentracije benzojeve kiseline (od 25 % do 45 %), što može biti posljedica intenzivnije konverzije u druge spojeve. Koncentracija dekanske kiseline u uzorcima kruha bez dodatka kiselog tijesta (0+G i 0-G) se nije značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška. U uzorcima kruha LR+G i LB+G utvrđena je značajno veća koncentracija dekanske kiseline u odnosu na kruh bez dodatka kiselog tijesta, što je u skladu s rezultatima određivanja njene koncentracije u fazama koje su prethodile pečenju. U odnosu na kruh bez dodatka kiselog tijesta i brašna žutog graška, u kruhu LR-G utvrđena je veća koncentracija dekanske kiseline, što je i

očekivano s obzirom na značajno veću koncentraciju u tijestu nakon krušne fermentacije, a u kruhu LF-G manja koncentracija dekanske kiseline.

Unatoč značajno većoj koncentraciji etil-heksanoata i etil-oktanoata nakon krušne fermentacije tijesta bez brašna žutog graška u odnosu na tijesto s njegovim dodatkom, u kruhu s dodatkom brašna žutog graška je koncentracija etil-heksanoata bila veća (od 14 % do 39 %), dok se koncentracija etil-oktanoata nije razlikovala s obzirom na dodatak brašna žutog graška. U slučaju kruha bez dodatka brašna žutog graška, značajan utjecaj kiselog tijesta na koncentraciju etil-heksanoata, etil-oktanoata, etil-tetradekanoata i etil-heksadekanoata utvrđen je samo kod kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* pri čemu je došlo do povećanja njihove koncentracije od 25 % do 49 %. Kiseline su važni prekursori nastanka estera, a u kruhu s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri* utvrđena je najveća koncentracija kiselina. U slučaju kruha s dodatkom brašna žutog graška, značajan utjecaj kiselog tijesta utvrđen je kod kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* pri čemu je došlo do povećanja koncentracije etil-oktanoata (48 %), etil-tetradekanoata (58 %) i etil-heksadekanoata (76 %) te kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* pri čemu je došlo do povećanja koncentracije etil-oktanoata u kruhu (51 %). U kruhu bez dodatka brašna žutog graška (0-G) utvrđena je od 55 % do 86 % veća koncentracija etil-tetradekanoata, etil-heksadekanoata i etil-benzoata u odnosu na kruh s njegovim dodatkom (0+G).

Dodatak brašna žutog graška utjecao je na povećanje koncentracije stirena u kruhu bez i s većinom dodanih kiselih tijesta (osim kiselog tijesta pripremljenog s *L. fermentum*), kao i dodatak kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* (od 40 % do 46 %). Dodatak brašna žutog graška utjecao je na povećanje koncentracije toluena u kruhu bez dodatka kiselog tijesta (41 %), kao i dodatak kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* i *L. fermentum* u kruh bez dodatka brašna žutog graška (od 46 % do 54 %). Dodatak kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* u kruh s dodatkom brašna žutog graška utjecao je na smanjenje koncentracije toluena (45 %).

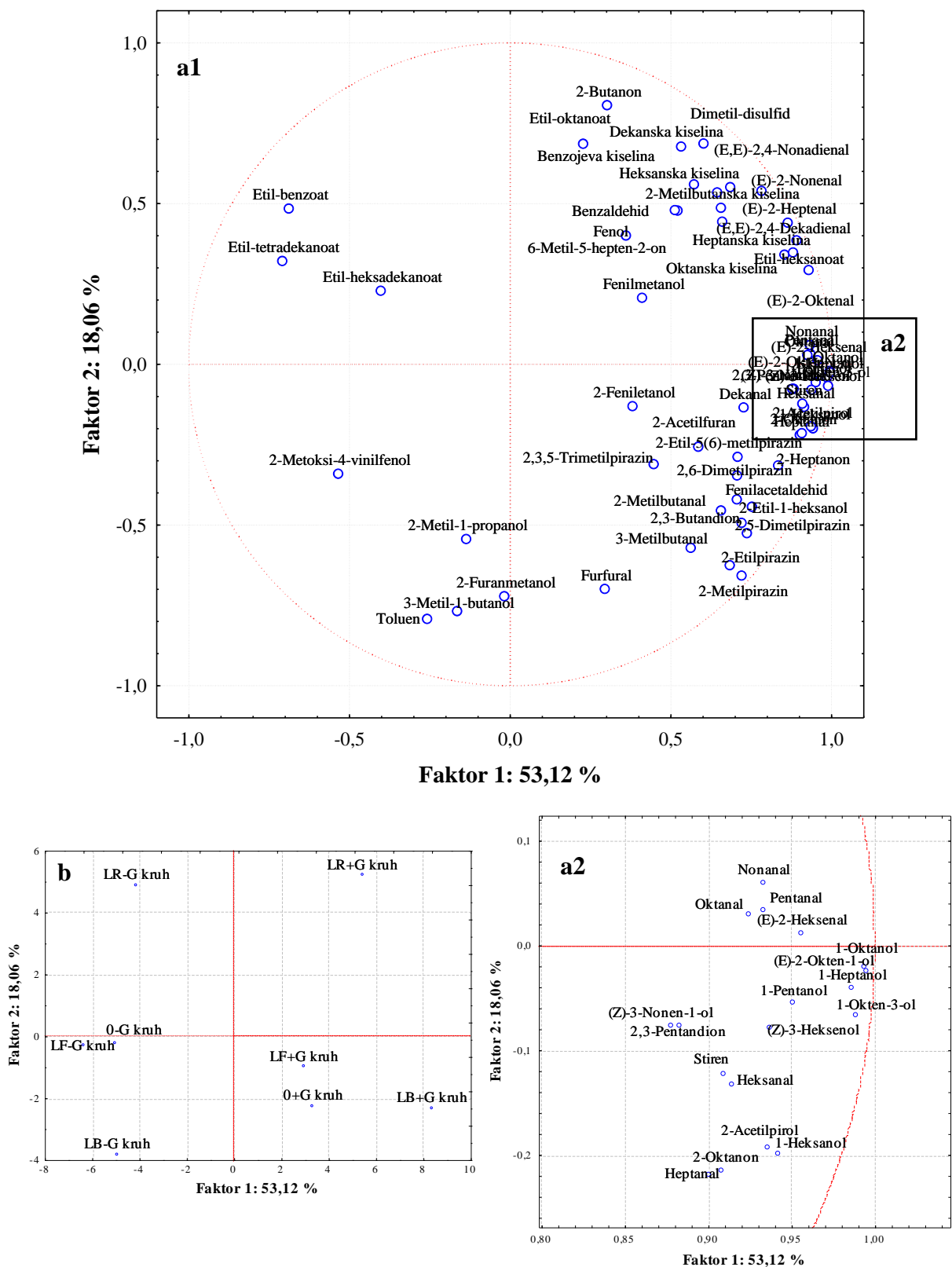
Koncentracija fenola i 2-metoksi-4-vinilfenola u kruhu nije se značajno razlikovala ovisno o dodatku brašna žutog graška (0-G i 0+G). Dodatak kiselog tijesta utjecao je na povećanje koncentracije fenola u kruhu s dodatkom brašna žutog graška neovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje (od 28 % do 57 %), dok je kod kruha bez dodatka brašna žutog graška utvrđeno povećanje njegove koncentracije samo u slučaju kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* (60 %). Dodatak kiselog tijesta utjecao je i na povećanje koncentracije 2-metoksi-4-vinilfenola u kruhu bez dodatka brašna žutog graška, pri

čemu je najveće povećanje njegove koncentracije (oko četiri puta) utvrđeno u kruhu LB-G. U kruhu s dodatkom brašna žutog graška nije utvrđen značajan utjecaj kiselog tijesta na koncentraciju 2-metoksi-4-vinilfenola.

Dodatak brašna žutog graška utjecao je na povećanje koncentracije dimetil-disulfida u kruhu (od 32 % do 448 %), kao i dodatak kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* (od 35 % do 78 %).

S obzirom na određenu koncentraciju pirazina, pirola i furana u kori kruha, dodatak brašna žutog graška u kruh bez kiselog tijesta utjecao je jedino na povećanje koncentracije 2-acetilpirola u kori kruha (91 %). Dodatak kiselog tijesta u kruh s brašnom žutog graška utjecao je na povećanje koncentracije 2-metilpirazina (od 48 % do 101 %), 2-etilpirazina (od 66 % do 178 %), 2,5-dimetilpirazina (od 33 % do 36 %), 2,6-dimetilpirazina (od 56 % do 87 %), 2,3,5-trimetilpirazina (od 21 % do 71 %), 2-etil-(5,6)-metilpirazina (od 46 % do 169 %), 2-acetilpirola (od 29 % do 174 %) i 2-acetilfurana (od 30 % do 48 %) u kori kruha, a razmjjer povećanja ovisio je o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta. Izuzetak je koncentracija 2,5-dimetilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina i 2-acetilfurana u uzorku kore kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. fermentum* u kojem nije utvrđena značajna razlika u odnosu na koru kruha bez dodatka kiselog tijesta. Utjecaj kiselog tijesta na povećanje koncentracije navedenih spojeva u kori kruha očitovao se i na koncentraciji 2-metilpirazina (30 %), 2-etilpirazina (41 %), 2,3,5-trimetilpirazina (52 %), 2-etil-(5,6)-metilpirazina (55 %), 2-acetilpirola (73 %) i 2-acetilfurana (32 %) u kruhu LB+G, 2,6-dimetilpirazina (44 %) u kruhu LF+G, dok za uzorke kruha s dodatkom drugih kiselih tijesta nije utvrđena značajna razlika u odnosu na kruh bez kiselog tijesta. Dodatak kiselog tijesta u kruh bez brašna žutog graška ili nije utjecao na značajnu razliku u koncentraciji 2-metilpirazina, 2-etilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina, 2-etil-(5,6)-metilpirazina i 2-acetilfurana u kori kruha ili je došlo do smanjenja njihove koncentracije. Za razliku od navedenih spojeva, u kori kruha LB-G utvrđeno je povećanje koncentracije 2-acetilpirola (44 %).

Utjecaj dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta na profil hlapljivih spojeva arome kruha jasno je vidljiv na slici 17 na kojoj su prikazani rezultati PCA analize.



**Slika 17.** Faktorsko opterećenje (engl. *loadings*) (a1 i a2) i bodovi (engl. *scores*) (b) dobiveni PCA analizom profila hlapljivih spojeva arome uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška i BMK za pripremu kiselog tijesta (KT). Oznake: 0 – bez KT; LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška



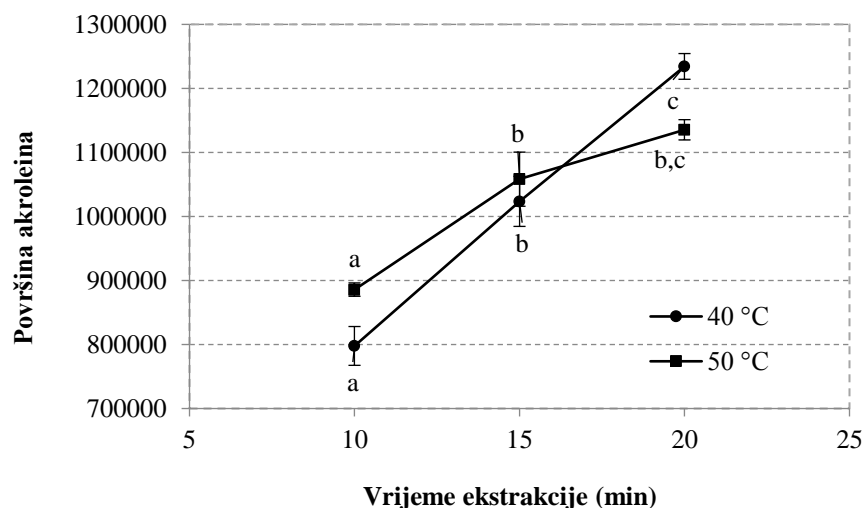
Prikazani faktori 1 i 2 opisuju 71,18 % varijance. Uzorci su s obzirom na dodatak brašna žutog graška podijeljeni po faktoru 1 te je vidljivo kako je kruh s dodatkom brašna žutog graška karakterizirala veća koncentracija većine analiziranih spojeva u odnosu na kruh bez njegovog dodatka. Nasuprot tome, kruh bez dodatka brašna žutog graška karakterizirala je veća koncentracija etil-benzoata, etil-tetradekanoata, etil-heksadekanoata i 2-metoksi-4-vinilfenola. Nadalje, vidljivo je i odvajanje uzoraka s obzirom na dodatak kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline po faktoru 2 za kruh bez dodatka brašna žutog graška te po faktorima 2 i 1 za kruh s dodatkom brašna žutog graška. S obzirom na izraženije odvajanje uzoraka s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* i *L. brevis* u odnosu na kruh bez dodatka kiselog tijesta, može se zaključiti da su navedena kisela tijesta utjecala na veću promjenu profila hlapljivih spojeva arome kruha u odnosu na kiselo tijesto pripremljeno s *L. fermentum*. Kruh s dodatkom brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* (LR+G) karakterizirala je ponajprije veća koncentracija 2-butanona, dimetil-disulfida, etil-oktanoata, dekanske, benzojeve i heksanske kiseline, (*E*)-2-nonenala, (*E,E*)-2,4-nonadienala, dok je kruh s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* (LB+G) karakterizirala veća koncentracija većine analiziranih aldehida, ketona, alkohola, pirazina, pirola i furana.

#### 4.2.4. Akrolein

S obzirom na nedostatak metoda za određivanje akroleina i mogućnost njegove prisutnosti u kruhu, razvijena je i validirana HS-SPME/GC-MS metoda za kvantifikaciju akroleina u kiselom tijestu, krušnom tijestu i kruhu te je određena njegova koncentracija u različitim fazama pripreme kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri*. Rezultati ovog dijela istraživanja prikazani su u radu Drakula i sur. (2019).

##### 4.2.4.1. Razvoj i validacija HS-SPME/GC-MS za određivanje akroleina

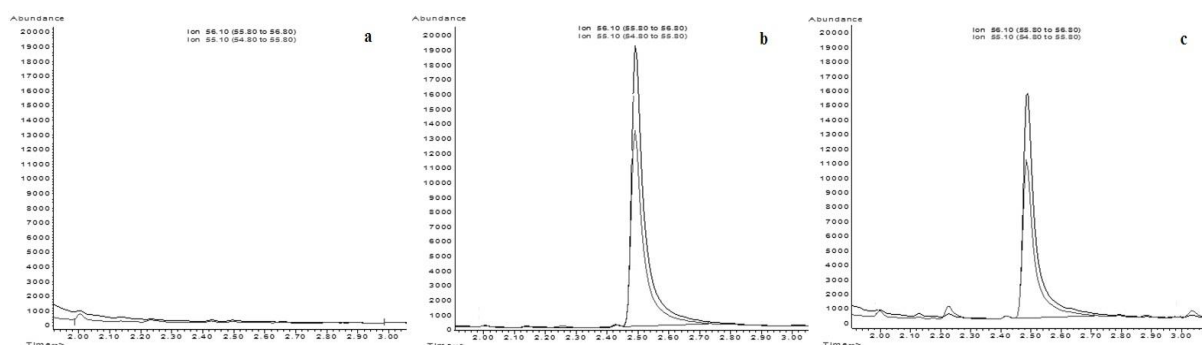
Razvoj metode obuhvaćao je odabir parametara SPME ekstrakcije. Analiziran je utjecaj dvije temperature (40 °C i 50 °C) te tri vremena trajanja ekstrakcije (10 min, 15 min i 20 min). Budući da su GC analiza i hlađenje sustava nakon analize na početnu temperaturu trajali oko 25 minuta te da je cilj bio postići što kraće vrijeme analize, najduže vrijeme ekstrakcije koje je bilo ispitano je 20 minuta. Prema dobivenim rezultatima, interakcija primijenjenog vremena i temperature je značajno utjecala na učinkovitost ekstrakcije akroleina ( $p = 0,010$ ) (slika 18).



**Slika 18.** Površina akroleina pri različitim uvjetima SPME ekstrakcije. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,05$ )

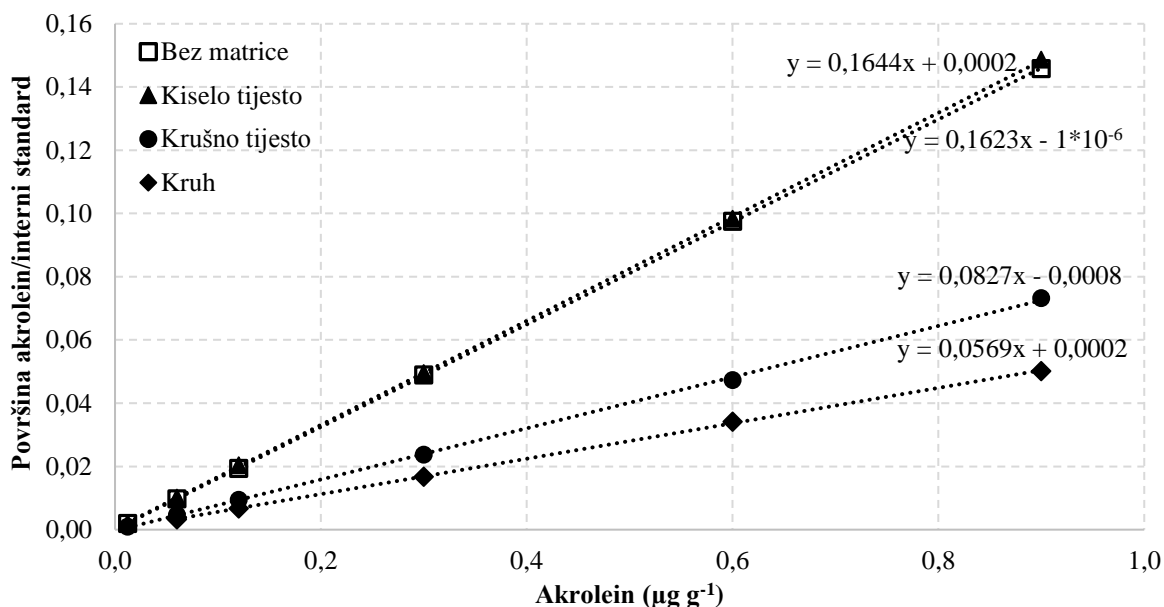
Do povećanja učinkovitosti je došlo s produljenjem vremena ekstrakcije ( $p < 0,001$ ), no ne uvijek s povišenjem temperature pri istom trajanju ekstrakcije. S obzirom na određenu najveću površinu pika akroleina, odabrani su sljedeći uvjeti ekstrakcije: 40 °C i 20 min. Kächele i sur. (2014) su primijenili ekstrakciju pri 50 °C tijekom 10 za određivanje akroleina u alkoholnim pićima.

Validacija metode obuhvaćala je ispitivanje sljedećih validacijskih parametara – selektivnosti, linearnosti, preciznosti, stabilnosti otopina te granice detekcije i kvantifikacije. Na slici 19 prikazani su kromatogrami ciljanog i kvalifikacijskih iona akroleina u uzorku bez akroleina, otopini standarda (koncentracija akroleina  $0,300 \mu\text{g g}^{-1}$ ) i uzorku s akroleinom (koncentracija akroleina  $0,550 \mu\text{g g}^{-1}$ ).



**Slika 19.** Kromatogrami ciljanog i kvalifikacijskih iona akroleina kod a) uzorka bez akroleina, b) otopine standarda, c) uzorka s akroleinom dobiveni HS-SPME/GC-MS metodom

Izostanak interferirajućih pikova analiziranih iona potvrđuje selektivnost metode pri određivanju akroleina. Kalibracijski eksperimenti su provedeni metodom unutarnjeg standarda i metodom dodatka standarda s tri različite matrice (kiselo tijesto, krušno tijesto, kruh) kako bi se utvrdio njen potencijalni utjecaj na učinkovitost ekstrakcije akroleina. Dobivene kalibracijske krivulje prikazane su na slici 20.



**Slika 20.** Kalibracijske krivulje dobivene analizom otopine akroleina HS-SPME/GC-MS metodom bez dodatka matrice (□) s dodatkom matrice kiselog tijesta (▲), krušnog tijesta (●) kuha (◆) u rasponu koncentracija akroleina od 0,012  $\mu\text{g g}^{-1}$  do 0,900  $\mu\text{g g}^{-1}$

Usporedbom kalibracijske krivulje dobivene analizom bez dodatka matrice i one s dodatkom matrice kiselog tijesta utvrđen je 1 % veći nagib u slučaju matrice kiselog tijesta iz čega se može zaključiti da kiselo tijesto nije značajno utjecalo na učinkovitost ekstrakcije akroleina. Razlika u nagibu do 10 % smatra se prihvatljivim odstupanjem u navedenom slučaju (NATA, 2018). Nasuprot tome, nagib kalibracijske krivulje za krušno tijesto i kruh bio je 49 % odnosno 65 % manji u odnosu na nagib krivulje bez matrice. Budući da se kompeticija analita između ekstrakcijskih faza razlikuje ovisno o afinitetu analita za pojedinu fazu, kompleksna matrica može uzrokovati interferencije u ekstrakciji (Pawliszyn, 2012). Osim toga, akrolein je jako reaktivan spoj te potencijalno može reagirati sa spojevima prisutnim u matrici čime se posljedično smanjuje njegova ekstrakcija (Bauer i sur., 2010a). Najmanja osjetljivost metode utvrđena je u matrici kruha. Od svih ispitivanih matrica, kruh ima najkompleksniji profil hlapljivih spojeva zahvaljujući toplinskoj obradi. Stoga bi se manja učinkovitost ekstrakcije akroleina mogla objasniti i većom koncentracijom interferirajućih hlapljivih spojeva koji se

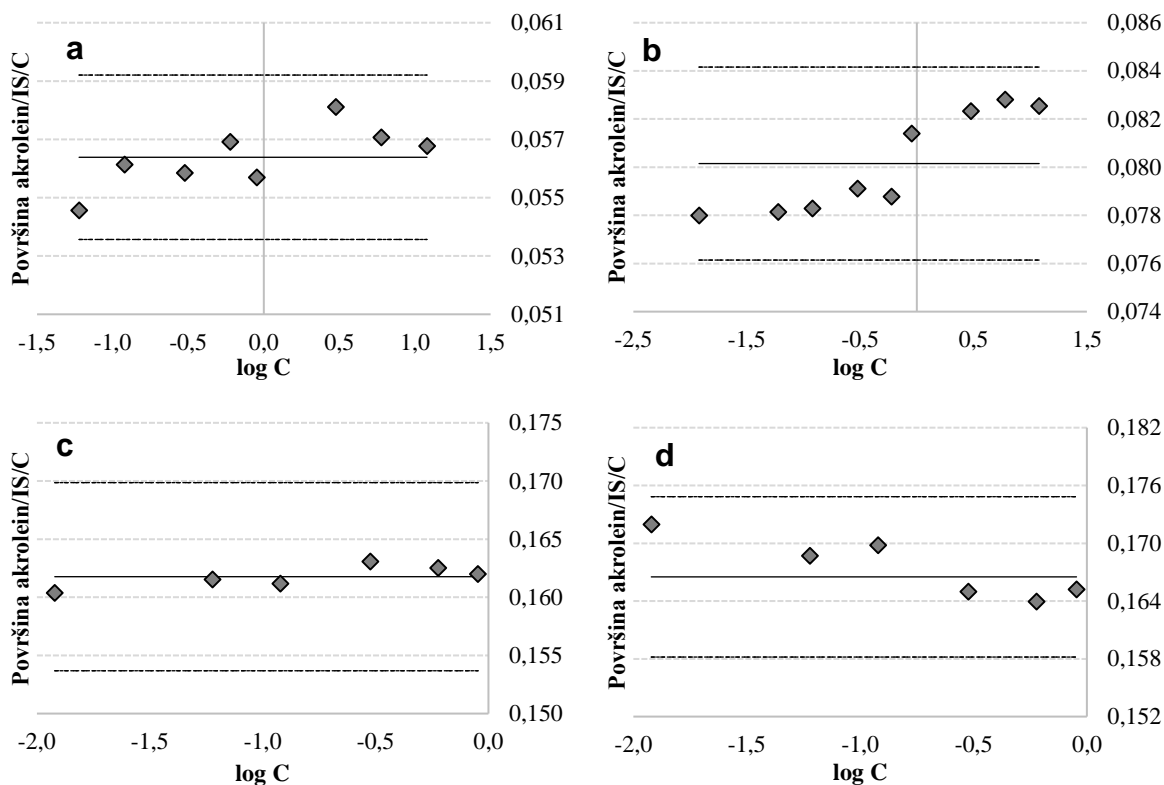
natječu za adsorpciju/apsorpciju na SPME vlakno. Rezultat takve kompeticije ovisi o koncentraciji analita i njegovom afinitetu za SPME vlakno (Pawliszyn, 2012).

Područje rada razvijene metode je u nekim slučajevima obuhvaćalo tri reda veličine koncentracije akroleina kako bi se obuhvatio cijeli raspon očekivanih koncentracija. U svrhu određivanja linearnosti metode, analizirano je nekoliko pokazatelja – koeficijent korelacije, rezidualna suma kvadrata, Fischerova F-vrijednost i pripadajuća p-vrijednost, a rezultati su prikazani u tablici 21.

**Tablica 21.** Rezultati određivanja linearnosti, preciznosti, granice detekcije i kvantifikacije HS-SPME/GC-MS metode za određivanje akroleina u različitim matricama prema fazama pripreme kruha

	Bez matrice	Kiselo tijesto	Krušno tijesto	Kruh
<i>Linearnost</i>				
<b>Područje (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	0,012-0,900	0,012-0,900	0,012-12,000	0,060-0,900
<b>Jednadžba kalibracijske krivulje</b>	$y = 0,1623 x - 1 \times 10^{-6}$	$y = 0,1644 x + 0,0002$	$y = 0,0827 x - 0,0008$	$y = 0,0569 x + 0,0002$
<b>Koeficijent korelacije (r)</b>	0,9995	0,9997	0,9999	1,0000
<b>Rezidualna suma kvadrata (SSE)</b>	$4,59 \times 10^{-5}$	$2,17 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$5,97 \times 10^{-5}$
<b>F vs. p-vrijednost</b>	$20953 > 1,10 \times 10^{-31}$	$17786 > 5,27 \times 10^{-19}$	$149863 > 3,31 \times 10^{-33}$	$243862 > 8,88 \times 10^{-37}$
<i>Preciznost</i>				
<b>Ponovljivost (RSD, %)</b>	0,8-4,0	0,4-2,7	0,1-2,9	0,3-1,9
<b>Medupreciznost (RSD, %)</b>			5,9-6,4	
<b>Granica detekcije (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>			1,21	
<b>Granica kvantifikacije (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>			4,05	

Dobiveni koeficijenti korelacije zadovoljavali su kriterij  $> 0,999$  (Green, 1996). Osim toga, utvrđene su male vrijednosti rezidualnih suma kvadrata te p-vrijednosti značajno manje od pripadajućih F-vrijednosti. Na slici 21 prikazana je ovisnost faktora odziva (površina akrolein/unutarnji standard/koncentracija akroleina) i logaritma koncentracije akroleina.



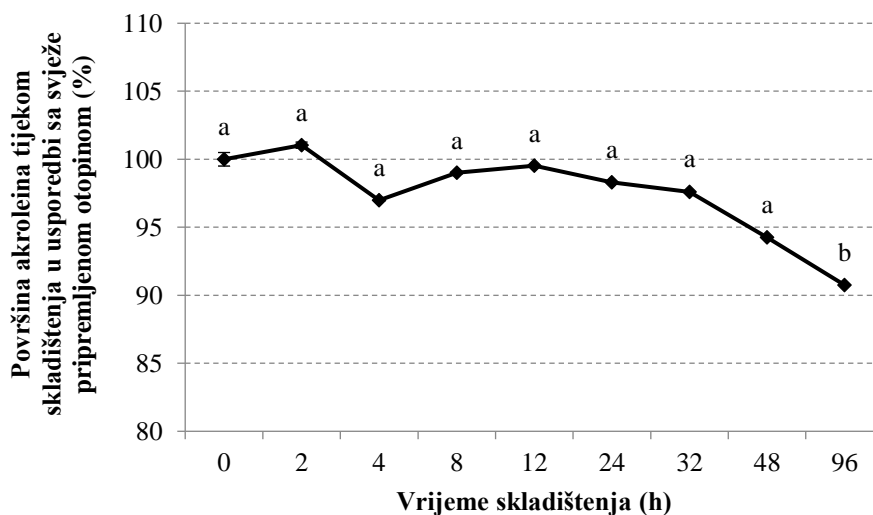
**Slika 21.** Područje linearnosti HS-SPME/GC-MS metode za određivanje akroleina u različitim fazama pripreme kruha ovisno o primijenjenoj matrici – bez matrice (a), kiselo tijesto (b), krušno tijesto (c), kruh (d). Donja isprekidana, puna i gornja isprekidana linija označavaju 95 %, 100 % i 105 % od srednje vrijednosti faktora odgovora (površina akroleina/površina unutarnjeg standard (IS)/koncentracija akroleina (C))

Sve dobivene vrijednosti bile su unutar raspona od 95 % do 105 % srednje vrijednosti faktora odziva što se smatra prihvatljivim pri određivanju linearnosti metode (Green, 1996). Prema dobivenim rezultatima se može zaključiti da je metoda pri svim kalibracijskim uvjetima linearna unutar definiranog područja.

U okviru određivanja preciznosti, analizirana je ponovljivost i međupreciznost metode. Kriteriji za ponovljivost metode ovise o koncentraciji analita. Za analizirane koncentracije akroleina u ovom istraživanju ( $0,012 \mu\text{g g}^{-1}$  uzorka i  $0,600 \mu\text{g g}^{-1}$  uzorka), prihvatljivi RSD bio je do 30 % (AOAC Peer Verified Methods Advisory Committee, 1998). S obzirom na određene RSD vrijednosti 4,0 % za ponovljivost i 6,4 % za međupreciznost (tablica 21), može se zaključiti da je metoda precizna unutar ispitivanog područja.

Stabilnost otopine je važan faktor pri određivanju robusnosti metode. Prema ICH (2005), robusnost metode je sposobnost davanja dosljednih rezultata unatoč malim namjernim varijacijama uobičajenim za normalnu upotrebu metode. Budući da akrolein lako može

reagirati s vodom i tvoriti hidrate ili može doći do njegove polimerizacije, ispitivanje stabilnosti otopine akroleina predstavlja ključan validacijski parametar pri razvoju metode za njegovo određivanje. Prema Kächele i sur. (2014), dodatak 0,2 % hidrokina stabilizira temeljnu standardnu otopinu akroleina, bez potrebe za njegovim dodavanjem tijekom pripreme razrijeđenja. Izračunata RSD vrijednost za međupreciznost (6,4 %) postavljena je kao kriterij pri analizi stabilnosti. Temeljna standardna otopina akroleina analizirana je tijekom 96 sati skladištenja, a rezultati su prikazani na slici 22.



**Slika 22.** Stabilnost otopine akroleina tijekom 96 sati skladištenja u mraku pri +4 °C. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ( $p < 0,05$ )

Nakon 48 i 96 sati je odziv akroleina bio 5,8 % odnosno 9,2 % manji u odnosu na svježe pripremljenu otopinu (0 sati), prema čemu odziv akroleina nakon 96 sati skladištenja nije zadovoljio postavljeni kriterij prihvatljivosti. Nadalje, na temelju rezultata Tukey HSD testa je također utvrđena statistički značajna razlika odziva akroleina jedino u slučaju analize nakon 96 sati skladištenja ( $p = 0,044$ ). Prema tome, može se zaključiti da je otopina akroleina stabilna tijekom 48 sati pri definiranim uvjetima skladištenja.

S obzirom na sve navedeno može se zaključiti da je razvijena i validirana jednostavna, brza i osjetljiva HS-SPME/GC-MS metoda za određivanje akroleina u kiselom tijestu, krušnom tijestu i kruhu.

#### 4.2.4.2. Akrolein u fazama pripreme kruha

Razvijena i validirana metoda primijenjena je za analizu akroleina u bezglutenskom kiselom tijestu pripremljenom s *L. reuteri* DSM 20016 ili *L. brevis* DSM 20054 kao kontrolnom

starter kulturom te krušnom tijestu i kruhu bez i s dodatkom navedenih kiselih tijesta. Prisutnost akroleina nije detektirana u kiselom tijestu pripremljenom s *L. brevis* niti u krušnom tijestu s njegovim dodatkom. Unatoč mogućem nastanku Maillardovom reakcijom pri visokim temperaturama toplinske obrade (Abraham i sur., 2011), akrolein nije detektiran ni u kruhu bez dodatka kiselog tijesta ni s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* (rezultati nisu prikazani). U tablici 22 prikazani su rezultati određivanja koncentracije akroleina u uzorcima pripremljenim s *L. reuteri*.

**Tablica 22.** Koncentracija akroleina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  uzorka) u fazama pripreme kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* DSM 20016

	<b>Akrolein (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math> uzorka)</b>
<b>Kiselo tijesto</b>	14,7 $\pm$ 1,1
<b>Krušno tijesto prije fermentacije</b>	462,8 $\pm$ 110,7
<b>Krušno tijesto nakon fermentacije</b>	7181,5 $\pm$ 246,6
<b>Kruh</b>	160,9 $\pm$ 20,5

Akrolein je detektiran u svim uzorcima pripremljenim s *L. reuteri*, a njegova se koncentracija značajno razlikovala ovisno o fazi pripreme kruha. U krušnom tijestu je utvrđena veća koncentracija akroleina u odnosu na kiselo tijesto te je utvrđeno i njeno povećanje tijekom fermentacije krušnog tijesta. To bi se moglo objasniti s nekoliko razlika između kiselog i krušnog tijesta. Nastanak 3-HPA ovisi o pH – najintenzivniji je pri pH 6, značajno se smanjuje pri pH od 3 do 4, dok je akrolein najstabilniji pri pH od 5 do 6 (Bauer i sur., 2010a, 2010b). Tijekom fermentacije s *L. reuteri* je utvrđeno smanjenje pH kiselog tijesta s 6,24 do 3,86, a pH krušnog tijesta s njegovim dodatkom iznosio je 6,55. Smanjivanje pH tijekom fermentacije kiselog tijesta moglo je utjecati na smanjenje nastanka 3-HPA pa time i akroleina. Nadalje, glicerol je jedan od glavnih produkata alkoholne fermentacije kvasaca te je utvrđeno da se s povećanjem njegove koncentracije povećava i nastanak 3-HPA (Bauer i sur., 2010a, 2010b). Veći pH i koncentracija glicerola mogli su potaknuti produkciju 3-HPA i time povećati nastanak akroleina. U kruhu je utvrđena značajno manja koncentracija akroleina u odnosu na krušno tijesto nakon fermentacije, što je moguća posljedica njegove hlapljivosti i reaktivnosti pri visokim temperaturama pečenja (Vollenweider i sur., 2010). Prema Yasuhara i sur. (2003), akrolein bi mogao biti prekursor nastanka akrilamida tijekom obrade hrane. Njegova reakcija s amonijakom pri visokoj temperaturi bi mogla dovesti do nastanka akrilamida, a time i smanjenja koncentracije akroleina. Potrebno je provesti dodatna

istraživanja kako bi se utvrdio uzrok utvrđene promjene koncentracije akroleina tijekom procesa proizvodnje kruha.

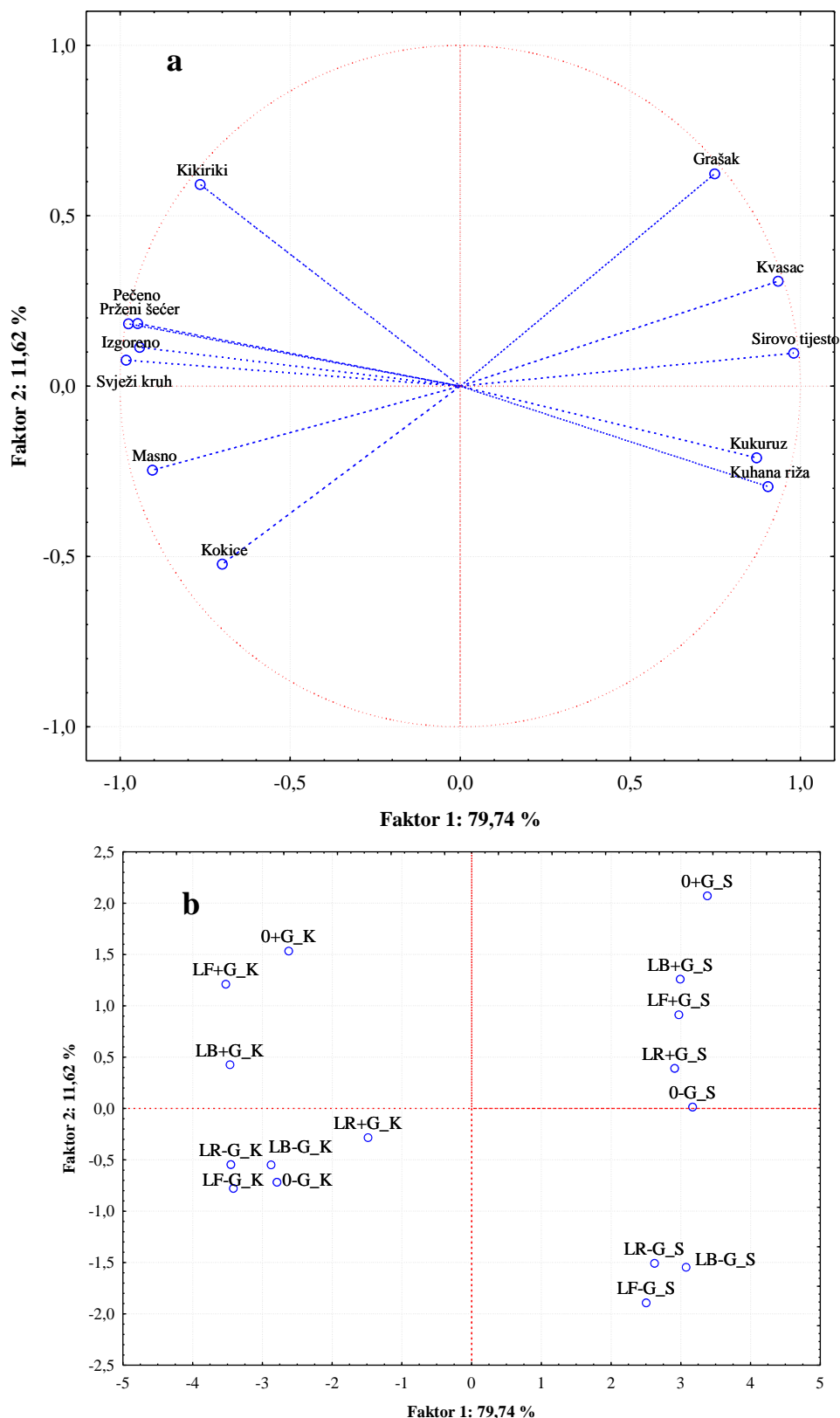
Količina kruha konzumiranog u jednom danu se razlikuje diljem svijeta. S obzirom na rezultate provedenog istraživanja, kako bi premašila vrijednost privremenog prihvatljivog unosa od  $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase, osoba bi trebala konzumirati 3,3 kg kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* dnevno. Prema tome, nije realno da će samo konzumacija navedenog kruha dovesti do prekoračenja prihvatljivog unosa, no njegova bi konzumacija doprinijela ukupnoj izloženosti akroleinu. Osim toga, promjena uvjeta proizvodnje kruha bi mogla potencijalno dovesti i do povećanja njegove koncentracije u kruhu. Unatoč brojnim prednostima primjene reuterina u proizvodnji hrane, s obzirom na potencijalnu mogućnost prisutnosti i toksičnost akroleina, sigurnost primjene starter kultura poput *L. reuteri DSM 20016* koje sintetiziraju reuterin za pripremu kiselog tijesta je upitna te ju treba pažljivo razmotriti.

#### 4.2.5. Senzorska analiza

Senzorska analiza je znanstvena disciplina koja potiče, mjeri, analizira i interpretira one reakcije na hranu i druge proizvode koji se zapažaju putem osjetila vida, njuha, dodira, okusa i sluha (Sensory Evaluation Division, 1975). Budući da su utvrđene značajne razlike u profilu hlapljivih spojeva arome između uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline, cilj senzorske analize istih bio je utvrditi u kojoj su mjeri utvrđene razlike utjecale na percepciju mirisa i arome navedenih uzoraka kruha. Provedene su deskriptivna i hedonistička analiza s ciljem utvrđivanja razlike u intenzitetu pojedinih atributa mirisa i arome te njihove povezanosti s prihvatljivošću navedenih senzorskih svojstava.

Rezultati PCA analize intenziteta atributa mirisa sredine i kore uzoraka bezglutenskog kruha prikazani su na slici 23.





**Slika 23.** Faktorsko opterećenje (engl. *loadings*) (a) i bodovi (engl. *scores*) (b) dobiveni PCA analizom intenziteta atributa mirisa sredine (S) i kore (K) uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška i BMK za pripremu kiselog tijesta (KT). Oznake: 0 – bez KT; LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Prikazani faktori 1 i 2 opisuju ukupno 91,35 % varijance. Sredinu bezglutenskog kruha je više karakterizirao miris po grašku, kvascu, kuhanoj riži, kukuruzu i sirovom tijestu, a koru miris po masnom, kikirikiju, prženom šećeru, svježem kruhu, kokicama, pečenom i izgorenom.

U tablicama 23, 24 i 25 (str. 139, 140 i 144) prikazani su rezultati faktorske analize varijance utjecaja uzorka i panelista na intenzitet atributa mirisa sredine i kore te atributa arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta. Analizom varijance je za pojedine attribute mirisa i arome utvrđen značajan utjecaj interakcije uzorka i panelista. Fahmi i sur. (2019) su također utvrdili značajnu interakciju između uzorka i panelista pri analizi arome kruha. Mogući uzroci navedene interakcije su različita percepcija pojedinih senzorskih svojstava između panelista te različito korištenje ljestvice intenziteta pri senzorskoj analizi (Romano i sur., 2008). Navedene utjecaje nije moguće u potpunosti izbjeći (Romano i sur., 2008), no dodatni trening panelista bi potencijalno doprinio ujednačenijem korištenju ljestvice intenziteta pa time i homogenosti panela (ISO 11132: 2012).

Provedena je i faktorska analiza varijance s dodatkom brašna žutog graška i kiselog tijesta kao fiksnim nezavisnim varijablama te panelistima kao slučajnom (engl. *random*) nezavisnom varijablom. Pšenični bijeli kruh nije bio uključen u navedenu analizu. Utvrđeni značajni utjecaji dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta navedeni u nastavku ovog poglavlja rezultat su spomenute analize. Na slikama 24 i 25 prikazani su rezultati deskriptivne analize mirisa sredine i kore kruha ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta.

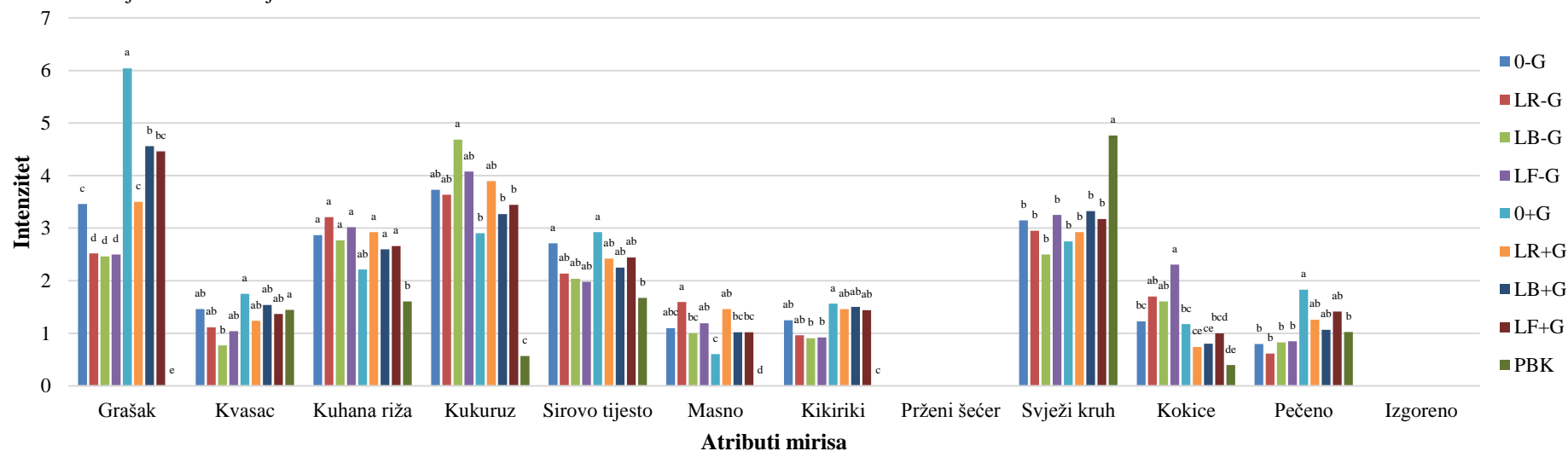
**Tablica 23.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize mirisa sredine uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (devet uzoraka, 15 panelista, dva ponavljanja)

	Grašak		Kvasac		Kuhana riža		Kukuruz		Sirovo tijesto		Masno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	49,82	< 0,001	2,05	0,047	5,93	< 0,001	34,91	< 0,001	2,87	0,006	11,18	< 0,001
Panelist	4,88	< 0,001	10,08	< 0,001	6,65	< 0,001	9,67	< 0,001	10,55	< 0,001	12,31	< 0,001
Uzorak*panelist	2,09	< 0,001	1,31	0,046	1,16	0,179	1,34	0,034	1,27	0,069	2,99	< 0,001

	Kikiriki		Prženi šećer*		Svježi kruh		Kokice		Pečeno		Izgoreno*		Ocjena svidanja	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	10,39	< 0,001			12,45	< 0,001	8,74	< 0,001	2,58	0,013			8,89	< 0,001
Panelist	12,76	< 0,001			22,06	< 0,001	5,50	< 0,001	10,42	< 0,001			9,99	< 0,001
Panelist*uzorak	2,91	< 0,001			1,15	0,192	1,92	< 0,001	1,29	0,053			1,28	0,064

\* zavisna varijabla nema varijancu



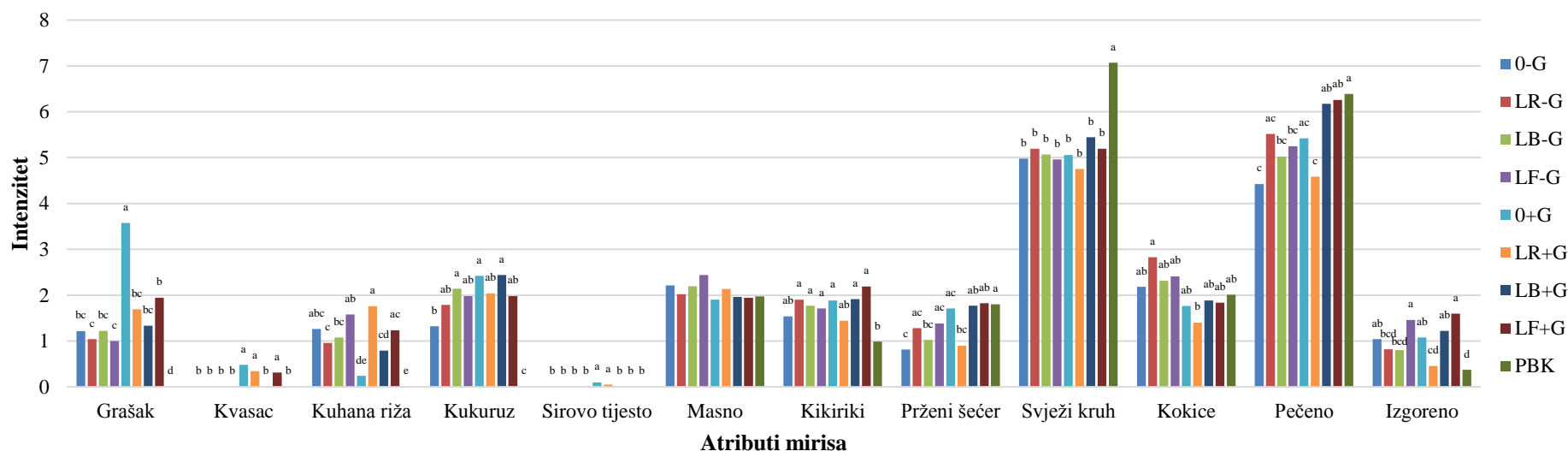
**Slika 24.** Srednja vrijednost intenziteta atributa mirisa sredine uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (15 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška; PBK – pšenični bijeli kruh

**Tablica 24.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize mirisa kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (devet uzoraka, 15 panelista, dva ponavljanja)

	Grašak		Kvasac		Kuhana riža		Kukuruz		Sirovo tijesto		Masno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	17,14	< 0,001	8,23	< 0,001	12,71	< 0,001	19,78	< 0,001	3,50	0,001	0,55	0,816
Panelist	3,71	< 0,001	1,82	0,043	4,81	< 0,001	9,26	< 0,001	1,11	0,352	10,66	< 0,001
Uzorak*panelist	2,74	< 0,001	2,96	< 0,001	2,42	< 0,001	2,56	< 0,001	1,61	0,001	0,93	0,671

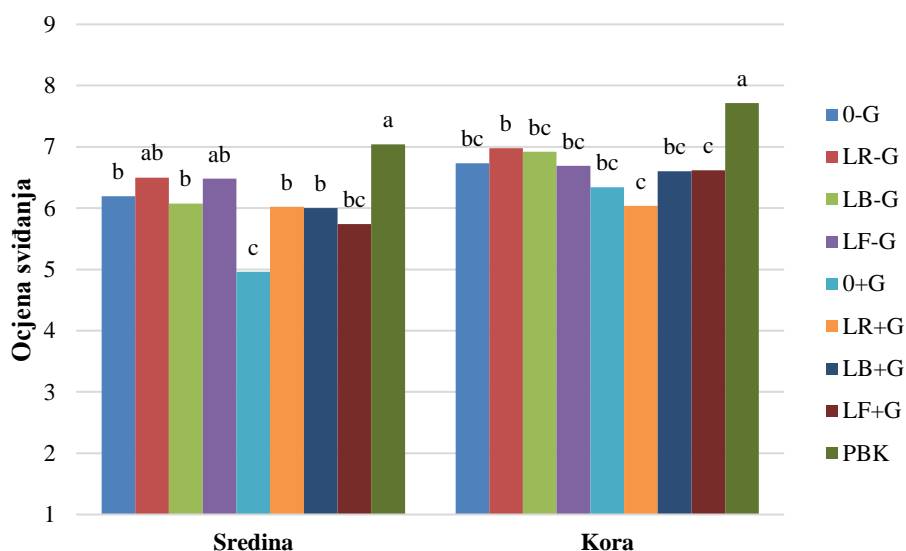
	Kikiriki		Prženi šećer		Svježi kruh		Kokice		Pečeno		Izgoreno		Ocjena svidanja	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	3,45	0,001	3,84	0,001	10,61	< 0,001	2,89	0,006	11,64	< 0,001	7,13	< 0,001	8,15	< 0,001
Panelist	8,73	< 0,001	15,71	< 0,001	29,13	< 0,001	5,16	< 0,001	22,10	< 0,001	12,49	< 0,001	11,71	< 0,001
Uzorak*panelist	1,77	< 0,001	1,21	0,115	1,02	0,449	0,69	0,985	0,78	0,930	1,96	< 0,001	1,43	0,012



**Slika 25.** Srednja vrijednost intenziteta atributa mirisa kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (15 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška; PBK – pšenični bijeli kruh

Dodatak brašna žutog graška utjecao je na povećanje intenziteta mirisa sredine i kore kruha po grašku ( $p < 0,001$  i  $p = 0,009$ ) te smanjenje intenziteta mirisa sredine i kore kruha po kokicama ( $p = 0,020$  i  $p = 0,039$ ). Dodatak brašna žutog graška utjecao je i na povećanje intenziteta mirisa sredine kruha po kikirikiju ( $p = 0,018$ ) te povećanje intenziteta mirisa kore kruha po kvascu ( $p = 0,001$ ), sirovom tijestu ( $p = 0,020$ ) i pečenom ( $p = 0,014$ ). Dodatak kiselog tijesta utjecao je na smanjenje intenziteta mirisa sredine i kore kruha po grašku ( $p < 0,001$  i  $p < 0,001$ ) te smanjenje intenziteta mirisa sredine kruha po kvascu ( $p = 0,033$ ) i sirovom tijestu ( $p = 0,026$ ). Dodatak kiselog tijesta utjecao je i na intenzitet mirisa po masnom ( $p = 0,001$ ), različito ovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje. Značajan utjecaj interakcije dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta utvrđen je na: miris sredine i kore po grašku, pri čemu je dodatak kiselog tijesta izraženije smanjio njegov intenzitet kod uzoraka kruha s brašnom žutog graška ( $p = 0,027$  i  $p < 0,001$ ); miris sredine po kokicama, pri čemu je došlo do povećanja njegovog intenziteta kod uzoraka kruha bez brašna žutog graška ovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta ( $p = 0,045$ ); miris kore po kvascu, pri čemu je došlo do smanjenja njegovog intenziteta kod uzoraka kruha s brašnom žutog graška ovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta ( $p = 0,011$ ). Značajan utjecaj navedene interakcije utvrđen je i na miris sredine po kukuruzu ( $p < 0,001$ ) i svježem kruhu ( $p < 0,001$ ), miris kore po kuhanoj riži ( $p = 0,002$ ), prženom šećeru ( $p = 0,002$ ) i pečenom ( $p < 0,001$ ), a intenzitet navedenih atributa mirisa razlikovao se ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta. Na miris sredine po kuhanoj riži, prženom šećeru, pečenom i izgorenom te na miris kore po kukuruzu, masnom, kikirikiju i svježem kruhu nije utvrđen značajan utjecaj dodatka brašna žutog graška ni dodatka kiselog tijesta.

Na slici 26 prikazani su rezultati hedonističke analize mirisa sredine i kore uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta.



**Slika 26.** Prihvatljivost mirisa sredine i kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (15 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška; PBK – pšenični bijeli kruh

Prema dobivenim rezultatima, ocjena sviđanja mirisa sredine kruha bila je u negativnoj korelaciji s mirisom po grašku ( $r = -0,938$ ,  $p < 0,001$ ), sirovom tijestu ( $r = -0,847$ ,  $p = 0,004$ ), kikirikiju ( $r = -0,821$ ,  $p = 0,007$ ) i pečenom ( $r = -0,775$ ,  $p = 0,014$ ). Ocjena sviđanja mirisa kore kruha bila je u negativnoj korelaciji s mirisom po kukuruzu ( $r = -0,799$ ,  $p = 0,010$ ) i grašku ( $r = -0,724$ ,  $p = 0,027$ ), a u pozitivnoj korelaciji s mirisom po svježem kruhu ( $r = 0,839$ ,  $p = 0,005$ ). Dodatak brašna žutog graška negativno je utjecao na prihvatljivost mirisa sredine i kore kruha ( $p = 0,004$  i  $p = 0,0428$ ). No kod kruha s dodatkom brašna žutog graška i kiselog tijesta utvrđen je značajan pozitivan utjecaj kiselog tijesta na povećanje prihvatljivosti sredine kruha ( $p = 0,027$ ). Prihvatljivost mirisa sredine kruha s dodatkom brašna žutog graška i kiselog tijesta nije se značajno razlikovala od prihvatljivosti mirisa sredine kruha bez brašna žutog graška, neovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta. Uspoređujući prihvatljivost mirisa sredine i kore uzoraka kruha s dodatkom brašna žutog graška, najbolje je ocijenjen kruh s dodatkom kiselog tijesta s *L. brevis* (LB+G), uz srednju vrijednost ocjene sviđanja mirisa sredine „neznatno mi se sviđa“, a mirisa kore „umjereno mi se sviđa“.

U odnosu na uzorke bezglutenskog kruha, pšenični bijeli kruh karakterizirao je izostanak, odnosno najmanji intenzitet nekoliko atributa mirisa koji su bili u negativnoj korelaciji s

ocjenom sviđanja mirisa kruha – izostanak mirisa sredine i kore kruha po grašku, sredine kruha po kikirikiju, kore kruha po kukuruzu te najmanji intenzitet mirisa sredine po sirovom tijestu. Karakterizirao ga je i najveći intenzitet mirisa sredine i kore kruha po svježem kruhu (slike 24 i 25), a koji je bio u pozitivnoj korelaciji s ocjenom sviđanja. Rezultati deskriptivne analize mirisa pšeničnog bijelog kruha bili su u skladu s rezultatima određivanja njegove prihvatljivosti budući da je ocijenjen najvišim ocjenama sviđanja – „umjereno mi se sviđa“ za miris sredine i „veoma mi se sviđa“ za miris kore kruha (slika 26). Nasuprot rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, prema rezultatima Boeswetter i sur. (2019) je, u odnosu na pšenični kruh, rižin kruh imao manji intenzitet mirisa sredine po pečenom i kokicama, a veći po riži te manji intenzitet mirisa kore po karameli, pečenom, kokicama i sladu, a veći po riži i masnom.

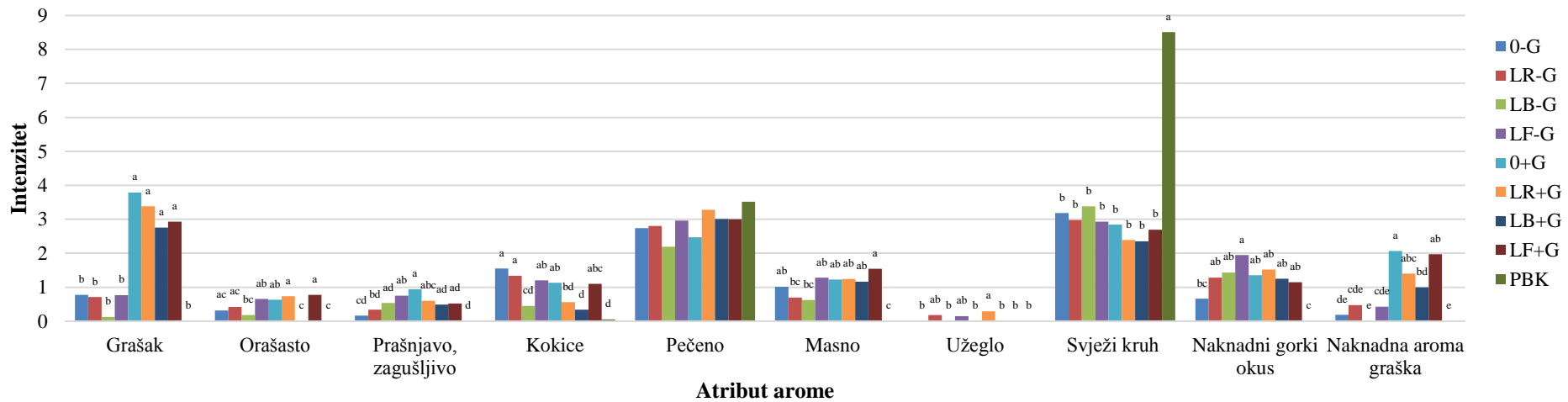
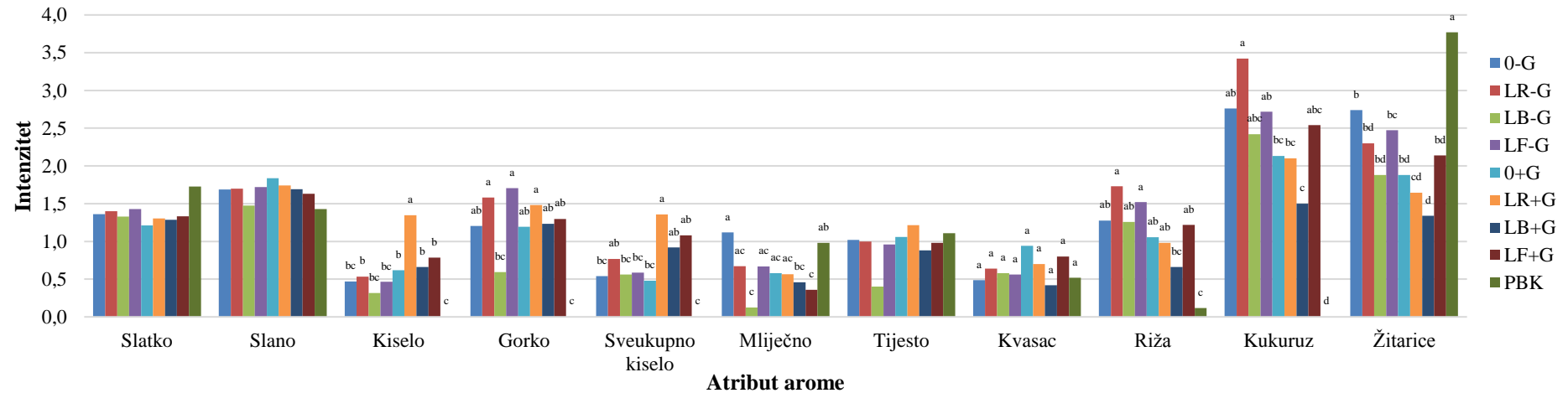
Na slici 27 (str. 145) prikazani su rezultati deskriptivne analize arome kruha ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta.

**Tablica 25.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (devet uzoraka, 13 panelista, dva ponavljanja)

	Slatko		Slano		Kiselo		Gorko		Sveukupno kiselo		Mliječno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	1,19	0,315	1,47	0,180	12,12	< 0,001	6,90	< 0,001	8,19	< 0,001	3,96	< 0,001
<b>Panelist</b>	9,14	< 0,001	15,81	< 0,001	9,53	< 0,001	8,16	< 0,001	7,32	< 0,001	9,62	< 0,001
<b>Uzorak*panelist</b>	1,19	0,190	0,86	0,771	0,95	0,599	1,04	0,417	0,78	0,897	1,24	0,133
	Tijesto		Kvasac		Riža		Kukuruz		Žitarice		Grašak	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	1,57	0,144	2,26	0,029	4,45	< 0,001	12,09	< 0,001	7,08	< 0,001	17,36	< 0,001
<b>Panelist</b>	10,40	< 0,001	23,12	< 0,001	12,54	< 0,001	6,19	< 0,001	19,08	< 0,001	1,70	0,079
<b>Uzorak*panelist</b>	0,96	0,570	0,67	0,977	1,71	0,003	1,20	0,173	1,53	0,015	1,91	< 0,001
	Orašasto		Prašnjavo, zagušljivo		Kokice		Pečeno		Masno		Užeglo	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	4,27	< 0,001	4,99	< 0,001	5,33	< 0,001	1,69	0,112	6,99	< 0,001	5,28	< 0,001
<b>Panelist</b>	6,47	< 0,001	6,46	< 0,001	9,85	< 0,001	10,99	< 0,001	13,88	< 0,001	2,05	0,028
<b>Uzorak*panelist</b>	1,63	0,006	1,13	0,261	2,30	< 0,001	1,42	0,035	1,23	0,138	1,35	0,062
	Svježi kruh		Naknadni gorki okus		Naknadna aroma graška		Ocjena svidanja					
	F	p	F	p	F	p	F	p				
<b>Uzorak</b>	33,93	< 0,001	8,21	< 0,001	19,95	< 0,001	4,99	< 0,001				
<b>Panelist</b>	14,84	< 0,001	10,39	< 0,001	3,45	< 0,001	5,91	< 0,001				
<b>Uzorak*panelist</b>	1,12	0,272	0,58	0,997	0,69	0,969	2,19	< 0,001				

\*Zavisna varijabla nema varijancu

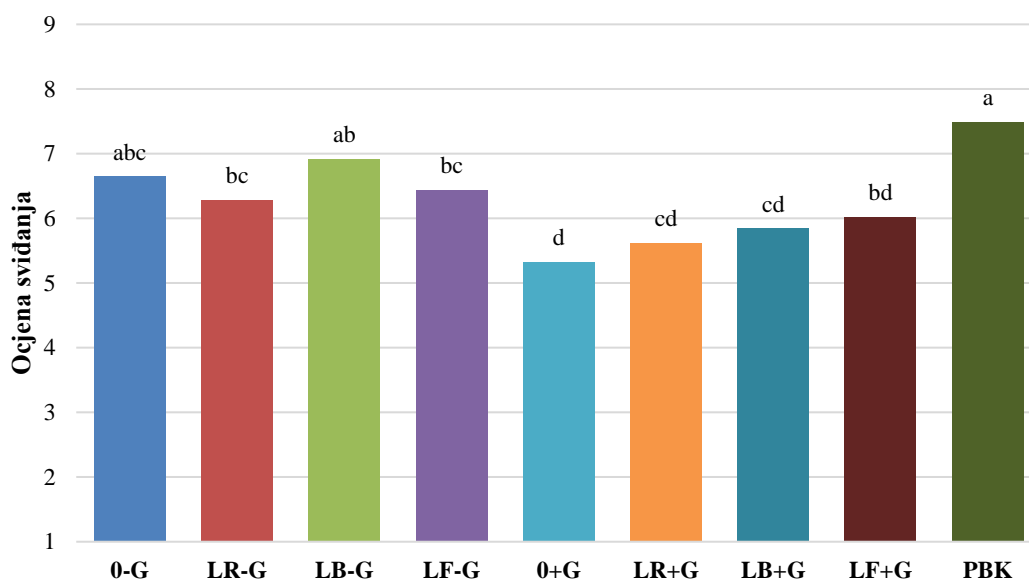




**Slika 27.** Srednja vrijednost intenziteta atributa arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (13 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška; PBK – pšenični bijeli kruh

Dodatak brašna žutog graška utjecao je na povećanje intenziteta kiselog okusa kruha ( $p = 0,001$ ), sveukupno kisele arome ( $p = 0,001$ ), arome graška ( $p < 0,001$ ), naknadne arome graška ( $p < 0,001$ ) i arome masnog ( $p = 0,014$ ) te smanjenje intenziteta arome riže ( $p = 0,010$ ), kukuruza ( $p = 0,038$ ) i žitarica ( $p = 0,047$ ). Iako prema literaturi dodatak brašna graška može doprinijeti povećanju gorčine radi prisutnosti saponina (Heng i sur., 2006), u ovom istraživanju takav utjecaj nije utvrđen. Dodatak kiselog tijesta utjecao je na intenzitet gorkog okusa ( $p = 0,010$ ), sveukupno kisele arome ( $p = 0,012$ ), arome kukuruza ( $p = 0,027$ ), žitarica ( $p = 0,033$ ), kokica ( $p = 0,005$ ), masnog ( $p = 0,014$ ), mliječne ( $p = 0,006$ ), orašaste ( $p = 0,004$ ) i užegle arome ( $p < 0,001$ ), pri čemu se navedeni utjecaj razlikovao ovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta. Značajan utjecaj interakcije dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta utvrđen je na: prašnjavu, zagušljivu aromu ( $p = 0,002$ ), pri čemu se s dodatkom kiselog tijesta njezin intenzitet smanjio kod uzoraka kruha s brašnom žutog graška, a povećao kod uzoraka kruha bez brašna žutog graška; naknadni gorki okus ( $p = 0,005$ ), pri čemu je povećanje njegovog intenziteta utvrđeno samo kod dodatka kiselog tijesta u kruh s brašnom žutog graška. Značajan utjecaj interakcije dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta utvrđen je i na intenzitet kiselog okusa ( $p = 0,016$ ), mliječne arome ( $p = 0,001$ ), arome kvasca ( $p = 0,030$ ) i naknadne arome graška ( $p = 0,012$ ), a intenzitet navedenih atributa arome razlikovao se ovisno o dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta. Na slatki i slani okus kruha, aromu tijesta, pečenog i svježeg kruha te ocjenu sviđanja nije utvrđen značajan utjecaj dodatka brašna žutog graška ni dodatka kiselog tijesta.

Na slici 28 prikazani su rezultati hedonističke analize arome uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta.



**Slika 28.** Prihvatljivost arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i BMK korištene za pripremu kiselog tijesta (13 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška; PBK – pšenični bijeli kruh

Prema dobivenim rezultatima, ocjena sviđanja arome kruha bila je u pozitivnoj korelaciji sa slatkim okusom ( $r = 0,649$ ,  $p = 0,022$ ) i aromom svježeg kruha ( $r = 0,622$ ,  $p = 0,031$ ), a u negativnoj korelaciji s aromom graška ( $r = -0,894$ ,  $p < 0,001$ ), naknadnom aromom graška ( $r = -0,765$ ,  $p = 0,004$ ), prašnjavom, zagušljivom aromom ( $r = -0,811$ ,  $p = 0,001$ ), aromom masnog ( $r = -0,666$ ,  $p = 0,018$ ), gorkim ( $r = -0,809$ ,  $p = 0,001$ ) i naknadnim gorkim okusom ( $r = -0,892$ ,  $p < 0,001$ ). Prema provedenoj statističkoj analizi, dodatak brašna žutog graška i kiselog tijesta nisu značajno utjecali na prihvatljivost arome kruha (faktorska ANOVA,  $p > 0,05$ ), no kruh s dodatkom brašna žutog graška bez dodatka kiselog tijesta (0+G) je ocijenjen nižom ocjenom sviđanja u odnosu na kruh bez dodatka brašna žutog graška (0-G).

U odnosu na uzorke bezglutenskog kruha, pšenični bijeli kruh karakterizirao je izostanak nekoliko atributa arome koji su bili u negativnoj korelaciji s ocjenom sviđanja – gorkog i naknadnog okusa, arome graška, prašnjave i zagušljive arome. Karakterizirao ga je i izostanak kiselog okusa, sveukupno kisele arome, arome kukuruza; najmanji intenzitet arome riže; najveći intenzitet arome žitarica i arome svježeg kruha (slika 27) koja je bila u pozitivnoj korelaciji s ocjenom sviđanja. Rezultati deskriptivne analize arome pšeničnog bijelog kruha bili su u skladu s rezultatima određivanja njegove prihvatljivosti budući da je ocijenjen najvišom ocjenom sviđanja – „veoma mi se sviđa“ (slika 28).

S obzirom na određenu nižu ocjenu sviđanja mirisa sredine i arome kruha s dodatkom 25 % brašna žutog graška na masu brašna (0+G) u odnosu na kruh bez njegovog dodatka (0-G), može se utvrditi kako dodatak brašna žutog graška negativno djeluje na prihvatljivost navedenih senzorskih svojstava kruha. Rezultati drugih istraživanja su također pokazali kako dodatak brašna graška može negativno utjecati na senzorsku prihvatljivost kruha. Prema istraživanju Jeradechachai (2012), dodatak brašna žutog graška utjecao je na smanjenje prihvatljivosti arome i ukupne prihvatljivosti bezglutenskog kruha. Dabija i sur. (2017) su utvrdili smanjenje prihvatljivosti mirisa i arome pšeničnog kruha s dodatkom od 5 % do 20 % brašna žutog graška. Kamaljit i sur. (2010) su utvrdili smanjenje prihvatljivosti mirisa i okusa te sveukupne prihvatljivosti s dodatkom 10 % brašna graška u pšenični kruh. Također, i Mastromatteo i sur. (2015) su utvrdili smanjenje sveukupne prihvatljivosti s dodatkom 5 % brašna žutog graška u pšenični kruh. Nasuprot tome, prema rezultatima Ficco i sur. (2018), nije utvrđena razlika u prihvatljivosti mirisa pšeničnog kruha ovisno o dodatku od 10 % do 30 % brašna žutog graška. Ziobro i sur. (2013b) koji su dodali proteine graška u bezglutenski kruh su pak utvrdili povećanje prihvatljivosti mirisa i okusa kruha s njihovim dodatkom.

Prema dosadašnjim istraživanjima, poznato je kako dodatak kiselog tijesta može utjecati na poboljšanje senzorske prihvatljivosti kruha. Prema rezultatima Di Cagno i sur. (2008), dodatak kiselog tijesta utjecao je na poboljšanje okusa, a prema rezultatima Rózylo i sur. (2015) na poboljšanje okusa, arome i sveukupne prihvatljivosti bezglutenskog kruha. U ovom istraživanju određen je značajan pozitivan utjecaj dodatka kiselog tijesta jedino na prihvatljivost mirisa sredine kruha s dodatkom brašna žutog graška, a što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja. Fermentacija graška pozitivno utječe na aromu kruha s njegovim dodatkom budući da maskira izraženu aromu graška (Bourré i sur., 2019). Schindler i sur. (2012) su utvrdili kako fermentacija pomoću bakterija mliječne kiseline poboljšava aromu ekstrakata proteina graška smanjujući koncentraciju heksanala te smanjujući ili maskirajući nepoželjnu aromu. S obzirom na značajne razlike u instrumentalno određenom profilu hlapljivih spojeva arome utvrđene u ovom istraživanju, primjena različitih bakterija mliječne kiseline za pripremu kiselog tijesta teoretski se mogla odraziti i na senzorskoj prihvatljivosti mirisa i arome kruha s njegovim dodatkom. Paramithiotis i sur. (2005) su utvrdili razliku u prihvatljivosti okusa i mirisa pšeničnog kruha s dodatkom kiselog tijesta ovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje. U ovom istraživanju takav utjecaj na prihvatljivost mirisa i arome kruha nije utvrđen, no utvrđena je razlika u utjecaju različitih bakterija mliječne kiseline primijenjenih za kiseljenje na intenzitet pojedinih atributa

mirisa i arome. Za pripremu kiselog tijesta i kruha s dodatkom brašna žutog graška u nastavku istraživanja odabran je *L. brevis* radi najviše ocjene sviđanja mirisa te visoke ocjene sviđanja arome kruha.

#### 4.2.6. Korelacija senzorske analize i analize profila hlapljivih spojeva arome

Doprinos pojedinih hlapljivih spojeva mirisu i aromi proizvoda ne ovisi samo o njihovoj koncentraciji, već i o pragu osjetljivosti (Birch i sur., 2014). Prema tome spojevi u većoj koncentraciji i s nižim pragom osjetljivosti značajnije doprinose mirisu odnosno aromi kruha. Prag osjetljivosti se između analiziranih spojeva razlikuje i do nekoliko redova veličine (Czerny i sur., 2008). Kako bi se utvrdila povezanost intenziteta pojedinih atributa mirisa i arome s koncentracijom hlapljivih spojeva određenih HS-SPME/GC-MS metodom, provedena je analiza njihove korelacije. Sve korelacije komentirane u nastavku poglavlja su statistički značajne na razini  $p < 0,05$ . Opisi svojstava mirisa i arome pojedinih hlapljivih spojeva preuzeti su iz drugih izvora (Pico i sur., 2015; TGSC, 2020).

Utvrđena je pozitivna korelacija mirisa (M) i/ili arome (A) graška s koncentracijom sljedećih spojeva: 1-pentanola (M  $r = 0,680$ ), 1-heksanola (M  $r = 0,820$ ; A  $r = 0,701$ ), (*Z*)-3-heksenola (M  $r = 0,674$ ; A  $r = 0,635$ ), 1-heptanola (M  $r = 0,702$ ; A  $r = 0,763$ ), pentanala (A  $r = 0,663$ ), heksanala (A  $r = 0,712$ ) i 2-heptanona (A  $r = 0,770$ ). Za većinu navedenih spojeva (izuzevši 1-pentanol, pentanal i 2-heptanon) svojstven je miris i/ili aroma po zelenom i travi koji je karakterističan za grašak (Roland i sur., 2017). Preostale spojeve karakterizira: 1-pentanol – voćni, balzamični, „fusel“ miris; pentanal – aroma kruha, fermentiranog; 2-heptanon – sapunasti, voćni, slatki miris. Prema literaturi se heksanal povezuje s nepoželjnom aromom kruha (Martínez-Anaya, 1996) te se smatra spojem koji značajno doprinosi aromi graška po sijenu (Murray i sur., 1976). Nadalje, intenzitet mirisa kvasca bio je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom 2-metil-1-propanola (alkoholni, slatki miris;  $r = 0,827$ ) te 1-heksanola (zeleni, cvjetni, slatki miris;  $r = 0,746$ ), a aroma kvasca s koncentracijom 2-etil-1-heksanola (slatka, masna, voćna aroma;  $r = 0,701$ ). Miris sirovog tijesta bio je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom 2-metil-1-propanola ( $r = 0,891$ ) i 3-metil-1-butanola (alkoholni, slatki miris;  $r = 0,714$ ), 1-heksanola ( $r = 0,757$ ), (*Z*)-3-nonen-1-ola (voskasti miris;  $r = 0,747$ ) i etil-benzoata (slatki, voćni, suhi miris;  $r = 0,728$ ), a miris kuhane riže i kukuruza s koncentracijom 2-metil-1-propanola ( $r = 0,847$  i  $r = 0,796$ ) i etil-benzoata ( $r = 0,780$  i  $r = 0,694$ ). 2-Metil-1-propanol i 3-metil-1-butanol se prema literaturi povezuju s poželjnim mirisom i aromom kruha (Pico i sur., 2015). Intenzitet kiselog okusa i u nekim slučajevima sveukupno kisele

arome bio je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom 2-metilbutanske ( $r = 0,761$ ), heksanske ( $r = 0,767$  i  $r = 0,652$ ), heptanske ( $r = 0,723$ ), oktanske ( $r = 0,795$  i  $r = 0,666$ ) i dekanske kiseline ( $r = 0,662$ ) koje karakterizira kiseli miris i aroma. Utvrđena je i pozitivna korelacija koncentracije 2,3-pentadiona, 2-metilpirazina, 2-etilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3,5-dimetilpirazina, 2-etil-5(6)-metilpirazina, 2-acetilpirola, 2-acetilfurana, furfurala, 2-furanmetanola i dimetil-disulfida s intenzitetom mirisa po masnom ( $r$  od 0,677 do 0,795), prženom šećeru ( $r$  od 0,660 do 0,933), pečenom ( $r$  od 0,560 do 0,870) i izgorenom ( $r$  od 0,655 do 0,923). Koncentracija 2,3-pentadiona, furfurala, 2-furanmetanola i dimetil-disulfida bila je i u pozitivnoj korelaciji s mirisom svježeg kruha ( $r$  od 0,752 do 0,782). Koncentracija 2,3-pentadiona bila je također u korelaciji i s intenzitetom mirisa po kikirikiju ( $r = 0,682$ ), koncentracija benzaldehida s mirisom po masnom (oštri, orašasti, karamelasti miris;  $r = 0,674$ ), a 2-heptanona s mirisom po prženom šećeru (sapunasti, voćni, slatki miris;  $r = 0,692$ ). Prema literaturi navedene pirazine, pirole i furane karakterizira miris i/ili aroma po kori kruha, pečenom, tostiranom, smeđem, kokicama, orašastom, izgorenom i karameli, što objašnjava utvrđene korelacije. Prema literaturi se furfural povezuje s poželjnom aromom kruha (Hansen i Hansen, 1996). Također, utvrđena korelacija koncentracije 2,3-pentadiona s navedenim atributima mirisa je u skladu s literaturom budući da ga karakterizira slatki, masni, karamelasti, orašasti miris i/ili aroma i miris i/ili aroma maslaca te se povezuje s poželjnim mirisom kruha (Pico i sur., 2017a). Osim dosad spomenutih spojeva, od analiziranih spojeva se i fenilmetanol (cvjetni, voćni, balzamični miris i/ili aroma), 2-feniletanol (cvjetni, slatki miris i/ili aroma), 2-metilbutanal (sladni, orašasti miris i/ili aroma), 3-metilbutanal (sladni, voćni miris i/ili aroma), oktanal (citrusni, zeleni miris i/ili aroma), nonanal (citrusni, sapunasti miris i/ili aroma), (*E*)-2-nonenal (masni, zeleni miris i/ili aroma, po krastavcu), fenilacetaldehid (slatki, cvjetni miris i/ili aroma, po medu) i 2,3-butandion (slatki, karamelasti miris i/ili aroma, po maslacu) prema literaturi povezuju s poželjnim mirisom i aromom kruha. Nasuprot tome, 1-okten-3-ol (zemljani, zeleni miris i/ili aroma, po gljivama), benzaldehid (oštri, orašasti, karamelasti miris i/ili aroma), (*E,E*)-2,4-dekadienal (masni, prženi miris i/ili aroma) i dekanska kiselina (užegao, masni, kiseli miris i/ili aroma, po siru) povezuju se s nepoželjnim mirisom i aromom kruha (Pico i sur., 2015).

S obzirom na određenu pozitivnu korelaciju intenziteta određenog atributa mirisa ili arome s koncentracijom navedenih hlapljivih spojeva, može se zaključiti kako je manja koncentracija navedenih spojeva utjecala na manji intenzitet određenog atributa mirisa odnosno arome i obrnuto. Osim navedenih spojeva, utjecaj na intenzitet pojedinog atributa mirisa ili arome su

potencijalno mogli imati i drugi prisutni spojevi, a koji su u slabijoj pozitivnoj korelaciji s njegovim intenzitetom. Također, u slučaju smanjenja intenziteta određenog atributa mirisa ili arome, osim smanjenja koncentracije spojeva odgovornih za isti, smanjenju njegovog intenziteta moglo je doprinijeti i povećanje koncentracije određenih spojeva radi mogućeg efekta maskiranja. Na to ukazuje utvrđena značajna negativna korelacija intenziteta arome kukuruza i žitarica s koncentracijom heksanala (aroma kukuruza;  $r = -0,684$ ), (*E*)-2-heksenala (aroma kukuruza;  $r = -0,715$ ), 1-heksanola ( $r = -0,751$  i  $r = -0,688$ ) i (*Z*)-3-heksenola ( $r = -0,685$  i  $r = -0,715$ ). Navedene spojeve karakterizira zelena, voćna aroma te je s povećanjem njihove koncentracije došlo do smanjenja intenziteta arome kukuruza i žitarica, odnosno mogućeg efekta maskiranja (Pointot i sur., 2009).

#### 4.2.7. Slobodni fenolni spojevi i antioksidativni kapacitet

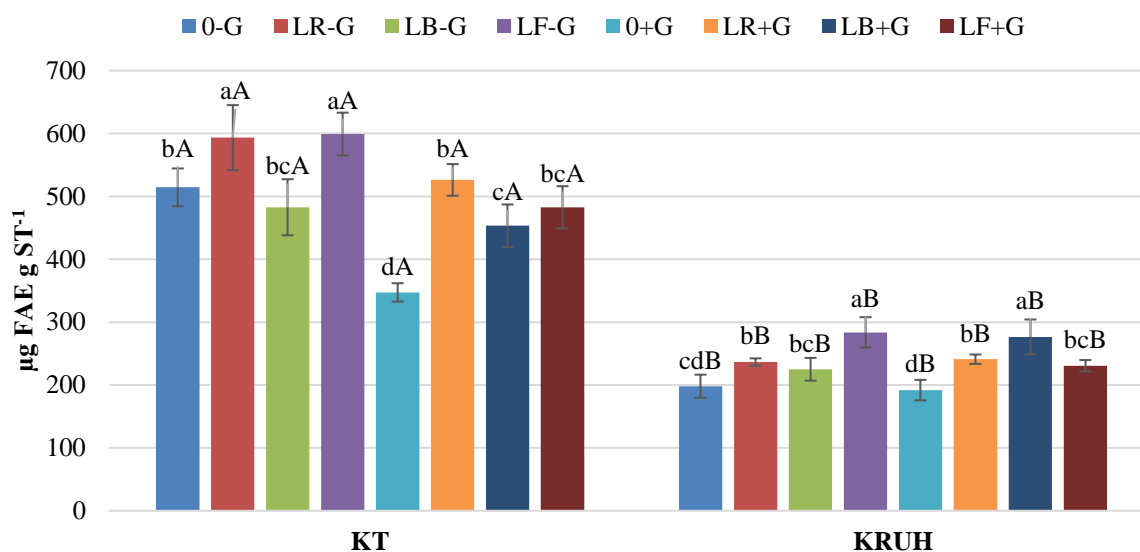
U tablici 26 prikazani su rezultati određivanja slobodnih fenolnih kiselina, a na slikama 29, 30 i 31 rezultati određivanja slobodnih ukupnih fenolnih spojeva te antioksidativnog kapaciteta DPPH i FRAP metodom.

**Tablica 26.** Koncentracija slobodnih fenolnih kiselina ( $\mu\text{g g}^{-1}$  suhe tvari uzorka (ST)) u uzorcima kiselog tijesta i kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta

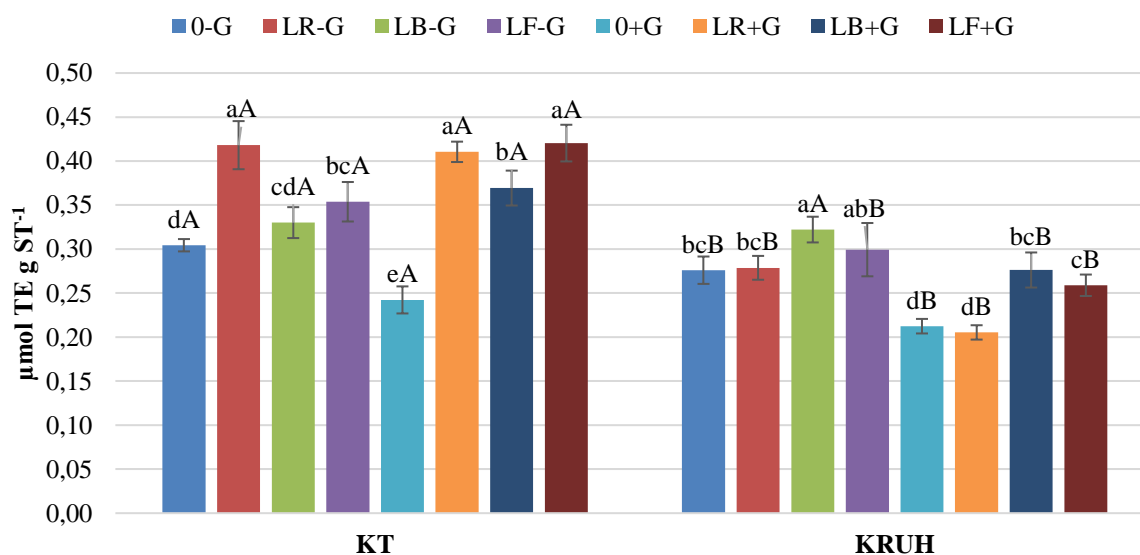
	Protokatehinska kiselina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ST)			4-hidroksibenzojeva kiselina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ST)			Vanilinska kiselina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ST)			Ferulinska kiselina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ST)						
<b>Kiselo tijesto</b>																
<b>0-G</b>	0,15	±	0,01	fB	0,42	±	0,05	dA	0,89	±	0,03	dB	5,30	±	0,36	dB
<b>LR-G</b>	0,74	±	0,06	eA	3,49	±	0,34	bcA	2,93	±	0,29	bA	37,35	±	0,23	aA
<b>LB-G</b>	0,84	±	0,02	eA	3,93	±	0,25	bA	2,48	±	0,16	cA	1,37	±	0,49	eB
<b>LF-G</b>	1,79	±	0,09	dA	3,56	±	0,10	bcA	0,37	±	0,01	eB	1,70	±	0,41	eB
<b>0+G</b>	0,81	±	0,08	eA	3,06	±	0,39	cA	1,22	±	0,13	dA	4,03	±	0,95	dB
<b>LR+G</b>	4,70	±	0,10	cA	15,48	±	0,22	aA	4,24	±	0,07	aA	24,39	±	1,25	bA
<b>LB+G</b>	5,70	±	0,10	bA	15,67	±	0,53	aA	3,21	±	0,24	bA	15,15	±	0,16	cA
<b>LF+G</b>	6,47	±	0,17	aA	15,00	±	0,38	aA	0,94	±	0,21	dB	1,58	±	0,11	eB
<b>Kruh</b>																
<b>0-G</b>	0,32	±	0,02	eA	0,51	±	0,14	eA	1,22	±	0,03	deA	8,24	±	0,52	bA
<b>LR-G</b>	0,20	±	0,03	fB	0,84	±	0,01	dB	1,82	±	0,16	abB	10,69	±	0,49	aB
<b>LB-G</b>	0,33	±	0,02	eB	0,92	±	0,15	dB	1,40	±	0,12	cdB	6,05	±	0,42	cA
<b>LF-G</b>	0,40	±	0,03	dB	0,92	±	0,02	dB	1,34	±	0,05	cdeA	6,06	±	0,32	cA
<b>0+G</b>	0,47	±	0,03	cB	1,54	±	0,20	cB	1,18	±	0,09	eA	5,91	±	0,06	cA
<b>LR+G</b>	0,50	±	0,02	cB	3,42	±	0,07	abB	1,98	±	0,07	aB	6,87	±	0,23	bcB
<b>LB+G</b>	0,70	±	0,02	bB	3,70	±	0,28	aB	1,72	±	0,08	bB	6,65	±	1,75	cB
<b>LF+G</b>	0,88	±	0,03	aB	3,28	±	0,18	bB	1,42	±	0,05	cA	4,20	±	0,13	dA

Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar skupine uzoraka kiselog tijesta/kruha (malim slovima) i između kiselog tijesta i kruha istog uzorka (velikim slovima) (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ )

Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

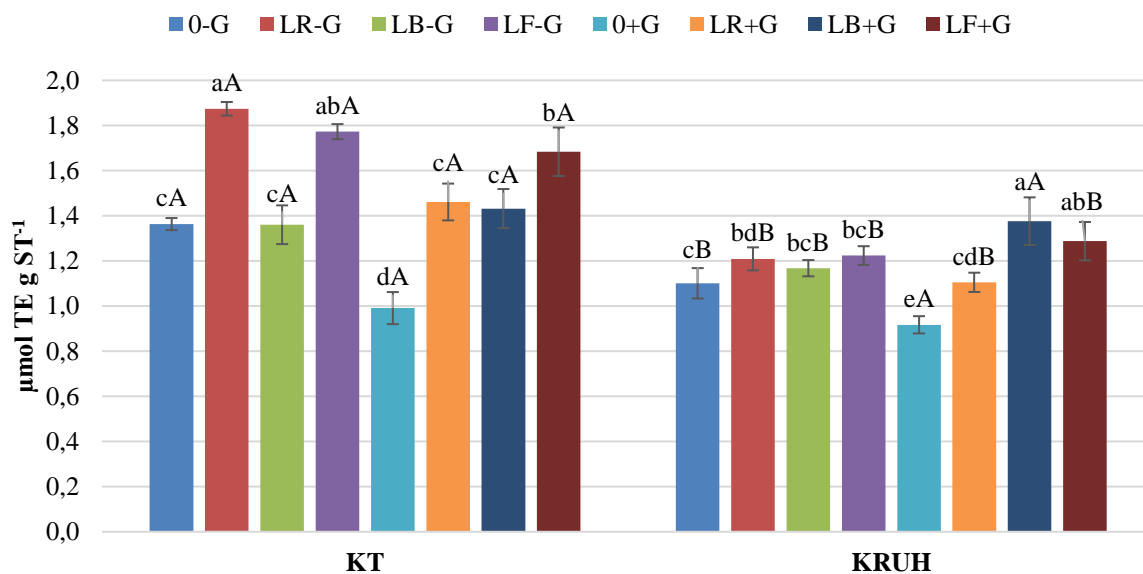


**Slika 29.** Koncentracija slobodnih ukupnih fenolnih spojeva (ekvivalenti ferulinske kiseline (FAE) na suhu tvar uzorka (ST)) u uzorcima kiselog tijesta i kruha različitim s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar skupine uzoraka kiselog tijesta/kruha (malim slovima) i između kiselog tijesta i kruha istog uzorka (velikim slovima) (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška



**Slika 30.** Antioksidativni kapacitet (ekvivalenti Troloksa (TE) na suhu tvar uzorka (ST)) uzoraka kiselog tijesta i kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta određen DPPH metodom. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar skupine uzoraka kiselog tijesta/kruha (malim slovima) i između kiselog tijesta i kruha istog uzorka (velikim slovima) (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta; LR, LB, LF – s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška





**Slika 31.** Antioksidativni kapacitet (ekvivalenti Troloksa (TE) na suhu tvar uzorka (ST)) uzoraka kiselog tijesta i kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška i bakterije mliječne kiseline korištene za pripremu kiselog tijesta određen FRAP metodom. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar skupine uzoraka kiselog tijesta/kruha (malim slovima) i između kiselog tijesta i kruha istog uzorka (velikim slovima) (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake: 0 – bez kiselog tijesta (KT); LR, LB, LF – s KT pripremljenim s *L. reuteri*, *L. brevis* ili *L. fermentum*; -G/+G – bez/s brašnom žutog graška

Dodatak brašna žutog graška utjecao je na značajno povećanje koncentracije slobodne protokatehinske i 4-hidroksibenzojeve kiseline te smanjenje koncentracije slobodnih ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativnog kapaciteta kiselog tijesta. Za razliku od navedenog utjecaja u kiselom tijestu, u kruhu nije utjecao na značajnu promjenu koncentracije slobodnih ukupnih fenolnih spojeva, ali je došlo do smanjenja koncentracije slobodne ferulinske kiseline s njegovim dodatkom (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Proces kiseljenja i dodatak kiselog tijesta u kruh su generalno utjecali na povećanje koncentracije slobodnih fenolnih kiselina i ukupnih fenolnih spojeva te povećanje antioksidativnog kapaciteta (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Curiel i sur. (2015) i Rizzello i sur. (2017) su također utvrdili kako pri kiseljenju tijesta dolazi do povećanja antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH metodom, a razmjer navedenog povećanja ovisio je o primijenjenim bakterijama mliječne kiseline. Pri kiseljenju tijesta dolazi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih spojeva te povećanja njihove topljivosti uslijed zakiseljavanja (Gänzle, 2014; Nionelli i sur., 2014). Određena koncentracija slobodnih fenolnih kiselina i ukupnih fenolnih spojeva te antioksidativni kapacitet su u većini slučajeva bili značajno manji u kruhu u odnosu na kiselo tijesto, a što se može pripisati razrjeđenju pri pripremi krušnog tijesta te gubitku/konverziji pri pečenju (Han i Koh, 2011).

Nefermentirano tijesto s dodatkom brašna žutog graška (0+G KT) sadržavalo je 32 % manje slobodnih ukupnih fenolnih spojeva (slika 29) te je navedeno nefermentirano tijesto i pripadajući kruh 0+G karakterizirao manji antioksidativni kapacitet (DPPH 20 % i 23 %; FRAP 27 % i 17 %) u odnosu na tijesto i kruh bez dodatka brašna graška (0-G) (slike 30 i 31). Unatoč utvrđenom djelovanju brašna žutog graška na smanjenje koncentracije slobodnih ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativnog kapaciteta, navedeni negativni učinak na antioksidativni kapacitet izbjegnut je njegovom primjenom u kombinaciji s kiseljenjem tijesta. Antioksidativni kapacitet (DPPH) kiselog tijesta s dodatkom brašna žutog graška pripremljenog s *L. brevis* i *L. fermentum* je bio čak veći u odnosu na kisela tijesta bez njegovog dodatka (12 % i 19 %), dok kod kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* nije utvrđena značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu ovisno o dodatku brašna žutog graška (slika 30). Rizzello i sur. (2014a) su također utvrdili veće povećanje antioksidativnog kapaciteta (DPPH) s kiseljenjem tijesta s dodatkom mahunarki u odnosu na kiseljenje bez njihovog dodatka. Navedeni pozitivan utjecaj procesa kiseljenja tijesta s dodatkom brašna žutog graška nije se odrazio na antioksidativni kapacitet (DPPH) kruha, što je i očekivano s obzirom na nefermentirano brašno graška dodano u krušni zamjes koje je utjecalo na smanjenje antioksidativnog kapaciteta kruha. Pozitivan utjecaj procesa kiseljenja tijesta s dodatkom brašna žutog graška mogao bi se potencijalno odraziti na antioksidativni kapacitet (DPPH) kruha u slučaju kiseljenja cijele količine brašna žutog graška namijenjene za krušni zamjes. Također je i u slučaju antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP metodom negativni utjecaj dodatka brašna žutog graška izbjegnut njegovom primjenom u kombinaciji s procesom kiseljenja tijesta (slika 31). Unatoč 27 % manjem antioksidativnom kapacitetu tijesta 0+G u odnosu na 0-G, u kiselom tijestu pripremljenom s *L. brevis* i *L. fermentum* nije utvrđena razlika u antioksidativnom kapacitetu ovisno o dodatku brašna žutog graška. Za razliku od rezultata DPPH metode, prema rezultatima FRAP metode vidljivo je kako se antioksidativni kapacitet kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* i *L. fermentum* nije razlikovao ovisno o dodatku brašna žutog graška, dok je u slučaju kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* utvrđen 18 % veći antioksidativni kapacitet u kruhu s dodatkom u odnosu na kruh bez dodatka brašna žutog graška. Pozitivan utjecaj kiseljenja tijesta s dodatkom brašna žutog graška utvrđen je i u slučaju protokatehinske i 4-hidroksibenzojeve kiseline (tablica 26). Značajno veće povećanje koncentracije navedenih kiselina utvrđeno je u kiselom tijestu (~ 3,5 puta) i kruhu s dodatkom kiselog tijesta (~ 5 puta) koje je sadržavalo brašno žutog graška, u odnosu na kiselo tijesto i kruh bez njegovog

dodatka. Rizzello i sur. (2014a) su značajnije povećanje antioksidativnog kapaciteta pri kiseljenju tijesta s dodatkom mahunarki povezali s većim zakiseljavanjem i posljedično većom topljivosti fenolnih spojeva (Katina i sur., 2005). U ovom istraživanju je u kiselom tijestu s dodatkom brašna žutog graška utvrđena veća koncentracija pojedinih slobodnih fenolnih kiselina, no i manja koncentracija slobodnih ukupnih fenolnih spojeva unatoč većem zakiseljavanju. Budući da korištena metoda određivanja ukupnih fenolnih spojeva ne uključuje određivanje svih prisutnih antioksidansa, može doći do razlike između utvrđenih utjecaja na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativni kapacitet. Također, antioksidativna aktivnost, osim o koncentraciji antioksidansa, ovisi i o njihovoj strukturi i međusobnoj interakciji (Piluzza i Bullitta, 2011). Stoga je navedenom pozitivnom utjecaju interakcije brašna žutog graška i procesa kiseljenja tijesta na povećanje antioksidativnog kapaciteta moglo doprinijeti i potencijalno oslobađanje spojeva izraženijeg antioksidativnog kapaciteta, oslobađanje antioksidativnih spojeva koji nisu obuhvaćeni metodom određivanja ukupnih fenolnih spojeva i/ili razlika u interakciji slobodnih antioksidativnih spojeva. Ferulinska kiselina je bila najzastupljenija od svih određivanih fenolnih kiselina, a što je i očekivano budući da je najzastupljenija fenolna kiselina u riži, ali i drugim žitaricama (Irakli i sur., 2015). Koncentracija slobodne vanilinske i ferulinske kiseline nije se značajno razlikovala u nefermentiranom tijestu ovisno o dodatku brašna žutog graška (0-G i 0+G) (tablica 26). U skladu s trendom utvrđenim za ostale određivane fenolne kiseline, pri kiseljenju tijesta došlo je do značajnog povećanja koncentracije slobodne vanilinske kiseline kod primjene *L. reuteri* i *L. brevis* (od 2,6 do 3,5 puta), dok je u slučaju primjene *L. fermentum* došlo do njenog značajnog smanjenja (58 %) u kiselom tijestu bez dodatka brašna žutog graška. Nadalje, utvrđeno je i smanjenje koncentracije slobodne ferulinske kiseline u kiselom tijestu pripremljenom s *L. fermentum* neovisno o dodatku brašna žutog graška (od 68 % do 74 %) te u kiselom tijestu pripremljenom s *L. brevis* bez dodatka brašna žutog graška (61 %), a koje se odrazilo i na pripadajući kruh. Antognoni i sur. (2019) su također odredili povećanje koncentracije slobodne ferulinske kiseline pri kiseljenju pšeničnog brašna samo s određenim bakterijama mliječne kiseline. Osim oslobađanja, pri fermentaciji može doći i do metabolizma fenolnih kiselina do derivata fenola i vinila, a hoće li doći do oslobađanja i/ili konverzije fenolnih kiselina specifično je za pojedini soj bakterije mliječne kiseline (Hole i sur., 2012; Rodríguez i sur., 2009). Stoga je smanjenje koncentracije navedenih fenolnih kiselina moguća posljedica metabolizma bakterija mliječne kiseline.

U tablici 27 prikazani su koeficijenti korelacije između metoda određivanja koncentracije fenolnih spojeva i antioksidativnog kapaciteta.

**Tablica 27.** Koeficijenti korelacije (r) antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodom, koncentracije slobodnih ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i koncentracije određenih slobodnih fenolnih kiselina u kiselom tijestu i kruhu

	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>	<b>TPC</b>	<b>Fenolne kiseline</b>
<b>DPPH</b>	1,000	0,844*	0,785*	0,707*
<b>FRAP</b>	0,844*	1,000	0,830*	0,528*
<b>TPC</b>	0,785*	0,830*	1,000	0,514*
<b>Fenolne kiseline</b>	0,707*	0,528*	0,514*	1,000

\*Statistički značajna korelacija ( $p < 0,05$ )

Ukupna koncentracija određenih fenolnih kiselina bila je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom ukupnih fenolnih spojeva, a koncentracija ukupnih fenolnih spojeva i fenolnih kiselina u pozitivnoj korelaciji s antioksidativnim kapacitetom određenim DPPH i FRAP metodom (tablica 27). Utvrđena je i značajna korelacija između antioksidativnog kapaciteta određenog DPPH i FRAP metodom. Antioksidativni kapacitet analiziranih uzoraka se značajno razlikovao ovisno o metodi primijenjenoj za njegovo određivanje (od 0,21  $\mu\text{mol TE g suhe tvari}^{-1}$  do 0,42  $\mu\text{mol TE g suhe tvari}^{-1}$  u slučaju DPPH; od 0,92  $\mu\text{mol TE g suhe tvari}^{-1}$  do 1,87  $\mu\text{mol TE g suhe tvari}^{-1}$  u slučaju FRAP metode). Navedena razlika moguća je posljedica različitog principa određivanja (Amorati i Valgimigli, 2015).

Sveukupno gledajući, među uzorcima kruha s dodatkom brašna žutog graška, najveća koncentracija slobodnih ukupnih fenolnih spojeva, određenih fenolnih kiselina te najveći antioksidativni kapacitet utvrđeni su u kruhu s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*. Prema tome se među bakterijama primijenjenim u ovom istraživanju *L. brevis* pokazao optimalnim za kiseljenje tijesta s dodatkom brašna žutog graška.

### **4.3. Utjecaj dodatka kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima**

Šećeri i aminokiseline su prekursori hlapljivih spojeva arome. Enzimi proteaze kataliziraju reakcije razgradnje proteina i peptida što dovodi do povećanja koncentracije slobodnih aminokiselina te time doprinose povećanju koncentracije prekursora hlapljivih spojeva arome (Martínez-Anaya, 1996). U ovom dijelu istraživanja ispitan je utjecaj dodatka pojedinih prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima te njihove kombinacije na pH i ukupnu kiselost, udjel kiselina i šećera, profil hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha te senzorska svojstva bezglutenskog kruha. Osim toga, ispitan je i utjecaj njihovog dodatka u kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* koje se pokazalo optimalnim u prvom dijelu istraživanja. Ispitan je utjecaj dodatka prolina (P), kombinacije prolina i fruktoze ili glukoze (PF, PG) te enzima proteaza (E) u krušno tijesto; dodatka arginina (KtA), enzima (KtE) i njihove kombinacije (KtAE) u kiselo tijesto te dodatka istog u krušno tijesto; dodatka kiselog tijesta, prolina i fruktoze (KtPF) u krušno tijesto; dodatka arginina i enzima u kiselo tijesto, a kiselog tijesta, prolina i fruktoze u krušno tijesto (KtAEPF). Provedena je analiza uzoraka kiselog tijesta, krušnog tijesta prije i nakon fermentacije, kruha i kore kruha.

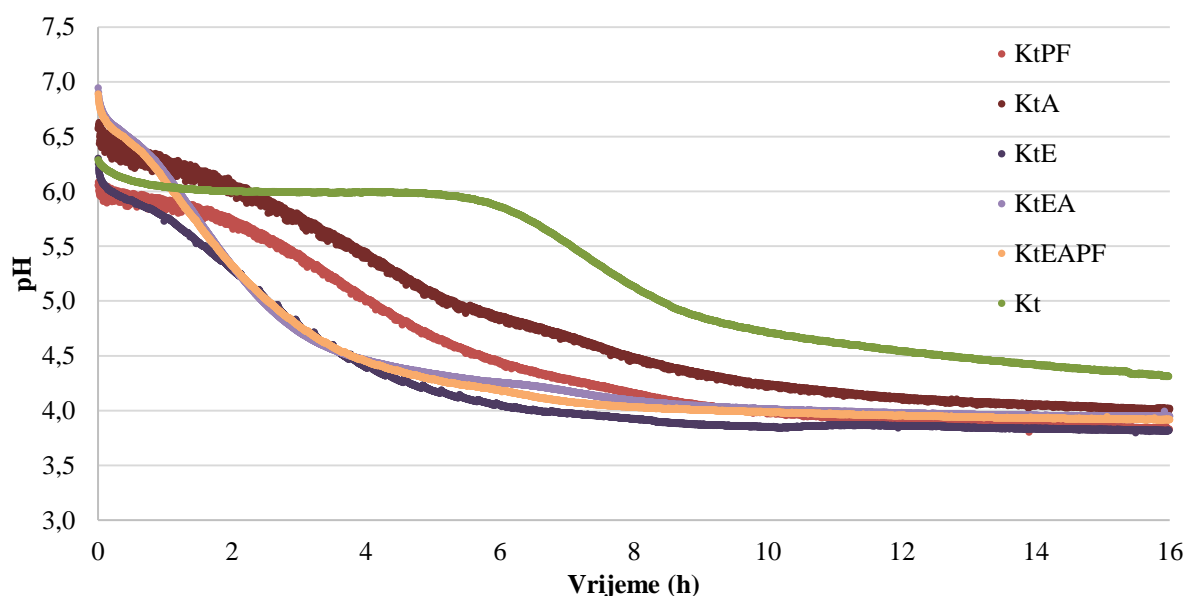
#### **4.3.1. Mikrobiološka analiza, pH, ukupna kiselost, udjel kiselina i šećera**

U tablici 28 prikazani su rezultati određivanja broja poraslih kolonija bakterija mliječne kiseline i kvasaca ovisno o fazi pripreme kruha. Na slici 32 prikazana je kinetika kiseljenja tijesta, a na slici 33 rezultati određivanja pH kiselog tijesta na početku i kraju fermentacije, krušnog tijesta i kruha.

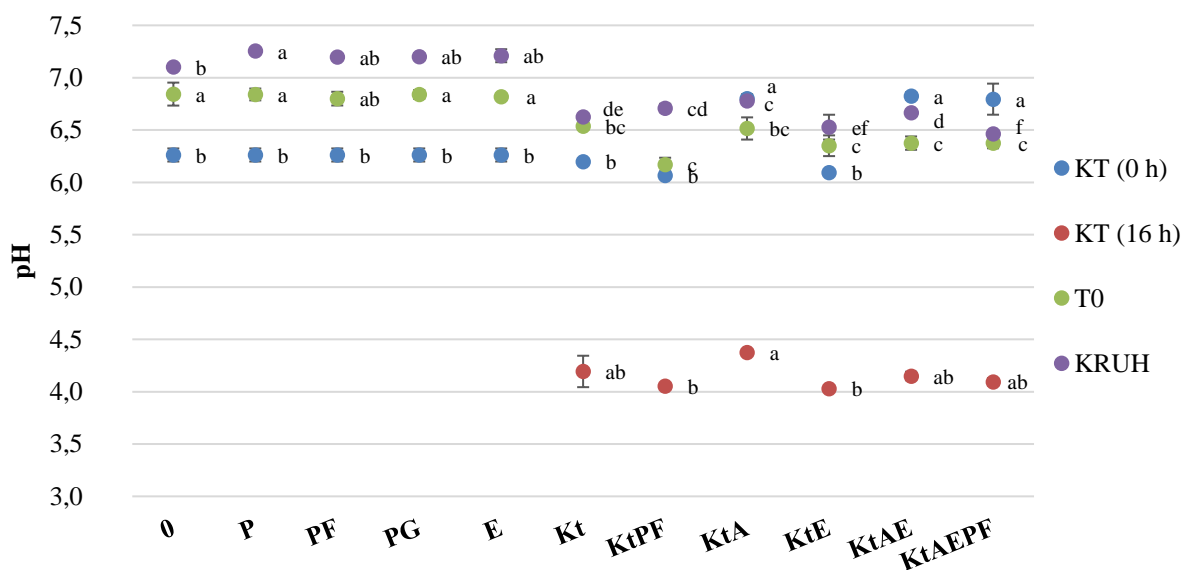
**Tablica 28.** Broj bakterija mliječne kiseline (BMK) i kvasaca (log CFU g<sup>-1</sup>) u uzorcima kiselog tijesta prije (KT 0 h) i nakon (KT 16 h) fermentacije te krušnog tijesta nakon fermentacije (TF) različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	BMK (KT 0 h)	BMK (KT 16 h)	BMK (TF)	Kvasci (TF)
<b>0</b>				7,47 ± 0,07
<b>P</b>				7,97 ± 0,07
<b>PF</b>				8,01 ± 0,01
<b>PG</b>				7,91 ± 0,07
<b>E</b>				8,00 ± 0,12
<b>Kt</b>	5,83 ± 0,14	9,08 ± 0,09	8,41 ± 0,16	7,49 ± 0,13
<b>KtPF</b>	7,09 ± 0,10	8,66 ± 0,19	8,26 ± 0,29	7,97 ± 0,18
<b>KtA</b>	6,61 ± 1,87	8,40 ± 0,11	8,01 ± 0,18	8,08 ± 0,01
<b>KtE</b>	6,13 ± 0,85	8,60 ± 0,43	8,25 ± 0,29	7,80 ± 0,15
<b>KtAE</b>	5,25 ± 0,10	8,79 ± 0,11	8,45 ± 0,03	7,89 ± 0,05
<b>KtAEPF</b>	5,91 ± 0,22	8,78 ± 0,00	8,67 ± 0,02	7,98 ± 0,04

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin



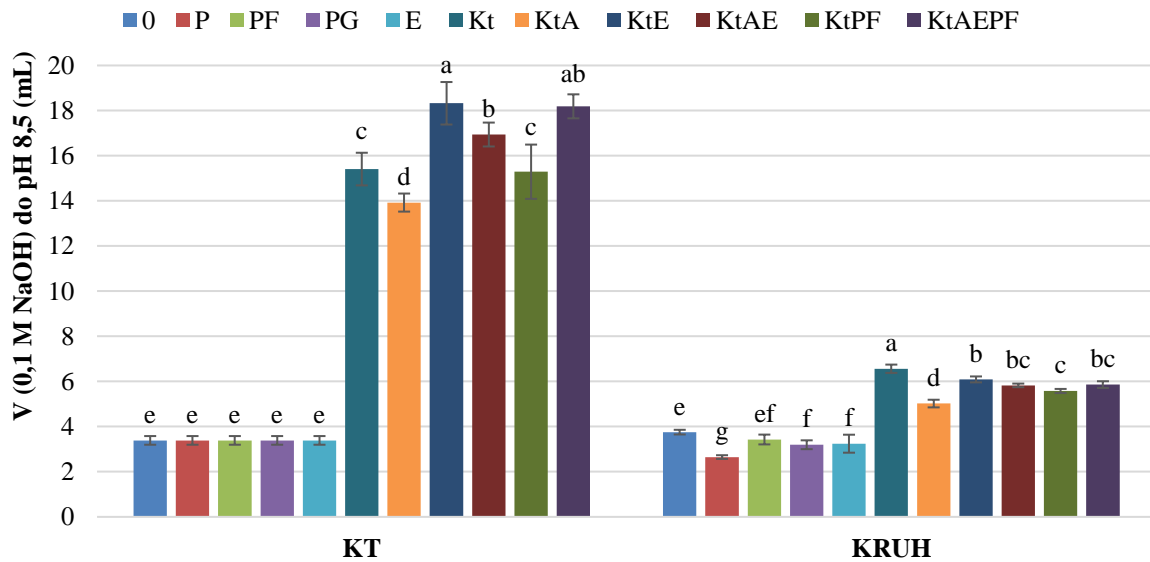
**Slika 32.** Kinetika kiseljenja tijesta s *L. brevis* ovisno o dodatku prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Oznake uzoraka: Kt, KtPF – bez dodataka; KtA – dodatak arginina (A); KtE – dodatak enzima proteaza (E); KtAE, KtAEPF – dodatak arginina i enzima proteaza (prolin (P), glukoza (G) i fruktoza (F) dodani su u krušno tijesto)



**Slika 33.** pH uzoraka kiselog tijesta prije (KT 0 h) i nakon (KT 16 h) fermentacije, krušnog tijesta prije fermentacije (T0) i kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar iste skupine uzoraka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin. pH uzorka 0 KT (0 h) smatran pH vrijednosti uzoraka P, PF, PG i E KT (0 h)

Prolin i fruktoza su dodavani tek u krušno tijesto tako da je kiseljenje uzoraka Kt i KtPF te KtAE i KtAEPF provedeno u istim uvjetima. Tijekom 16 sati fermentacije kiselog tijesta došlo je do porasta broja živih stanica bakterija mliječne kiseline za od 2 do 4 log CFU  $g^{-1}$ , što je u skladu s rezultatima dobivenim pri ispitivanju procesa kiseljenja ovisno o dodatku brašna žutog graška i primijenjenim bakterijama mliječne kiseline. Iz slike 32 je vidljivo kako je do bržeg zakiseljavanja došlo s dodatkom enzima proteaza. Di Cagno i sur. (2003) su također utvrdili kako dodatak proteaza pri kiseljenju tijesta poboljšava sposobnost zakiseljavanja bakterija mliječne kiseline, a što su objasnili mogućim djelovanjem povećanja koncentracije slobodnih aminokiselina uslijed hidrolize proteazama. Početni pH tijesta prije kiseljenja nalazio se u rasponu od 6,07 do 6,83. Značajno veći pH utvrđen je u uzorcima tijesta KtA, KtAE i KtAEPF u odnosu na ostale analizirane uzorke što je posljedica dodatka arginina koji je bazična aminokiselina. pH se nakon 16 sati kiseljenja nalazio u rasponu od 4,03 do 4,38, a najveći pH utvrđen je također u uzorku KtA s dodatkom arginina. U krušnom tijestu i kruhu s dodatkom 20 % kiselog tijesta utvrđen je značajno manji pH u odnosu na uzorke bez njegovog dodatka, što je u skladu s rezultatima ispitivanja utjecaja pripreme kiselog tijesta s različitim bakterijama mliječne kiseline (poglavlje 4.2.1.). pH kruha bez dodatka kiselog

tijesta (0, P, PF, PG i E) nalazio se u rasponu od 7,10 do 7,26, a kruha s dodatkom kiselog tijesta (Kt, KtPF, KtA, KtE, KtAE, KtAEPF) u rasponu od 6,46 do 6,78. Najmanji pH izmjeren je u kruhu KtAEPF. Na slici 34 prikazani su rezultati određivanja ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha.



**Slika 34.** Ukupna kiselost uzoraka kiselog tijesta (KT) i kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti unutar skupine uzoraka kiselog tijesta/kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin. Ukupna kiselost uzorka 0 KT smatrana ukupnom kiselosti uzoraka P, PF, PG i E KT

Ukupna kiselost je rasla s procesom kiseljenja tijesta i dodatkom kiselog tijesta u kruh, što je u skladu s rezultatima ispitivanja utjecaja pripreme kiselog tijesta s različitim bakterijama mliječne kiseline (poglavlje 4.2.1.). Također, sukladno rezultatima prethodno navedenog dijela istraživanja, utvrđena je značajna korelacija pH i ukupne kiselosti kiselog tijesta ( $r = -0,991$ ,  $p < 0,001$ ) te ukupne kiselosti kiselog tijesta i kruha ( $r = 0,955$ ,  $p < 0,001$ ). U odnosu na kiselo tijesto bez dodatka šećera, aminokiselina i enzima (Kt), u kiselom tijestu s dodatkom enzima (KtE), enzima i arginina (KtAE i KtAEPF) došlo je do povećanja ukupne kiselosti od 10 % do 19 %. Do najvećeg povećanja ukupne kiselosti došlo je u uzorku KtE te je moguće da su dodane proteaze za to najviše zaslužne. Di Cagno i sur. (2003) su također utvrdili povećanje ukupne kiselosti kiselog tijesta s dodatkom proteaza. U uzorku kiselog tijesta i pripadajućeg kruha s dodatkom arginina došlo je do smanjenja ukupne kiselosti u odnosu na kiselo tijesto i kruh bez njegovog dodatka. Budući da je bazična aminokiselina,



arginin je utjecao na povećanje pH i posljedično smanjenje ukupne kiselosti. Utjecaj arginina na smanjenje ukupne kiselosti utvrđen je i u slučaju usporedbe rezultata uzoraka KtE i KtAE. Unatoč utvrđenoj većoj ukupnoj kiselosti kiselih tijesta KtE, KtAE i KtAEPF u odnosu na Kt, utvrđena je manja ukupna kiselost navedenih uzoraka kruha u odnosu na kruh Kt. U odnosu na kruh bez dodatka kiselog tijesta, šećera, aminokiselina i enzima (0), u kruhu s dodatkom prolina (P), prolina i glukoze (PG) te enzima (E) došlo je do smanjenja ukupne kiselosti (3,76 u usporedbi s od 2,65 do 3,43).

U tablici 29 prikazani su udjeli mliječne i octene kiseline u kiselom tijestu te izračunati fermentabilni koeficijenti.

**Tablica 29.** Udjel mliječne i octene kiseline (% suhe tvari) te fermentabilni koeficijent u uzorcima kiselog tijesta pripremljenim s *L. brevis* različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

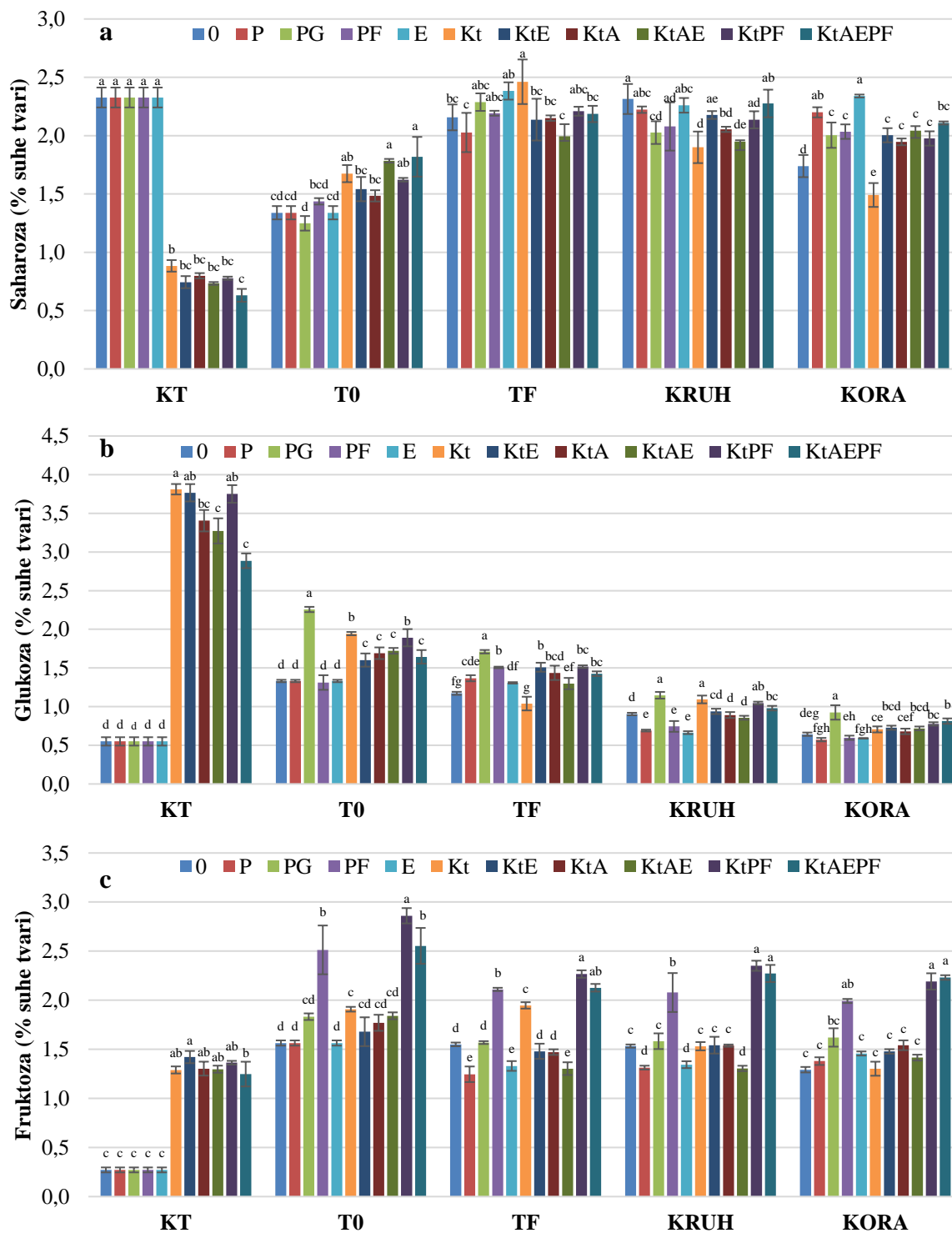
	Mliječna kiselina (% suhe tvari)				Octena kiselina (% suhe tvari)				Fermentabilni koeficijent
<b>Kt</b>	2,06	±	0,15	b	0,52	±	0,00	a	2,7
<b>KtPF</b>	2,39	±	0,24	b	0,38	±	0,01	d	4,2
<b>KtA</b>	2,56	±	0,10	b	0,47	±	0,00	bc	3,6
<b>KtE</b>	3,03	±	0,25	a	0,60	±	0,01	a	3,3
<b>KtAE</b>	3,05	±	0,15	a	0,48	±	0,02	b	4,3
<b>KtAEPF</b>	3,11	±	0,11	a	0,44	±	0,01	c	4,8

Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ )

Oznake uzoraka: Kt, KtPF – bez dodataka; KtA – dodatak arginina (A); KtE – dodatak enzima proteaza (E); KtAE, KtAEPF – dodatak arginina i enzima proteaza (prolin (P), glukoza (G) i fruktoza (F) dodani su u krušno tijesto)

U svim uzorcima kiselog tijesta s dodatkom enzima proteaza (KtE, KtAE i KtAEPF) utvrđen je veći udjel mliječne kiseline u odnosu na uzorke bez njihovog dodatka. Di Cagno i sur. (2003) su također utvrdili povećanje udjela mliječne, ali i octene kiseline s dodatkom proteaza pri kiseljenju tijesta. Dobiveni rezultati bili su u skladu s rezultatima određivanja ukupne kiselosti kiselog tijesta te je utvrđena pozitivna korelacija udjela mliječne kiseline i octene s ukupnom kiselosti kiselog tijesta ( $r = 0,990$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = 0,976$ ,  $p < 0,001$ ).

Na slici 35 prikazani su rezultati određivanja šećera u različitim fazama pripreme kruha.



**Slika 35.** Udjel saharoze/maltoze (a), glukoze (b) i fruktoze/ksiloze (c) (% suhe tvari) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin. Udjel šećera u uzorku 0 KT odnosno 0 T0 smatran udjelom u uzorcima P, PF, PG i E KT odnosno P i E T0

Pri kiseljenju tijesta došlo je do smanjenja udjela saharoze/maltoze te povećanja udjela glukoze i fruktoze/ksiloze, a što je u skladu s rezultatima ispitivanja utjecaja procesa kiseljenja s različitim bakterijama mliječne kiseline (poglavlje 4.2.1.). U uzorcima s dodatkom arginina (KtA, KtAE, KtAEPF) utvrđen je značajno manji udjel glukoze u odnosu na uzorak Kt.

U krušnom tijestu prije fermentacije nije utvrđena značajna razlika u udjelu saharoze/maltoze u uzorcima s dodatkom prolina, glukoze, fruktoze i enzima (P, PG, PF, E) u odnosu na tijesto bez njihovog dodatka (0), kao ni u udjelu saharoze/maltoze u uzorcima s navedenim dodacima i dodatkom kiselog tijesta (KtE, KtA, KtAE KtPF, KtAEPF) u odnosu na tijesto s dodatkom samo kiselog tijesta (Kt). Trend sukladan tome utvrđen je i za udjel fruktoze/ksiloze, no do povećanja njihovog udjela došlo je kod uzoraka PF, KtPF i KtAEPF u koje je fruktoza dodana. Povećanje udjela glukoze u tijestu bez dodatka kiselog tijesta utvrđeno je samo u slučaju uzorka PG u koji je glukoza dodana. U odnosu na tijesto Kt, u uzorcima tijesta KtE, KtA, KtAE i KtAEPF utvrđen je manji udjel glukoze, što je u skladu s rezultatima dobivenim za kiselo tijesto.

U krušnom tijestu nakon fermentacije utvrđen je manji udjel saharoze/maltoze u uzorcima tijesta KtE, KtA, KtAE i KtAEPF u odnosu na Kt, dok razlika u udjelu saharoze/maltoze u uzorcima tijesta P, PG, PF i E u odnosu na 0 nije utvrđena. U uzorcima tijesta P, PF i E utvrđen je veći udjel glukoze u odnosu na 0, kao i u uzorcima tijesta KtE, KtA, KtAE, KtPF i KtAEPF u odnosu na Kt. Manji udjel fruktoze/ksiloze u odnosu na 0 utvrđen je u uzorcima tijesta P i E, a u odnosu na Kt u uzorcima tijesta KtE, KtA i KtAE. Najveći udjel glukoze/fruktoze u krušnom tijestu nakon fermentacije bio je i dalje u uzorcima s njihovim dodatkom – PG odnosno PF, KtPF i KtAEPF.

U odnosu na kruh 0, u kruhu PG utvrđen je manji udjel saharoze/maltoze, dok je u uzorcima kruha KtE i KtAEPF utvrđen veći udjel saharoze/maltoze u odnosu na kruh Kt. U uzorcima kruha P, PF i E utvrđen je manji udjel glukoze u odnosu na 0, a u uzorcima kruha KtE, KtA, KtAE i KtAEPF u odnosu na Kt. U uzorcima kruha P i E utvrđen je manji udjel fruktoze/ksiloze u odnosu na 0, a u kruhu KtAE u odnosu na Kt.

Značajno veći udjel saharoze/maltoze u kori kruha utvrđen je kod uzoraka P, PG, PF, E u odnosu na 0 te uzoraka KtE, KtA, KtAE, KtPF i KtAEPF u odnosu na Kt. U odnosu na kruh 0, u uzorcima kruha P i E utvrđen je manji udjel glukoze, dok je u kruhu KtAEPF utvrđen

veći udjel glukoze u odnosu na kruh Kt. Značajno veći udjel fruktoze/ksiloze u kori kruha utvrđen je jedino u slučaju uzoraka s dodatkom fruktoze (PF, KtPF i KtAEPF).

Veći udjel šećera u određenim uzorcima u pojedinim fazama pripreme kruha mogao je doprinijeti nastanku hlapljivih spojeva arome kruha.

#### 4.3.2. Profil hlapljivih spojeva arome

Kao što je već navedeno, šećeri, aminokiseline i enzimi proteaze doprinose povećanju koncentracije prekursora hlapljivih spojeva arome (Martínez-Anaya, 1996). Aminokiseline i šećeri su supstrat za metabolizam kvasaca i bakterija mliječne kiseline te reakcije koje se odvijaju pri pečenju (Maillardova reakcija, karamelizacija, toplinska degradacija) (Pico i sur., 2015). Stoga je s njihovim dodatkom očekivana i promjena koncentracije pojedinih hlapljivih spojeva arome. Pri tome do povećanja koncentracije pojedinih spojeva može doći uslijed veće koncentracije njegovih prekursora, a do smanjenja koncentracije pojedinih spojeva radi njihove konverzije ili konverzije njihovih prekursora u druge spojeve. Osim toga, na promjenu koncentracije hlapljivih spojeva arome može utjecati i promjena uvjeta pri proizvodnji, kao što je promjena pH koja se odražava na aktivnosti enzima prisutnih u tijestu (Gänzle, 2014; Martínez-Anaya, 1996). U ovom dijelu istraživanja ispitan je utjecaj dodatka pojedinih prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima, njihove međusobne kombinacije te kombinacije s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* na profil hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha. Budući da je poznato kako bezglutenski kruh u odnosu na pšenični kruh karakterizira manja koncentracija pirazina i drugih spojeva poput pirola i furana koji su većinom odgovorni za miris i aromu kore po pečenom i izgorenom (Pacyński i sur., 2015), poseban naglasak stavljen je na utjecaj navedenih dodataka na njihovu koncentraciju u kruhu i kori. U tablicama od 30 do 36 prikazane su koncentracije aldehida, ketona, alkohola, kiselina, estera, aromatskih ugljikovodika, fenola, sumpornih spojeva, pirazina, pirola i furana u fazama pripreme kruha, ovisno o dodatku prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta.

**Tablica 30.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	2-Metilbutanal			3-Metilbutanal			Pentanal			Heksanal			<i>(E)</i> -2-Heksenal			Heptanal								
<b>KT</b>																								
<b>0*</b>	nd			nd			274,2	±	29,4	a	19147	±	689	a	40,35	±	3,71	a	121,2	±	7,7	a		
<b>Kt</b>	nd			nd			65,8	±	4,4	c	2911	±	339	c	4,89	±	0,21	c	45,7	±	5,4	cd		
<b>KtPF</b>	nd			nd			41,3	±	0,4	c	2550	±	119	c	3,50	±	0,64	c	34,2	±	3,5	cd		
<b>KtA</b>	nd			nd			127,4	±	5,9	b	9973	±	729	b	25,28	±	0,56	b	80,7	±	8,9	b		
<b>KtE</b>	nd			nd			64,5	±	9,4	c	2929	±	351	c	4,64	±	0,77	c	32,7	±	3,9	d		
<b>KtAE</b>	nd			nd			62,2	±	3,7	c	3362	±	596	c	6,78	±	0,88	c	50,5	±	0,9	c		
<b>KtAEPF</b>	nd			nd			76,0	±	10,4	c	3201	±	194	c	7,13	±	0,00	c	36,5	±	4,3	cd		
<b>T0</b>																								
<b>0*</b>	197,8	±	13,3	b	181,6	±	22,3	d	145,0	±	13,0	ab	7981	±	653	ab	22,86	±	1,94	b	67,1	±	3,9	a
<b>Kt</b>	251,5	±	27,3	b	306,9	±	40,6	c	162,3	±	6,8	ab	10153	±	924	ab	30,99	±	1,78	a	71,2	±	5,8	a
<b>KtPF</b>	410,5	±	50,5	a	420,5	±	21,3	ab	146,2	±	23,8	ab	9870	±	1665	ab	29,85	±	3,18	a	64,4	±	5,0	a
<b>KtA</b>	416,0	±	11,0	a	341,7	±	13,3	bc	134,8	±	8,6	ab	8232	±	1350	b	29,21	±	1,28	ab	64,8	±	3,4	a
<b>KtE</b>	483,7	±	27,4	a	455,6	±	12,7	a	182,4	±	11,5	a	12469	±	956	a	32,25	±	1,32	a	75,2	±	7,6	a
<b>KtAE</b>	415,4	±	64,9	a	373,3	±	20,8	ac	142,9	±	19,8	ab	9321	±	1455	ab	31,23	±	2,34	a	70,6	±	8,8	a
<b>KtAEPF</b>	387,4	±	42,9	a	343,8	±	31,3	bc	122,4	±	17,0	b	7147	±	1445	b	30,08	±	1,11	ab	52,7	±	5,3	a
<b>TF</b>																								
<b>0</b>	288,7	±	23,5	bcd	215,8	±	12,3	bc	164,7	±	16,8	ab	10669	±	880	ac	22,35	±	2,39	bc	73,7	±	4,4	ab
<b>P</b>	208,3	±	15,4	d	146,1	±	8,3	c	141,7	±	7,0	ab	6792	±	113	c	16,02	±	0,50	cd	36,3	±	1,2	df
<b>PF</b>	431,2	±	68,6	a	247,1	±	21,0	ac	169,5	±	27,3	ab	8362	±	820	bc	12,90	±	0,59	d	55,2	±	6,9	bcd
<b>PG</b>	344,3	±	57,7	ab	219,3	±	14,4	bc	180,3	±	23,5	ac	10032	±	869	ac	21,41	±	1,77	bc	56,0	±	7,1	bcd
<b>E</b>	325,1	±	11,5	ac	244,8	±	38,5	bc	129,5	±	2,0	ab	9032	±	721	bc	24,16	±	2,09	b	55,1	±	8,2	cf
<b>Kt</b>	217,4	±	24,1	cd	269,6	±	5,6	ac	187,5	±	25,9	ac	11160	±	1805	abc	32,33	±	2,51	a	85,9	±	7,6	a
<b>KtPF</b>	281,4	±	35,3	bcd	289,6	±	42,2	ab	133,3	±	8,7	bc	10056	±	505	bc	21,27	±	0,83	bc	59,2	±	5,0	bc
<b>KtA</b>	196,8	±	19,1	d	271,2	±	28,1	ac	157,8	±	22,5	ab	10744	±	891	ac	25,48	±	4,26	b	70,0	±	6,3	ac
<b>KtE</b>	309,6	±	22,3	bcd	373,9	±	37,4	a	196,2	±	9,7	a	14404	±	1684	a	33,54	±	1,95	a	86,7	±	9,0	a
<b>KtAE</b>	240,3	±	17,4	bcd	322,8	±	45,7	ab	125,7	±	24,6	b	8240	±	1201	c	21,04	±	0,54	bc	57,7	±	9,8	bcd
<b>KtAEPF</b>	232,0	±	38,5	d	307,9	±	38,9	ab	141,4	±	10,9	ab	10104	±	710	ac	23,60	±	1,32	bc	74,8	±	6,7	ac

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 30.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	2-Metilbutanal			3-Metilbutanal			Pentanal			Heksanal			<i>(E)</i> -2-Heksenal			Heptanal		
<b>KRUH</b>																		
<b>0</b>	108,0	± 2,3	d	98,4	± 15,1	d	46,1	± 3,0	ab	3067	± 112	a	5,89	± 0,28	ab	65,3	± 3,3	ad
<b>P</b>	65,7	± 8,6	d	60,0	± 1,5	d	47,6	± 4,4	ab	1933	± 69	de	3,63	± 0,11	d	39,4	± 2,9	b
<b>PF</b>	91,6	± 17,7	d	72,2	± 3,4	d	48,0	± 6,9	ab	1850	± 50	e	4,19	± 0,08	cd	47,7	± 4,4	bcd
<b>PG</b>	80,8	± 11,0	d	61,0	± 4,1	d	42,4	± 2,7	ab	1825	± 25	e	3,66	± 0,04	d	43,1	± 2,4	bd
<b>E</b>	139,0	± 19,4	d	101,5	± 3,3	d	62,7	± 8,6	a	3024	± 223	a	6,29	± 0,40	a	60,0	± 4,0	ab
<b>Kt</b>	323,4	± 43,7	c	292,3	± 16,2	c	52,4	± 5,3	ab	2603	± 23	b	7,12	± 0,30	a	79,3	± 7,6	a
<b>KtPF</b>	346,6	± 60,1	c	227,2	± 5,2	c	42,0	± 4,9	b	2503	± 128	bc	4,79	± 0,20	bd	67,8	± 2,7	a
<b>KtA</b>	323,5	± 5,2	c	272,1	± 42,6	c	43,5	± 8,6	b	2294	± 120	bd	4,82	± 0,38	bd	65,1	± 5,5	ac
<b>KtE</b>	1096,8	± 87,6	a	1197,0	± 105,1	a	43,9	± 6,5	b	2713	± 43	ab	6,66	± 0,30	a	77,6	± 10,5	a
<b>KtAE</b>	453,3	± 27,8	c	304,5	± 5,5	c	41,5	± 5,2	b	2401	± 166	bc	4,95	± 0,40	bc	71,7	± 9,0	a
<b>KtAEPF</b>	631,6	± 9,7	b	458,6	± 42,8	b	48,2	± 5,5	ab	2288	± 152	cd	6,07	± 0,67	a	76,7	± 3,7	a
<b>KORA</b>																		
<b>0</b>	519,8	± 20,9	e	253,7	± 22,2	e	58,9	± 3,4	b	3047	± 108	bc	4,16	± 0,16	bcd	56,3	± 3,9	d
<b>P</b>	228,3	± 17,2	e	124,6	± 17,2	e	59,7	± 4,8	b	2433	± 53	c	3,27	± 0,18	d	43,6	± 0,8	d
<b>PF</b>	317,5	± 12,5	e	184,9	± 28,1	e	72,4	± 2,6	a	2438	± 255	c	3,74	± 0,09	bcd	49,4	± 4,7	d
<b>PG</b>	365,6	± 34,4	e	197,8	± 18,6	e	70,2	± 4,1	ab	2489	± 87	c	3,32	± 0,20	cd	48,0	± 0,8	d
<b>E</b>	726,8	± 51,4	e	387,3	± 12,4	e	72,5	± 5,6	a	3257	± 86	b	4,61	± 0,13	acd	57,0	± 2,7	cd
<b>Kt</b>	2157,1	± 100,7	cd	1524,1	± 91,7	c	65,4	± 4,0	ab	2926	± 212	bc	4,94	± 0,54	abc	75,2	± 4,2	ab
<b>KtPF</b>	2021,7	± 108,8	cd	1156,9	± 63,9	d	76,8	± 2,8	a	3429	± 225	ab	4,36	± 0,40	bcd	69,1	± 7,6	bc
<b>KtA</b>	1761,9	± 187,8	d	1035,3	± 118,7	d	77,9	± 2,5	a	3818	± 314	a	4,49	± 0,59	c	70,7	± 3,1	b
<b>KtE</b>	6665,0	± 392,3	a	4304,0	± 149,9	a	68,3	± 6,6	ab	3135	± 283	b	5,03	± 0,21	abc	81,4	± 4,3	ab
<b>KtAE</b>	2529,1	± 151,7	c	1541,0	± 118,2	cd	68,5	± 8,4	ab	2969	± 195	bc	4,86	± 0,36	abc	71,9	± 4,3	b
<b>KtAEPF</b>	4421,8	± 401,1	b	2561,4	± 290,4	b	71,8	± 4,8	a	3323	± 195	ab	5,59	± 0,35	a	84,8	± 3,3	a

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 30.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	<i>(E)</i> -2-Heptenal			Oktanal			<i>(E)</i> -2-Oktenal			Nonanal			<i>(E)</i> -2-Nonenal		
<b>KT</b>															
<b>0*</b>	670,7	± 34,4	a	19,62	± 1,66	a	294,6	± 15,9	a	87,1	± 4,6	a	25,67	± 1,98	a
<b>Kt</b>	124,2	± 23,2	c	11,69	± 0,35	c	64,1	± 2,1	cf	46,4	± 5,7	c	13,84	± 0,85	c
<b>KtPF</b>	59,0	± 11,4	d	11,99	± 0,30	c	35,0	± 5,1	ef	45,7	± 4,0	c	8,53	± 0,35	d
<b>KtA</b>	348,8	± 7,3	b	15,86	± 1,67	b	148,3	± 1,8	b	68,4	± 1,6	b	21,17	± 1,67	b
<b>KtE</b>	96,5	± 14,1	cd	14,37	± 1,69	bc	47,2	± 8,6	def	45,9	± 1,6	c	11,77	± 1,17	cd
<b>KtAE</b>	129,7	± 16,4	c	12,32	± 1,15	c	69,7	± 5,7	cd	50,9	± 1,2	c	14,83	± 1,44	c
<b>KtAEPF</b>	151,0	± 9,5	c	15,12	± 0,36	bc	70,8	± 10,7	c	57,1	± 5,2	bc	13,49	± 1,48	c
<b>T0</b>															
<b>0*</b>	302,5	± 9,2	b	8,19	± 0,62	c	105,9	± 6,0	c	27,5	± 3,0	c	13,28	± 0,82	cd
<b>Kt</b>	440,4	± 34,8	a	16,33	± 1,30	a	185,6	± 10,3	a	45,3	± 6,0	ab	28,44	± 1,85	a
<b>KtPF</b>	365,7	± 38,6	ab	13,84	± 1,62	ab	134,2	± 0,7	bc	50,7	± 6,1	a	18,95	± 2,08	bc
<b>KtA</b>	363,8	± 40,8	ab	11,78	± 0,52	bc	127,6	± 10,0	bc	37,8	± 3,8	b	16,75	± 1,98	d
<b>KtE</b>	446,5	± 24,4	a	16,12	± 1,36	a	165,7	± 17,3	ab	44,1	± 2,3	ab	25,19	± 2,17	ab
<b>KtAE</b>	412,7	± 34,6	a	13,53	± 0,48	ab	140,9	± 16,7	bc	43,5	± 4,7	ab	22,13	± 2,92	b
<b>KtAEPF</b>	411,4	± 27,9	ab	13,51	± 1,63	ab	124,7	± 17,1	bc	45,8	± 2,9	ab	18,71	± 2,00	bc
<b>TF</b>															
<b>0</b>	334,9	± 15,1	ce	14,24	± 1,68	cd	128,8	± 1,9	cdg	35,2	± 1,0	eg	12,32	± 1,02	de
<b>P</b>	172,5	± 1,8	f	9,36	± 0,21	c	73,1	± 1,1	f	21,3	± 0,7	g	8,96	± 0,46	e
<b>PF</b>	225,8	± 17,4	ef	10,94	± 1,38	cd	89,7	± 9,3	ef	26,8	± 0,6	efg	9,79	± 1,87	e
<b>PG</b>	258,1	± 11,8	def	12,36	± 2,02	cd	109,7	± 3,9	eg	30,5	± 3,3	defg	12,47	± 1,21	de
<b>E</b>	309,6	± 31,0	ce	12,15	± 0,80	cd	127,0	± 16,3	cdg	38,1	± 2,9	cf	19,96	± 1,53	bc
<b>Kt</b>	471,3	± 40,8	ab	20,41	± 2,81	ab	191,7	± 17,0	a	46,2	± 5,5	bc	22,43	± 2,01	bc
<b>KtPF</b>	336,9	± 22,6	cd	15,44	± 2,54	bee	126,8	± 10,3	cdg	60,0	± 5,6	a	21,09	± 3,06	bc
<b>KtA</b>	349,1	± 42,0	cd	15,34	± 0,32	bce	120,7	± 9,5	ce	39,7	± 1,7	ce	17,22	± 1,01	cd
<b>KtE</b>	510,2	± 29,9	a	23,11	± 0,58	a	184,3	± 4,3	ab	57,8	± 6,5	ab	31,02	± 1,69	a
<b>KtAE</b>	349,9	± 37,9	cd	14,58	± 2,05	cd	110,9	± 5,9	de	41,8	± 4,3	cd	19,65	± 1,49	bc
<b>KtAEPF</b>	395,3	± 43,6	bc	17,53	± 0,67	ade	153,7	± 13,0	bc	49,4	± 2,4	ac	24,30	± 0,78	ab

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 30.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	(E)-2-Heptenal			Oktanal			(E)-2-Oktenal			Nonanal			(E)-2-Nonenal							
<b>KRUH</b>																				
<b>0</b>	42,8	±	3,7	d	10,47	±	0,89	ce	26,6	±	2,7	efh	19,6	±	1,5	f	4,15	±	0,38	df
<b>P</b>	28,5	±	0,9	e	9,65	±	0,98	de	17,2	±	2,7	i	21,9	±	1,4	ef	3,71	±	0,36	ef
<b>PF</b>	35,9	±	1,0	de	14,59	±	1,09	ab	21,2	±	2,9	hi	35,0	±	1,2	cd	6,11	±	0,14	cdf
<b>PG</b>	30,3	±	2,6	e	10,90	±	1,07	bcd	17,0	±	0,7	i	23,2	±	1,6	ef	3,99	±	0,65	f
<b>E</b>	56,3	±	2,5	bc	16,79	±	0,63	a	31,7	±	1,7	cde	43,5	±	2,7	bc	8,33	±	0,94	bc
<b>Kt</b>	58,8	±	1,3	b	14,23	±	1,11	ac	38,8	±	4,5	acg	30,5	±	1,9	de	6,63	±	0,75	bd
<b>KtPF</b>	50,0	±	1,1	c	15,56	±	1,55	a	30,2	±	1,3	df	44,2	±	4,0	ab	8,05	±	0,30	bc
<b>KtA</b>	49,9	±	3,2	c	15,11	±	1,93	a	30,3	±	2,2	df	37,6	±	2,1	bd	6,16	±	0,88	cde
<b>KtE</b>	60,2	±	2,7	b	16,82	±	0,91	a	41,6	±	2,1	ab	37,6	±	3,7	bd	9,13	±	0,44	ab
<b>KtAE</b>	55,8	±	0,9	bc	15,90	±	1,47	a	35,1	±	3,4	bdg	36,0	±	3,4	cd	8,69	±	0,51	b
<b>KtAEPF</b>	69,4	±	2,6	a	17,82	±	0,93	a	43,4	±	3,3	a	51,8	±	1,1	a	10,93	±	1,51	a
<b>KORA</b>																				
<b>0</b>	44,6	±	1,8	cd	9,35	±	0,56	ef	19,7	±	2,0	de	17,6	±	0,7	d	4,30	±	0,18	ef
<b>P</b>	28,8	±	0,9	e	10,08	±	0,42	df	14,4	±	0,9	e	25,4	±	0,9	cd	6,06	±	0,74	de
<b>PF</b>	38,4	±	3,7	de	11,97	±	0,62	df	16,8	±	1,5	e	27,4	±	2,4	c	6,36	±	0,84	de
<b>PG</b>	32,9	±	0,4	de	11,90	±	1,18	df	14,7	±	1,0	e	27,0	±	1,2	cd	6,57	±	0,58	cde
<b>E</b>	53,6	±	2,7	bc	13,07	±	1,50	cde	22,3	±	0,4	de	32,2	±	4,2	c	7,69	±	0,12	bd
<b>Kt</b>	56,2	±	2,3	bc	15,18	±	1,04	bd	32,0	±	1,2	ab	31,7	±	1,9	c	9,18	±	0,51	bc
<b>KtPF</b>	49,8	±	1,5	bc	15,47	±	0,81	bd	24,0	±	1,6	cd	42,5	±	3,0	ab	10,14	±	1,31	b
<b>KtA</b>	49,7	±	5,6	bc	14,19	±	1,06	cd	23,2	±	2,1	d	24,9	±	2,3	cd	6,08	±	0,78	de
<b>KtE</b>	58,5	±	2,3	b	18,81	±	2,67	ab	36,8	±	1,5	ab	41,4	±	1,9	b	13,25	±	0,61	a
<b>KtAE</b>	56,8	±	3,6	b	16,14	±	1,66	bc	29,7	±	2,9	bc	31,1	±	2,5	c	9,25	±	0,83	bc
<b>KtAEPF</b>	70,4	±	5,6	a	20,73	±	2,39	a	36,8	±	4,3	a	50,5	±	4,5	a	14,72	±	0,29	a

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin



**Tablica 30.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	<i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal				Dekanal				<i>(E,E)</i> -2,4-Dekadienal				Benzaldehid				Fenilacetaldehid			
<b>KT</b>																				
<b>0*</b>	108,39	±	3,61	a	18,2	±	0,6	b	186,7	±	21,9	b	24,9	±	4,2	bc	13,2	±	2,1	fg
<b>Kt</b>	38,04	±	5,88	c	18,3	±	1,1	b	95,4	±	15,7	cd	15,4	±	0,9	cd	17,3	±	1,8	ef
<b>KtPF</b>	11,69	±	1,18	e	24,6	±	2,5	b	42,1	±	1,2	d	13,5	±	1,2	d	12,1	±	1,8	g
<b>KtA</b>	92,09	±	4,45	b	21,2	±	2,0	b	333,9	±	42,4	a	20,4	±	2,0	cd	14,1	±	0,7	eg
<b>KtE</b>	20,98	±	3,24	de	24,3	±	1,8	b	89,0	±	4,6	cd	31,7	±	3,9	ab	18,5	±	0,6	e
<b>KtAE</b>	31,03	±	3,43	cd	26,7	±	4,0	b	129,8	±	19,7	bc	37,6	±	4,2	a	16,5	±	0,6	eg
<b>KtAEPF</b>	34,13	±	3,32	cd	43,2	±	1,6	a	172,7	±	12,0	b	22,9	±	2,4	bd	18,1	±	0,9	e
<b>T0</b>																				
<b>0*</b>	61,17	±	2,93	b	22,3	±	1,0	c	151,9	±	6,1	c	45,6	±	1,5	bc	17,7	±	0,9	d
<b>Kt</b>	87,61	±	12,77	a	29,1	±	2,8	ac	213,3	±	7,7	ab	50,4	±	5,2	bc	34,8	±	0,9	c
<b>KtPF</b>	72,57	±	5,78	ab	38,1	±	0,7	a	152,9	±	11,9	c	43,1	±	4,8	c	41,2	±	3,7	bc
<b>KtA</b>	64,93	±	4,11	b	24,5	±	2,4	c	222,0	±	27,1	ab	49,3	±	4,2	bc	37,2	±	2,5	bc
<b>KtE</b>	96,29	±	3,41	a	26,1	±	3,3	bc	249,7	±	24,6	a	58,2	±	5,8	ab	53,9	±	5,1	a
<b>KtAE</b>	84,39	±	7,90	ab	34,6	±	4,3	ab	197,8	±	13,1	b	69,5	±	2,3	a	46,0	±	1,7	ab
<b>KtAEPF</b>	74,23	±	10,78	ab	25,1	±	2,4	bc	206,8	±	3,6	ab	44,4	±	1,3	c	50,8	±	3,5	a
<b>TF</b>																				
<b>0</b>	58,52	±	5,61	cd	28,0	±	1,8	bc	82,7	±	9,1	df	58,9	±	8,7	a	27,2	±	0,6	def
<b>P</b>	26,82	±	0,58	e	14,3	±	0,3	e	39,9	±	3,4	ef	25,6	±	1,5	c	17,0	±	0,7	fg
<b>PF</b>	36,40	±	3,07	e	17,8	±	1,4	de	39,1	±	2,0	ef	31,8	±	5,1	cd	25,0	±	1,0	eg
<b>PG</b>	40,00	±	4,07	de	17,7	±	0,3	de	41,8	±	2,3	ef	33,8	±	5,8	cd	24,0	±	0,3	eg
<b>E</b>	65,81	±	8,18	c	27,5	±	2,4	bc	86,9	±	9,8	cde	62,5	±	8,8	a	36,7	±	5,1	cd
<b>Kt</b>	96,49	±	6,34	b	23,6	±	1,4	cd	168,6	±	24,2	ab	48,2	±	5,3	ad	34,6	±	1,4	ce
<b>KtPF</b>	69,89	±	6,64	c	43,5	±	1,7	a	136,1	±	5,6	bc	52,5	±	3,6	ab	39,2	±	4,4	bc
<b>KtA</b>	62,34	±	6,33	c	26,2	±	1,1	bc	123,4	±	3,9	cd	39,2	±	4,4	bcd	27,5	±	1,9	e
<b>KtE</b>	123,28	±	8,22	a	32,1	±	0,8	b	205,5	±	15,7	a	58,0	±	5,8	a	50,0	±	3,1	a
<b>KtAE</b>	71,48	±	1,26	c	30,4	±	1,1	b	127,9	±	9,4	bd	64,7	±	5,6	a	44,3	±	1,9	ac
<b>KtAEPF</b>	99,17	±	2,01	b	42,4	±	4,8	a	171,4	±	21,7	ab	40,5	±	2,6	cd	46,2	±	3,5	ab

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 30.** Koncentracija aldehida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	<i>(E,E)</i> -2,4-Nonadienal			Dekanal			<i>(E,E)</i> -2,4-Dekadienal			Benzaldehid			Fenilacetaldehid							
<b>KRUH</b>																				
<b>0</b>	5,79	±	0,82	ef	21,9	±	1,5	bc	158,3	±	15,2	f	38,3	±	0,6	ac	30,3	±	0,7	ef
<b>P</b>	3,94	±	0,15	fg	15,5	±	3,8	c	94,3	±	3,9	fg	17,5	±	1,3	e	13,0	±	1,2	f
<b>PF</b>	4,80	±	0,63	efg	32,2	±	2,8	ab	94,0	±	5,3	g	23,0	±	1,3	de	20,6	±	3,4	f
<b>PG</b>	3,82	±	0,06	g	21,4	±	2,1	bc	68,9	±	6,3	g	19,9	±	2,2	e	16,4	±	1,6	f
<b>E</b>	7,92	±	0,24	bd	38,2	±	2,4	a	171,8	±	14,8	ef	45,0	±	6,5	a	39,5	±	5,3	ef
<b>Kt</b>	8,10	±	0,97	bc	32,4	±	1,8	ab	312,8	±	12,0	cd	30,4	±	2,2	cd	81,2	±	6,0	cd
<b>KtPF</b>	6,47	±	0,50	cde	38,2	±	1,7	a	246,0	±	18,6	d	44,3	±	0,6	ab	74,4	±	6,4	cd
<b>KtA</b>	5,97	±	0,39	df	28,8	±	5,4	ab	242,8	±	3,9	de	34,6	±	3,1	bc	58,0	±	8,7	de
<b>KtE</b>	9,28	±	0,15	ab	39,5	±	6,4	a	437,9	±	11,5	b	44,8	±	1,1	a	274,9	±	24,8	a
<b>KtAE</b>	8,92	±	0,96	b	33,5	±	4,5	a	354,0	±	16,7	c	45,0	±	4,1	a	91,8	±	5,6	c
<b>KtAEPF</b>	11,14	±	0,92	a	36,2	±	3,2	a	528,7	±	44,7	a	46,9	±	2,7	a	135,3	±	17,6	b
<b>KORA</b>																				
<b>0</b>	5,47	±	0,35	de	15,1	±	1,0	c	127,9	±	19,5	e	57,5	±	1,6	ce	64,8	±	3,6	ef
<b>P</b>	3,82	±	0,63	f	16,6	±	1,8	c	70,4	±	9,3	e	28,5	±	1,9	f	25,9	±	0,6	f
<b>PF</b>	4,58	±	0,15	ef	17,4	±	1,7	c	93,7	±	6,5	e	33,3	±	2,2	f	36,3	±	5,6	ef
<b>PG</b>	4,36	±	0,22	ef	16,9	±	2,2	c	71,3	±	1,3	e	33,7	±	2,5	f	34,2	±	2,6	ef
<b>E</b>	6,76	±	0,39	cd	19,2	±	1,2	c	138,0	±	5,0	de	59,8	±	4,3	ce	95,5	±	9,4	e
<b>Kt</b>	8,41	±	0,49	bc	28,9	±	0,9	b	314,4	±	8,2	bc	53,3	±	4,2	de	246,0	±	9,4	c
<b>KtPF</b>	6,69	±	0,51	cd	28,5	±	1,7	b	228,0	±	15,6	cd	55,2	±	2,2	de	182,6	±	13,5	d
<b>KtA</b>	5,81	±	0,30	de	19,1	±	1,6	c	210,3	±	30,9	d	61,8	±	3,6	bed	165,3	±	19,2	d
<b>KtE</b>	10,56	±	0,48	ab	29,7	±	2,9	b	419,1	±	15,9	ab	70,4	±	5,7	ab	719,8	±	35,3	a
<b>KtAE</b>	8,84	±	0,84	b	27,1	±	3,6	b	360,1	±	43,8	b	69,0	±	6,3	ac	273,0	±	15,9	c
<b>KtAEPF</b>	11,05	±	1,14	a	40,3	±	1,6	a	496,8	±	63,9	a	76,8	±	6,2	a	451,3	±	49,5	b

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 31.** Koncentracija ketona ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	2-Butanon	2,3-Butandion	2,3-Pentandion	2-Heptanon	6-Metil-5-hepten-2-on	2-Oktanon
<b>KT</b>						
<b>0*</b>	nd	857 ± 104 a	164,8 ± 27,0 a	8,37 ± 0,51 a	9,34 ± 0,41 a	3,547 ± 0,279 a
<b>Kt</b>	nd	251 ± 13 cd	59,7 ± 10,5 bc	2,42 ± 0,28 cd	4,65 ± 0,32 de	1,545 ± 0,100 bc
<b>KtPF</b>	nd	191 ± 45 d	nd c	1,47 ± 0,04 d	5,09 ± 0,22 de	0,928 ± 0,083 d
<b>KtA</b>	nd	399 ± 33 b	68,7 ± 15,0 b	3,88 ± 0,39 b	6,15 ± 0,79 bce	1,171 ± 0,058 cd
<b>KtE</b>	nd	292 ± 44 bd	nd c	3,07 ± 0,29 bc	7,92 ± 1,12 ab	1,750 ± 0,141 b
<b>KtAE</b>	nd	350 ± 26 bc	nd c	2,72 ± 0,14 bd	7,84 ± 0,25 ac	1,439 ± 0,194 bd
<b>KtAEPF</b>	nd	301 ± 24 bd	nd c	3,25 ± 0,14 bc	5,44 ± 0,22 cd	1,700 ± 0,098 bc
<b>T0</b>						
<b>0*</b>	nd	1570 ± 116 a	128,1 ± 11,1 bc	7,93 ± 0,18 a	7,82 ± 0,54 b	5,077 ± 0,393 a
<b>Kt</b>	nd	1551 ± 145 a	125,6 ± 16,1 b	8,48 ± 0,28 a	9,41 ± 0,27 ab	5,009 ± 0,522 a
<b>KtPF</b>	nd	1417 ± 204 a	177,4 ± 13,6 a	8,50 ± 0,55 a	11,56 ± 1,15 a	5,163 ± 0,513 a
<b>KtA</b>	nd	1480 ± 128 a	179,0 ± 18,6 a	7,87 ± 0,51 a	10,28 ± 0,58 ab	3,423 ± 0,164 b
<b>KtE</b>	nd	1548 ± 74 a	168,0 ± 19,9 a	8,71 ± 0,81 a	10,66 ± 1,23 ab	5,484 ± 0,571 a
<b>KtAE</b>	nd	1453 ± 97 a	188,3 ± 3,2 a	8,03 ± 0,38 a	12,13 ± 0,44 a	4,393 ± 0,214 ab
<b>KtAEPF</b>	nd	1369 ± 157 a	157,0 ± 8,4 ac	7,67 ± 0,24 a	9,85 ± 0,82 ab	3,699 ± 0,559 b
<b>TF</b>						
<b>0</b>	nd	3049 ± 128 e	141,5 ± 10,0 de	8,81 ± 0,54 ab	7,99 ± 1,16 cd	9,827 ± 0,340 a
<b>P</b>	nd	6122 ± 270 a	179,4 ± 15,1 bcd	6,06 ± 0,80 c	5,95 ± 0,16 de	5,321 ± 0,595 d
<b>PF</b>	nd	5906 ± 211 ab	179,8 ± 13,7 bcd	8,21 ± 0,74 ab	8,52 ± 1,00 cef	7,218 ± 0,871 c
<b>PG</b>	nd	6384 ± 507 a	187,8 ± 18,5 bc	8,40 ± 0,63 ab	6,22 ± 0,80 de	6,770 ± 0,158 cd
<b>E</b>	nd	4908 ± 238 cd	172,1 ± 15,0 ce	9,07 ± 0,56 ab	10,78 ± 1,00 abf	9,791 ± 0,495 a
<b>Kt</b>	nd	3926 ± 130 a	197,8 ± 4,1 a	8,55 ± 0,23 a	9,40 ± 0,84 a	9,404 ± 0,538 a
<b>KtPF</b>	nd	5113 ± 493 bc	219,8 ± 22,4 ab	8,74 ± 0,49 ab	12,66 ± 0,92 a	8,566 ± 0,655 ac
<b>KtA</b>	nd	4825 ± 110 cd	258,4 ± 18,7 a	8,77 ± 0,85 ab	11,15 ± 1,26 abf	7,460 ± 0,032 bc
<b>KtE</b>	nd	5137 ± 439 bc	186,3 ± 20,3 bc	9,54 ± 0,64 a	11,54 ± 0,48 abf	9,768 ± 0,381 a
<b>KtAE</b>	nd	4866 ± 370 cd	240,4 ± 6,9 a	7,82 ± 0,93 bc	12,64 ± 0,62 a	8,412 ± 0,812 ac
<b>KtAEPF</b>	nd	4821 ± 169 cd	185,9 ± 26,7 bc	8,08 ± 0,41 ab	9,36 ± 0,41 bc	9,166 ± 0,345 a

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
 Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin  
 \*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 31.** Koncentracija ketona ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	2-Butanon	2,3-Butandion	2,3-Pentandion	2-Heptanon	6-Metil-5-hepten-2-on	2-Oktanon
<b>KRUH</b>						
<b>0</b>	nd	835 ± 124 d	96,3 ± 4,7 bc	27,58 ± 0,42 a	4,81 ± 0,33 de	5,349 ± 0,325 ab
<b>P</b>	nd	1333 ± 88 b	103,0 ± 7,5 bc	13,45 ± 0,60 cde	3,93 ± 0,58 e	2,406 ± 0,180 e
<b>PF</b>	nd	1195 ± 87 bc	145,7 ± 17,0 a	14,20 ± 1,78 df	9,29 ± 0,62 a	2,842 ± 0,348 e
<b>PG</b>	nd	1100 ± 70 c	118,2 ± 11,4 ac	12,71 ± 1,04 ef	6,21 ± 0,46 bcd	2,497 ± 0,323 e
<b>E</b>	nd	1268 ± 38 bc	123,2 ± 16,8 ac	16,59 ± 2,37 cde	8,17 ± 0,40 ab	4,105 ± 0,367 cd
<b>Kt</b>	nd	1079 ± 33 cd	91,0 ± 7,7 c	22,02 ± 0,51 b	5,32 ± 0,35 de	5,807 ± 0,368 a
<b>KtPF</b>	nd	1374 ± 70 b	112,8 ± 15,5 ac	14,65 ± 0,67 cde	8,01 ± 0,45 ac	3,837 ± 0,292 d
<b>KtA</b>	nd	1171 ± 106 bc	103,1 ± 13,5 bc	18,05 ± 2,17 bd	6,29 ± 0,76 cd	4,191 ± 0,234 d
<b>KtE</b>	nd	1617 ± 93 a	132,7 ± 15,1 ab	18,42 ± 2,47 bc	7,36 ± 0,45 ac	4,778 ± 0,332 bcd
<b>KtAE</b>	nd	1382 ± 9 ab	109,7 ± 13,7 bc	15,25 ± 1,43 cde	7,85 ± 0,28 ac	4,132 ± 0,482 d
<b>KtAEPF</b>	nd	1394 ± 61 b	115,2 ± 17,5 ac	16,17 ± 1,27 cde	7,19 ± 0,91 bc	5,099 ± 0,207 ac
<b>KORA</b>						
<b>0</b>	nd	1254 ± 118 c	260,0 ± 17,0 ef	34,51 ± 1,35 ab	4,55 ± 0,51 d	3,714 ± 0,251 bc
<b>P</b>	nd	1790 ± 94 a	293,3 ± 11,5 df	23,62 ± 0,55 df	5,22 ± 0,57 cd	2,249 ± 0,066 e
<b>PF</b>	nd	1770 ± 82 a	386,0 ± 19,9 bd	23,10 ± 0,65 ef	6,00 ± 0,65 bc	2,465 ± 0,262 de
<b>PG</b>	nd	1825 ± 134 a	399,5 ± 46,9 bc	21,70 ± 0,87 ef	5,70 ± 0,22 bc	2,332 ± 0,327 e
<b>E</b>	nd	1687 ± 150 ab	459,0 ± 65,7 ab	30,46 ± 1,90 bd	6,91 ± 0,49 ac	3,367 ± 0,134 cd
<b>Kt</b>	nd	1269 ± 75 c	331,8 ± 11,8 cde	34,20 ± 0,54 ab	5,82 ± 0,13 bc	4,367 ± 0,396 ab
<b>KtPF</b>	nd	1601 ± 24 ab	408,9 ± 31,2 bc	27,80 ± 1,89 cde	6,91 ± 0,46 ab	3,234 ± 0,146 cd
<b>KtA</b>	nd	1850 ± 171 a	532,7 ± 31,5 a	38,80 ± 2,38 a	5,85 ± 0,65 bc	3,709 ± 0,273 bc
<b>KtE</b>	nd	1627 ± 112 ab	416,0 ± 7,3 bc	34,27 ± 1,12 ab	7,42 ± 0,26 ac	4,591 ± 0,341 ab
<b>KtAE</b>	nd	1433 ± 171 bc	397,9 ± 19,2 bd	32,17 ± 2,34 bc	7,00 ± 0,43 ab	3,942 ± 0,430 bc
<b>KtAEPF</b>	nd	1757 ± 204 ab	532,6 ± 5,9 a	36,87 ± 2,76 ab	8,35 ± 0,30 a	5,061 ± 0,452 a

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 32.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	2-Metil-1-propanol			3-Metil-1-butanol			1-Pentanol			1-Heksanol			(Z)-3-Heksenol			2-Etil-1-heksanol								
<b>KT</b>																								
<b>0*</b>	nd			< LOQ			435,6	±	7,2	b	454	±	33	e	12,74	±	1,02	a	14,47	±	0,97	ab		
<b>Kt</b>	nd			< LOQ			155,0	±	24,8	e	981	±	13	b	7,61	±	0,53	cd	15,97	±	1,86	a		
<b>KtPF</b>	nd			< LOQ			167,7	±	11,3	e	843	±	76	bd	8,70	±	1,21	bd	10,03	±	0,52	c		
<b>KtA</b>	nd			< LOQ			546,5	±	22,3	a	1427	±	43	a	11,07	±	0,66	ab	12,74	±	0,48	bc		
<b>KtE</b>	nd			< LOQ			185,8	±	21,6	de	729	±	69	cd	6,60	±	0,86	d	11,87	±	1,54	bc		
<b>KtAE</b>	nd			< LOQ			227,2	±	15,4	cd	765	±	106	cd	7,02	±	0,61	cd	11,23	±	1,74	c		
<b>KtAEPF</b>	nd			< LOQ			247,0	±	9,3	c	863	±	69	bc	9,57	±	0,73	bc	10,06	±	0,30	c		
<b>T0</b>																								
<b>0*</b>	962	±	94	c	1975	±	127	c	509,6	±	29,7	b	3258	±	93	a	101,51	±	5,36	a	18,48	±	1,65	ab
<b>Kt</b>	1353	±	82	bc	2310	±	52	bc	614,6	±	30,7	ab	3418	±	200	a	79,23	±	4,76	b	19,89	±	0,91	a
<b>KtPF</b>	1531	±	138	ab	2513	±	147	bc	610,6	±	10,1	ab	4073	±	384	a	79,90	±	6,02	b	15,24	±	1,15	c
<b>KtA</b>	1394	±	142	abc	2097	±	246	c	670,4	±	35,5	a	3734	±	183	a	81,23	±	6,48	b	16,55	±	0,67	bc
<b>KtE</b>	1878	±	279	a	3193	±	388	a	667,4	±	15,4	a	3438	±	332	a	86,11	±	9,26	b	19,83	±	1,46	a
<b>KtAE</b>	1407	±	156	b	2837	±	210	ab	580,1	±	14,2	b	3665	±	269	a	86,89	±	7,32	ab	16,20	±	0,93	bc
<b>KtAEPF</b>	1368	±	65	bc	2610	±	272	bc	612,0	±	7,8	ab	3438	±	503	a	76,27	±	4,78	b	14,56	±	1,53	c
<b>TF</b>																								
<b>0</b>	5003	±	238	ac	6393	±	367	de	508,5	±	16,4	bc	3015	±	67	cde	92,71	±	2,43	bd	19,69	±	2,59	ab
<b>P</b>	3691	±	200	b	4020	±	710	f	633,6	±	44,1	ac	3872	±	276	ad	99,51	±	10,09	ab	7,15	±	0,96	d
<b>PF</b>	4646	±	507	ab	5085	±	712	ef	632,3	±	13,3	a	3818	±	351	ab	98,23	±	3,04	bc	9,01	±	0,64	d
<b>PG</b>	4428	±	541	bc	4347	±	797	f	662,6	±	16,0	a	3812	±	10	ac	99,27	±	4,22	ab	8,58	±	0,68	d
<b>E</b>	5596	±	281	a	6995	±	880	cd	613,2	±	50,3	ac	4510	±	309	a	120,92	±	3,18	a	14,88	±	1,22	c
<b>Kt</b>	5208	±	202	ac	8849	±	228	bc	579,2	±	10,2	ab	3137	±	321	de	72,43	±	3,55	e	20,20	±	1,70	a
<b>KtPF</b>	4826	±	413	ac	8391	±	594	bc	611,2	±	15,6	ac	4004	±	252	a	76,74	±	8,28	de	16,64	±	1,00	bc
<b>KtA</b>	4949	±	290	ac	6628	±	674	de	655,4	±	38,2	a	3772	±	266	ad	73,37	±	10,15	de	16,67	±	0,82	bc
<b>KtE</b>	4885	±	236	ac	12964	±	611	a	667,6	±	62,3	a	3280	±	190	bcde	74,13	±	8,06	de	21,03	±	1,29	a
<b>KtAE</b>	5380	±	172	a	8966	±	200	b	623,3	±	10,5	ac	3996	±	150	a	80,48	±	4,42	be	16,40	±	1,03	c
<b>KtAEPF</b>	5424	±	224	ac	9605	±	426	b	507,4	±	51,7	b	2834	±	200	e	81,11	±	11,96	cde	16,80	±	1,26	bc

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 32.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	2-Metil-1-propanol			3-Metil-1-butanol			1-Pentanol			1-Heksanol			(Z)-3-Heksenol			2-Etil-1-heksanol		
<b>KRUH</b>																		
<b>0</b>	2672	± 79	ab	3963	± 44	cde	178,9	± 13,0	ade	1528	± 174	ab	72,23	± 2,10	ab	18,57	± 1,70	a
<b>P</b>	1747	± 90	df	2417	± 442	ef	186,1	± 4,9	ac	1194	± 179	c	61,57	± 6,25	bc	5,70	± 0,54	e
<b>PF</b>	1398	± 88	f	1986	± 122	f	161,0	± 2,1	cd	1194	± 155	c	68,22	± 6,21	ab	6,60	± 0,91	e
<b>PG</b>	1508	± 136	ef	2275	± 393	f	158,8	± 8,7	de	1223	± 129	bc	66,04	± 7,52	ab	6,49	± 0,85	e
<b>E</b>	2372	± 201	bc	3584	± 209	eg	154,4	± 10,9	de	1415	± 118	ac	79,17	± 9,36	a	12,01	± 0,94	d
<b>Kt</b>	2945	± 39	a	5730	± 552	b	188,9	± 11,4	ab	1537	± 92	a	60,90	± 4,04	bc	16,85	± 1,01	ab
<b>KtPF</b>	2109	± 93	cd	4571	± 744	bdg	161,3	± 12,7	cd	1179	± 22	c	49,64	± 3,46	cd	12,70	± 1,16	cd
<b>KtA</b>	1885	± 120	de	3475	± 162	dfg	197,5	± 12,0	a	1367	± 121	ac	48,91	± 5,15	cd	13,80	± 0,31	cd
<b>KtE</b>	2524	± 228	abc	8646	± 327	a	197,6	± 17,0	ab	1278	± 84	ac	49,59	± 2,41	cd	19,54	± 0,98	a
<b>KtAE</b>	2629	± 114	abc	5485	± 870	bc	166,9	± 13,1	bce	1208	± 136	c	44,27	± 4,58	d	11,79	± 1,17	d
<b>KtAEPF</b>	2294	± 125	bcd	5118	± 670	bc	163,0	± 1,1	cd	1185	± 100	c	45,14	± 2,69	d	15,27	± 0,14	bc
<b>KORA</b>																		
<b>0</b>	1031	± 101	ab	1654	± 105	bc	91,3	± 2,2	bc	720	± 33	a	38,29	± 0,82	a	18,52	± 0,87	a
<b>P</b>	727	± 27	ef	1075	± 120	d	104,1	± 5,6	ab	611	± 45	acd	33,86	± 1,51	ab	5,52	± 0,87	f
<b>PF</b>	741	± 54	df	1047	± 62	d	105,1	± 3,5	ab	621	± 66	ad	36,54	± 3,35	a	5,55	± 0,11	f
<b>PG</b>	749	± 40	df	1172	± 159	cd	105,9	± 2,7	ab	646	± 77	ad	36,15	± 2,93	ab	6,22	± 1,07	f
<b>E</b>	904	± 40	ad	1394	± 89	cd	86,0	± 2,5	c	553	± 46	bd	31,18	± 3,10	bc	10,06	± 0,46	e
<b>Kt</b>	1075	± 57	a	2067	± 286	b	96,7	± 7,0	bc	605	± 55	acd	26,71	± 1,58	cf	15,52	± 0,69	b
<b>KtPF</b>	882	± 61	bcde	1980	± 18	b	93,9	± 8,5	bc	528	± 22	bd	26,33	± 1,50	ce	9,57	± 0,52	e
<b>KtA</b>	817	± 57	cd	1275	± 116	cd	99,5	± 3,4	ac	595	± 51	ab	26,93	± 1,57	cd	12,92	± 0,87	cd
<b>KtE</b>	935	± 17	ac	3234	± 289	a	118,5	± 6,2	a	541	± 37	bd	24,72	± 1,26	def	16,88	± 0,98	ab
<b>KtAE</b>	941	± 64	ac	2047	± 46	b	89,4	± 10,0	bc	498	± 44	bc	21,57	± 1,65	ef	11,28	± 1,09	de
<b>KtAEPF</b>	858	± 70	bcde	1842	± 86	b	102,3	± 6,8	b	478	± 29	b	20,45	± 1,94	f	14,24	± 0,24	bc

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 32.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	1-Heptanol			1-Oktanol			(E)-2-Okten-1-ol			1-Okten-3-ol			(Z)-3-Nonen-1-ol			Fenilmetanol			2-Feniletanol		
<b>KT</b>																					
<b>0*</b>	23,5	± 1,6	d	34,4	± 2,2	bc	19,35	± 3,52	b	126,7	± 4,9	a	1,83	± 0,03	c	80,8	± 3,0	c	12,7	± 0,4	b
<b>Kt</b>	24,8	± 2,3	d	37,8	± 0,9	bc	12,82	± 0,86	cd	43,2	± 2,2	c	3,14	± 0,16	b	85,8	± 5,8	c	26,8	± 2,2	a
<b>KtPF</b>	28,8	± 2,5	cd	30,3	± 0,8	c	15,69	± 2,29	bc	18,2	± 1,2	e	1,25	± 0,16	cd	80,5	± 13,0	c	24,2	± 3,2	a
<b>KtA</b>	104,9	± 7,7	a	68,9	± 6,6	a	31,24	± 0,51	a	82,1	± 4,7	b	4,55	± 0,15	a	107,5	± 3,6	bc	27,7	± 3,7	a
<b>KtE</b>	37,0	± 4,8	bc	32,0	± 3,8	c	10,14	± 1,18	d	28,3	± 3,7	de	1,24	± 0,13	d	138,1	± 7,1	b	23,6	± 1,9	a
<b>KtAE</b>	37,3	± 5,1	bc	39,5	± 2,4	b	12,65	± 1,02	cd	36,6	± 3,6	cd	1,55	± 0,31	cd	179,0	± 16,3	a	23,4	± 2,7	a
<b>KtAEPF</b>	39,5	± 2,2	b	39,1	± 2,7	bc	12,64	± 1,91	cd	36,7	± 2,7	cd	1,52	± 0,21	cd	122,0	± 9,4	b	23,8	± 2,5	a
<b>T0</b>																					
<b>0*</b>	288,7	± 28,1	b	70,1	± 6,0	b	45,41	± 2,62	ab	124,9	± 1,3	b	3,82	± 0,49	c	606,5	± 50,7	c	205,4	± 19,3	a
<b>Kt</b>	343,3	± 22,4	ab	97,3	± 9,4	a	57,13	± 4,92	ab	169,9	± 4,6	ab	4,71	± 0,28	bc	643,5	± 52,6	c	222,3	± 12,5	a
<b>KtPF</b>	322,7	± 13,2	ab	93,3	± 5,6	a	59,06	± 2,59	a	159,2	± 11,0	ab	5,96	± 0,49	a	700,7	± 70,7	bc	205,7	± 4,4	a
<b>KtA</b>	332,9	± 30,8	ab	91,3	± 1,7	a	59,27	± 2,07	a	150,6	± 17,9	ab	5,63	± 0,53	ab	634,4	± 71,4	c	169,0	± 12,2	b
<b>KtE</b>	350,2	± 15,2	a	96,2	± 13,4	a	50,63	± 4,13	ab	171,8	± 7,3	ab	6,20	± 0,59	a	837,0	± 65,2	ab	231,0	± 11,9	a
<b>KtAE</b>	337,9	± 14,0	ab	92,7	± 9,0	a	52,87	± 6,88	ab	167,5	± 11,5	a	6,75	± 0,50	a	864,6	± 15,9	a	231,0	± 8,2	a
<b>KtAEPF</b>	287,1	± 25,3	b	78,3	± 9,1	ab	44,29	± 6,99	b	143,9	± 20,5	ab	6,05	± 0,81	ab	678,1	± 62,3	bc	202,3	± 3,2	ab
<b>TF</b>																					
<b>0</b>	343,6	± 7,9	ac	94,0	± 2,0	ac	40,46	± 3,38	bcd	140,4	± 4,7	bcde	5,81	± 0,94	bd	761,4	± 25,4	b	485,9	± 52,3	ac
<b>P</b>	256,1	± 29,5	c	72,3	± 9,4	bc	40,85	± 1,75	bcd	99,6	± 4,6	f	5,25	± 0,39	cd	360,1	± 15,5	c	275,7	± 15,0	fg
<b>PF</b>	273,1	± 14,8	c	73,7	± 2,4	c	43,20	± 4,52	bcd	121,6	± 18,4	ef	5,37	± 0,47	cd	415,8	± 39,5	c	358,3	± 57,0	def
<b>PG</b>	262,2	± 18,9	bc	73,8	± 6,0	bc	39,64	± 5,22	cd	134,6	± 4,1	cdf	5,78	± 0,59	bd	467,2	± 58,6	c	378,5	± 57,1	cf
<b>E</b>	347,4	± 14,6	ab	99,4	± 7,0	ab	59,54	± 3,30	a	160,4	± 22,6	ad	8,98	± 0,44	a	791,6	± 53,9	ab	589,3	± 10,4	a
<b>Kt</b>	360,9	± 31,5	a	115,7	± 13,0	a	45,60	± 2,64	bcd	174,7	± 12,4	ab	6,97	± 0,87	bc	798,0	± 25,2	ab	444,9	± 46,7	bcd
<b>KtPF</b>	357,9	± 28,8	a	121,6	± 13,9	a	48,01	± 4,19	ad	157,4	± 7,2	bcd	9,31	± 0,52	a	846,6	± 64,5	ab	470,6	± 38,5	ac
<b>KtA</b>	349,8	± 28,5	a	104,8	± 7,5	a	44,87	± 7,58	bcd	147,7	± 0,6	bcde	7,56	± 0,47	ab	755,9	± 88,3	b	332,6	± 6,6	eg
<b>KtE</b>	380,0	± 11,7	a	126,2	± 7,9	a	52,53	± 2,37	ac	190,6	± 6,6	a	9,42	± 0,59	a	986,5	± 75,0	a	554,4	± 63,1	ab
<b>KtAE</b>	358,9	± 47,5	a	121,1	± 11,1	a	52,56	± 5,92	ab	156,8	± 5,2	bcd	9,55	± 0,54	a	892,5	± 79,5	ab	417,6	± 31,6	ce
<b>KtAEPF</b>	317,7	± 21,1	ac	102,8	± 5,0	a	37,62	± 3,17	d	172,9	± 8,0	ac	8,58	± 0,36	a	880,1	± 67,8	ab	472,3	± 30,9	ac

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 32.** Koncentracija alkohola ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	1-Heptanol			1-Oktanol			<i>(E)</i> -2-Okten-1-ol			1-Okten-3-ol			<i>(Z)</i> -3-Nonen-1-ol			Fenilmetanol			2-Feniletanol		
<b>KRUH</b>																					
<b>0</b>	148,7	± 2,9	b	32,0	± 3,3	bc	7,56	± 0,61	c	49,2	± 4,9	bc	3,66	± 0,25	bcd	921,7	± 2,2	a	395,3	± 4,2	ab
<b>P</b>	83,5	± 2,8	e	20,0	± 1,6	e	5,58	± 0,18	d	28,8	± 1,7	d	2,97	± 0,17	de	299,1	± 20,1	d	215,0	± 10,9	f
<b>PF</b>	85,9	± 6,8	e	21,8	± 1,9	de	6,07	± 0,74	d	33,1	± 3,4	d	2,99	± 0,23	de	385,8	± 31,1	d	280,3	± 6,9	def
<b>PG</b>	67,7	± 6,0	e	16,5	± 2,4	e	5,67	± 0,60	d	28,3	± 2,9	d	2,93	± 0,38	e	356,7	± 32,9	d	239,9	± 14,4	f
<b>E</b>	122,1	± 6,8	cd	29,8	± 1,9	bc	8,14	± 0,46	bc	48,2	± 2,9	bc	4,31	± 0,18	ac	693,7	± 64,7	c	433,1	± 40,0	a
<b>Kt</b>	178,9	± 13,4	a	41,3	± 1,5	a	10,36	± 0,35	a	59,0	± 5,6	a	4,08	± 0,28	ac	734,1	± 55,1	bc	365,0	± 5,9	ac
<b>KtPF</b>	107,3	± 0,9	d	27,2	± 1,6	cd	7,74	± 0,45	c	43,9	± 0,6	c	3,61	± 0,33	ce	673,6	± 9,6	c	322,3	± 30,2	ce
<b>KtA</b>	139,1	± 3,2	bc	35,1	± 1,6	b	8,59	± 0,42	bc	46,4	± 1,3	c	3,85	± 0,20	ac	667,3	± 10,4	c	273,9	± 3,7	ef
<b>KtE</b>	113,3	± 7,9	d	32,6	± 0,8	bc	9,95	± 0,27	ab	48,1	± 4,2	bc	4,42	± 0,23	ac	853,2	± 13,3	a	340,8	± 37,1	bcd
<b>KtAE</b>	118,9	± 4,2	cd	27,4	± 1,2	cd	7,85	± 0,43	c	46,5	± 2,0	c	4,35	± 0,36	ab	653,0	± 7,3	c	288,7	± 6,8	def
<b>KtAEPF</b>	130,6	± 5,1	c	34,9	± 0,3	b	9,75	± 0,54	ab	56,5	± 1,5	ab	4,63	± 0,23	a	846,5	± 9,9	ab	377,4	± 18,4	ac
<b>KORA</b>																					
<b>0</b>	59,6	± 1,2	ab	19,1	± 0,7	bcd	5,55	± 0,53	cde	26,1	± 2,3	c	1,98	± 0,07	bc	1585,0	± 51,5	a	276,1	± 18,1	ab
<b>P</b>	32,2	± 1,7	ef	12,5	± 1,1	gh	4,41	± 0,18	ef	18,3	± 0,3	d	1,93	± 0,13	bc	372,0	± 37,6	e	197,1	± 12,8	def
<b>PF</b>	34,9	± 1,8	ef	13,3	± 1,3	gh	4,76	± 0,18	df	20,7	± 1,6	d	1,68	± 0,08	c	396,1	± 13,2	e	230,8	± 16,9	ce
<b>PG</b>	27,7	± 1,5	f	11,4	± 0,6	gh	4,48	± 0,07	df	18,3	± 0,4	d	1,70	± 0,09	bc	423,8	± 52,3	e	199,1	± 22,4	def
<b>E</b>	38,1	± 4,0	df	13,9	± 0,9	efh	5,51	± 0,44	bef	25,0	± 1,1	cd	1,92	± 0,04	bc	743,7	± 81,7	cd	308,7	± 10,7	a
<b>Kt</b>	67,9	± 2,2	a	24,4	± 0,8	a	6,63	± 0,58	ab	28,8	± 1,6	bc	2,11	± 0,11	b	1113,0	± 120,3	b	271,2	± 12,7	ac
<b>KtPF</b>	39,9	± 1,2	de	15,3	± 1,5	dfg	5,34	± 0,44	cde	25,9	± 0,5	c	1,89	± 0,19	bc	646,0	± 51,3	d	227,2	± 19,8	cef
<b>KtA</b>	53,4	± 1,4	bc	18,8	± 1,7	bcefg	5,67	± 0,34	bd	26,2	± 3,2	c	2,04	± 0,21	bc	739,0	± 74,9	cd	175,7	± 8,8	f
<b>KtE</b>	50,1	± 3,1	bc	21,7	± 0,6	ac	7,26	± 0,10	a	31,5	± 1,7	ab	2,98	± 0,18	a	1014,9	± 32,2	b	257,6	± 11,4	ac
<b>KtAE</b>	47,4	± 4,0	cd	17,9	± 1,9	cf	5,86	± 0,48	bc	29,5	± 2,3	bc	2,59	± 0,27	a	795,4	± 17,8	cd	240,1	± 23,3	bcd
<b>KtAEPF</b>	54,0	± 5,0	bc	22,1	± 1,9	ab	7,10	± 0,14	a	34,8	± 2,3	a	2,69	± 0,09	a	933,6	± 83,4	bc	281,0	± 6,4	ab

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin



**Tablica 33.** Koncentracija kiselina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	2-Metilbutanska kiselina			Pentanska kiselina			Heksanska kiselina			Heptanska kiselina			Oktanska kiselina			Dekanska kiselina			Benzojeva kiselina									
<b>KT</b>																												
<b>0*</b>	206	±	13	c	nd	c	6743	±	806	c	714	±	56	b	99,4	±	11,2	c	179	±	15	c	1719	±	63	b		
<b>Kt</b>	1550	±	157	a	3850	±	260	ab	21739	±	1698	ab	1773	±	43	a	432,5	±	20,4	a	423	±	47	bc	1795	±	229	b
<b>KtPF</b>	1130	±	50	b	3445	±	445	b	17679	±	1848	b	1664	±	158	a	319,3	±	26,9	b	352	±	36	c	1984	±	193	ab
<b>KtA</b>	1341	±	25	ab	3927	±	65	ab	22618	±	1378	ab	1773	±	34	a	478,6	±	37,2	a	587	±	69	ab	1788	±	208	b
<b>KtE</b>	1455	±	164	a	4315	±	429	a	24078	±	2325	a	1937	±	60	a	412,0	±	22,4	a	748	±	75	a	2114	±	134	ab
<b>KtAE</b>	1605	±	204	a	3912	±	167	ab	23706	±	1817	a	1870	±	119	a	466,5	±	33,9	a	675	±	39	a	2438	±	275	a
<b>KtAEPF</b>	1268	±	12	ab	4039	±	381	ab	22850	±	1748	ab	1918	±	199	a	466,8	±	19,1	a	770	±	32	a	1964	±	127	ab
<b>T0</b>																												
<b>0*</b>	235	±	15	c	nd	2933	±	235	d	255	±	23	c	77,6	±	13,0	d	233	±	24	e	1467	±	91	ab			
<b>Kt</b>	301	±	30	c	nd	4162	±	143	bc	501	±	68	b	125,0	±	5,5	bc	345	±	22	cd	1074	±	166	c			
<b>KtPF</b>	339	±	15	bc	nd	3721	±	241	c	506	±	64	b	103,6	±	9,1	cd	350	±	50	c	1480	±	81	ab			
<b>KtA</b>	261	±	27	c	nd	3105	±	233	d	324	±	46	c	74,8	±	7,3	d	271	±	10	de	1206	±	94	bc			
<b>KtE</b>	521	±	67	a	nd	5141	±	124	a	830	±	129	a	207,8	±	11,6	a	638	±	29	a	1303	±	84	ac			
<b>KtAE</b>	435	±	65	ab	nd	4537	±	161	b	684	±	47	ab	152,0	±	13,6	b	502	±	32	b	1549	±	98	a			
<b>KtAEPF</b>	333	±	25	c	nd	3752	±	117	c	536	±	31	b	114,1	±	11,4	c	421	±	21	c	993	±	35	c			
<b>TF</b>																												
<b>0</b>	253	±	19	de	nd	2981	±	112	f	305	±	32	d	112,7	±	8,5	d	583	±	51	de	1471	±	79	ac			
<b>P</b>	250	±	23	e	nd	3288	±	169	ef	329	±	23	d	97,0	±	9,8	d	405	±	42	e	1485	±	102	ac			
<b>PF</b>	249	±	29	e	nd	3230	±	359	ef	320	±	38	d	111,6	±	18,9	d	502	±	41	e	1268	±	48	bcd			
<b>PG</b>	269	±	6	de	nd	3737	±	277	def	375	±	32	d	134,4	±	17,2	d	608	±	65	de	1584	±	136	a			
<b>E</b>	308	±	46	de	nd	3436	±	479	ef	418	±	32	cd	166,3	±	26,9	cd	833	±	76	cd	1161	±	70	ce			
<b>Kt</b>	438	±	20	bc	nd	5313	±	170	bc	724	±	36	b	289,6	±	33,9	b	1078	±	40	b	1123	±	84	de			
<b>KtPF</b>	513	±	56	b	nd	5002	±	248	cd	783	±	69	b	265,7	±	34,9	b	1017	±	55	bc	1350	±	35	ade			
<b>KtA</b>	360	±	13	cd	nd	4117	±	452	ce	554	±	57	c	192,8	±	13,1	c	753	±	78	d	1321	±	127	ade			
<b>KtE</b>	741	±	17	a	nd	7902	±	664	a	1101	±	116	a	409,3	±	19,3	a	1563	±	79	a	1517	±	59	ab			
<b>KtAE</b>	669	±	70	a	nd	6605	±	647	ab	1118	±	85	a	379,9	±	26,7	a	1494	±	119	a	1346	±	65	ade			
<b>KtAEPF</b>	684	±	51	a	nd	7378	±	582	a	1169	±	138	a	435,3	±	33,0	a	1650	±	158	a	1260	±	121	bcd			

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 33.** Koncentracija kiselina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	2-Metilbutanska kiselina				Pentanska kiselina				Heksanska kiselina				Heptanska kiselina				Oktanska kiselina				Dekanska kiselina				Benzojeva kiselina			
<b>KRUH</b>																												
<b>0</b>	300	±	7	d	nd	2597	±	149	d	300	±	42	d	135,6	±	10,4	de	292	±	24	eg	1016	±	104	a			
<b>P</b>	257	±	11	d	nd	2393	±	62	d	262	±	19	d	88,0	±	3,3	ef	185	±	2	h	1093	±	92	a			
<b>PF</b>	246	±	17	d	nd	2352	±	301	d	288	±	39	d	103,7	±	13,7	ef	270	±	17	fgh	1091	±	81	a			
<b>PG</b>	251	±	26	d	nd	2308	±	71	d	258	±	25	d	86,6	±	6,1	f	208	±	25	gh	1069	±	98	a			
<b>E</b>	299	±	44	d	nd	2450	±	322	d	275	±	88	d	167,5	±	17,4	cd	346	±	62	def	716	±	85	bc			
<b>Kt</b>	482	±	39	c	nd	3698	±	212	c	604	±	54	c	237,8	±	16,5	b	451	±	22	c	766	±	88	cd			
<b>KtPF</b>	452	±	31	c	nd	3462	±	279	c	565	±	80	c	179,9	±	3,7	c	379	±	13	ce	897	±	24	ac			
<b>KtA</b>	443	±	48	c	nd	3331	±	153	c	514	±	54	c	191,5	±	14,6	c	337	±	16	ef	995	±	101	abd			
<b>KtE</b>	632	±	26	b	nd	4526	±	497	b	770	±	120	b	257,4	±	13,8	b	426	±	16	cd	1017	±	88	a			
<b>KtAE</b>	641	±	35	b	nd	4344	±	351	bc	764	±	62	b	271,0	±	25,5	b	592	±	43	b	940	±	37	ac			
<b>KtAEPF</b>	844	±	5	a	nd	5727	±	538	a	1170	±	52	a	373,5	±	40,0	a	721	±	12	a	1149	±	9	a			
<b>KORA</b>																												
<b>0</b>	334	±	26	dg	nd	2721	±	260	ef	333	±	19	ef	129,6	±	5,6	cd	273	±	15	eg	1084	±	49	ac			
<b>P</b>	326	±	59	dg	nd	2704	±	319	ef	362	±	48	ef	113,5	±	8,8	ce	241	±	19	eg	1055	±	124	bc			
<b>PF</b>	254	±	33	eg	nd	2529	±	108	f	300	±	26	f	98,2	±	10,6	de	213	±	31	fg	1047	±	59	ac			
<b>PG</b>	281	±	23	efg	nd	2491	±	97	f	285	±	26	f	85,9	±	7,7	e	173	±	28	fg	1058	±	14	ac			
<b>E</b>	312	±	10	dg	nd	2618	±	419	ef	316	±	8	f	116,2	±	3,0	ce	294	±	27	def	802	±	87	c			
<b>Kt</b>	439	±	54	df	nd	3951	±	240	cd	720	±	19	bc	232,9	±	36,0	b	470	±	66	bc	992	±	99	bc			
<b>KtPF</b>	441	±	40	bd	nd	3566	±	144	d	598	±	19	cd	205,2	±	14,7	b	367	±	17	ce	863	±	29	c			
<b>KtA</b>	413	±	42	cde	nd	3304	±	195	de	468	±	35	de	149,5	±	2,8	c	258	±	12	eg	1153	±	86	ab			
<b>KtE</b>	613	±	45	bcf	nd	4826	±	238	b	833	±	85	b	246,3	±	13,3	b	386	±	63	cd	1223	±	111	ab			
<b>KtAE</b>	595	±	91	bf	nd	4531	±	168	bc	793	±	24	b	248,6	±	13,5	b	540	±	21	b	1156	±	87	ab			
<b>KtAEPF</b>	898	±	57	a	nd	6635	±	75	a	1399	±	75	a	409,5	±	34,0	a	829	±	60	a	1302	±	44	a			

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 34.** Koncentracija estera ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	Etil-heksanoat			Etil-oktanoat			Etil-tetradekanoat			Etil-heksadekanoat			Etil-benzoat							
<b>KT</b>																				
<b>0*</b>	0,352	±	0,037	d	0,346	±	0,046	bc	nd	c	2,06	±	0,37	c	0,388	±	0,009	b		
<b>Kt</b>	0,665	±	0,020	a	0,388	±	0,002	ab	39,5	±	2,8	a	6,07	±	0,80	b	0,784	±	0,039	a
<b>KtPF</b>	0,381	±	0,022	d	0,300	±	0,007	c	16,3	±	1,9	b	6,65	±	0,41	b	0,411	±	0,033	b
<b>KtA</b>	0,613	±	0,079	ab	0,425	±	0,010	a	32,3	±	6,1	a	11,80	±	1,76	a	0,774	±	0,013	a
<b>KtE</b>	0,445	±	0,020	cd	0,312	±	0,015	c	35,6	±	7,1	a	8,20	±	1,18	b	0,501	±	0,059	b
<b>KtAE</b>	0,510	±	0,053	bc	0,319	±	0,020	c	33,2	±	6,0	a	8,46	±	0,40	b	0,537	±	0,092	b
<b>KtAEPF</b>	0,415	±	0,051	cd	0,306	±	0,014	c	17,8	±	3,4	b	5,56	±	0,24	b	0,433	±	0,051	b
<b>T0</b>																				
<b>0*</b>	0,627	±	0,057	cd	0,868	±	0,107	bc	nd	f	2,26	±	0,28	b	0,601	±	0,030	c		
<b>Kt</b>	0,683	±	0,006	cd	1,160	±	0,056	b	16,5	±	4,9	bc	4,04	±	0,41	a	0,991	±	0,058	a
<b>KtPF</b>	0,738	±	0,042	bc	1,158	±	0,138	b	30,9	±	6,1	ab	3,61	±	0,21	a	0,736	±	0,113	bc
<b>KtA</b>	0,480	±	0,022	ef	0,687	±	0,054	c	15,6	±	2,2	cd	3,65	±	0,08	a	0,612	±	0,018	c
<b>KtE</b>	1,055	±	0,072	a	1,881	±	0,186	a	18,2	±	1,8	bce	3,35	±	0,51	a	0,865	±	0,111	ab
<b>KtAE</b>	0,572	±	0,046	de	0,819	±	0,095	c	13,8	±	2,3	def	4,21	±	0,38	a	0,838	±	0,075	ab
<b>KtAEPF</b>	0,456	±	0,034	f	0,701	±	0,073	c	36,1	±	4,3	a	3,64	±	0,38	a	0,600	±	0,062	c
<b>TF</b>																				
<b>0</b>	1,757	±	0,115	ce	4,187	±	0,108	cf	31,9	±	7,3	e	3,95	±	0,12	de	1,332	±	0,051	cd
<b>P</b>	1,592	±	0,304	de	3,365	±	0,455	ef	32,8	±	5,0	de	2,56	±	0,20	e	1,097	±	0,063	d
<b>PF</b>	2,469	±	0,035	bcd	5,014	±	0,109	bce	40,9	±	8,5	ce	3,82	±	0,52	de	1,191	±	0,151	d
<b>PG</b>	2,457	±	0,391	bcd	5,120	±	0,629	bce	37,9	±	3,2	ce	3,78	±	0,45	de	1,440	±	0,055	cd
<b>E</b>	3,215	±	0,554	abd	7,132	±	0,678	ac	68,3	±	3,0	ac	7,12	±	0,33	ac	2,053	±	0,148	ab
<b>Kt</b>	2,802	±	0,322	ade	6,068	±	0,902	bce	46,5	±	6,5	ce	6,51	±	0,66	bc	1,550	±	0,176	c
<b>KtPF</b>	2,741	±	0,430	ade	6,840	±	0,875	ac	63,0	±	13,0	bc	5,88	±	0,99	bcd	1,610	±	0,158	c
<b>KtA</b>	1,785	±	0,340	ce	4,256	±	0,500	def	41,3	±	7,7	ce	5,07	±	0,69	cd	1,460	±	0,120	cd
<b>KtE</b>	3,895	±	0,220	a	9,762	±	1,506	a	77,5	±	10,6	ab	7,91	±	0,28	ab	2,226	±	0,236	a
<b>KtAE</b>	2,200	±	0,421	bcd	6,417	±	1,183	bcd	58,0	±	7,5	bcd	6,61	±	1,07	bc	1,628	±	0,111	bc
<b>KtAEPF</b>	2,964	±	0,272	ac	7,860	±	0,398	ab	88,0	±	11,6	a	8,89	±	1,08	a	1,722	±	0,115	bc

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 34.** Koncentracija estera ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	Etil-heksanoat			Etil-oktanoat			Etil-tetradekanoat			Etil-heksadekanoat			Etil-benzoat							
<b>KRUH</b>																				
<b>0</b>	0,542	±	0,041	cd	1,250	±	0,118	de	45,7	±	2,6	f	6,55	±	0,35	cd	0,836	±	0,135	bcd
<b>P</b>	0,369	±	0,018	ef	1,138	±	0,171	de	32,2	±	2,7	f	2,12	±	0,37	d	0,562	±	0,034	ef
<b>PF</b>	0,383	±	0,038	ef	1,260	±	0,053	de	55,1	±	3,7	ef	5,04	±	0,05	d	0,693	±	0,060	de
<b>PG</b>	0,355	±	0,015	f	0,918	±	0,039	e	40,6	±	5,4	f	3,83	±	0,49	d	0,590	±	0,037	e
<b>E</b>	0,490	±	0,055	de	1,707	±	0,151	cd	90,2	±	7,4	bd	11,15	±	0,79	b	0,954	±	0,073	ac
<b>Kt</b>	0,625	±	0,026	ac	1,859	±	0,104	c	72,0	±	6,1	de	11,55	±	1,12	b	0,953	±	0,077	ac
<b>KtPF</b>	0,531	±	0,045	cd	1,929	±	0,156	c	79,0	±	11,3	de	9,24	±	0,40	bc	0,804	±	0,025	ce
<b>KtA</b>	0,553	±	0,041	bcd	2,045	±	0,217	c	84,1	±	11,4	cde	9,39	±	0,52	b	0,824	±	0,035	bcd
<b>KtE</b>	0,621	±	0,063	ac	2,166	±	0,168	bc	123,2	±	4,7	ab	16,73	±	0,30	a	1,013	±	0,028	ab
<b>KtAE</b>	0,651	±	0,074	ab	2,541	±	0,293	ab	106,8	±	14,1	bc	14,37	±	1,52	a	0,853	±	0,020	bcd
<b>KtAEPF</b>	0,704	±	0,004	a	2,933	±	0,119	a	135,0	±	14,2	a	16,69	±	1,46	a	1,056	±	0,020	a
<b>KORA</b>																				
<b>0</b>	0,426	±	0,010	bc	0,757	±	0,027	bd	43,0	±	2,0	d	5,83	±	0,65	ef	0,457	±	0,036	cd
<b>P</b>	0,304	±	0,033	e	0,742	±	0,097	cd	41,7	±	7,1	d	3,94	±	0,69	f	0,403	±	0,068	d
<b>PF</b>	0,312	±	0,016	e	0,815	±	0,047	cd	64,7	±	6,0	cd	5,96	±	0,84	ef	0,433	±	0,026	d
<b>PG</b>	0,299	±	0,017	e	0,697	±	0,097	d	46,8	±	3,7	cd	4,23	±	0,21	f	0,423	±	0,029	d
<b>E</b>	0,341	±	0,037	de	0,887	±	0,099	bd	78,0	±	8,7	bc	10,06	±	0,84	cd	0,492	±	0,036	cd
<b>Kt</b>	0,440	±	0,016	b	1,082	±	0,149	bc	57,0	±	4,0	cd	11,30	±	0,35	bcd	0,559	±	0,037	bc
<b>KtPF</b>	0,380	±	0,009	cd	1,149	±	0,137	b	72,9	±	11,0	bc	9,30	±	1,13	d	0,455	±	0,015	cd
<b>KtA</b>	0,380	±	0,025	cd	1,093	±	0,059	bd	68,5	±	13,1	bd	8,94	±	0,35	de	0,477	±	0,036	cd
<b>KtE</b>	0,463	±	0,014	ab	1,510	±	0,089	a	115,5	±	10,5	a	15,74	±	1,09	a	0,708	±	0,028	a
<b>KtAE</b>	0,459	±	0,034	ab	1,632	±	0,220	a	99,9	±	7,3	ab	13,61	±	2,39	ac	0,563	±	0,038	bc
<b>KtAEPF</b>	0,504	±	0,020	a	1,820	±	0,215	a	119,7	±	16,3	a	14,73	±	1,09	ab	0,661	±	0,096	ab

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 35.** Koncentracija aromatskih ugljikovodika, fenola i sumpornih spojeva ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	Stiren			Toluen			Fenol			2-Metoksi-4-vinilfenol			Dimetil-disulfid							
<b>KT</b>																				
<b>0*</b>	14,03	±	0,40	a	10,41	±	1,52	a	51,8	±	5,1	d	52,7	±	8,0	d	10,43	±	1,21	cd
<b>Kt</b>	13,53	±	0,31	a	8,28	±	0,24	ab	430,4	±	13,6	c	15295,1	±	1371,8	bc	9,81	±	0,68	cde
<b>KtPF</b>	8,20	±	1,14	b	7,74	±	1,14	ab	553,4	±	52,3	b	14988,0	±	1950,8	b	6,02	±	0,35	e
<b>KtA</b>	9,55	±	1,00	b	9,06	±	0,83	ab	586,3	±	33,1	b	8372,8	±	151,8	c	14,97	±	1,34	ab
<b>KtE</b>	9,09	±	0,80	b	7,61	±	0,66	b	535,1	±	29,3	bc	19871,9	±	1912,6	ab	7,03	±	0,10	de
<b>KtAE</b>	8,86	±	0,61	b	7,74	±	1,49	b	629,0	±	26,7	ab	25784,2	±	2138,2	a	16,78	±	1,52	a
<b>KtAEPF</b>	10,07	±	0,94	b	8,15	±	0,92	ab	735,5	±	59,1	a	25187,7	±	2808,8	a	11,19	±	0,81	bc
<b>T0</b>																				
<b>0*</b>	28,66	±	1,48	b	11,55	±	1,38	a	51,8	±	3,1	e	32,3	±	6,1	c	10,85	±	0,75	b
<b>Kt</b>	43,89	±	1,32	a	9,40	±	0,35	ab	71,1	±	2,9	d	98,9	±	7,1	c	10,41	±	1,58	b
<b>KtPF</b>	46,70	±	6,87	a	11,35	±	0,41	ab	90,6	±	7,0	bc	210,5	±	19,8	b	15,41	±	0,43	a
<b>KtA</b>	24,10	±	1,71	b	10,66	±	1,09	ab	86,1	±	4,2	c	197,3	±	3,0	b	9,84	±	1,19	b
<b>KtE</b>	47,57	±	5,63	a	10,40	±	1,11	ab	94,2	±	3,6	ac	208,5	±	31,1	b	15,59	±	2,07	a
<b>KtAE</b>	54,30	±	6,90	a	10,07	±	0,32	ab	105,3	±	3,5	a	360,3	±	47,2	a	15,05	±	0,44	a
<b>KtAEPF</b>	53,85	±	5,10	a	9,41	±	0,72	b	99,8	±	0,8	ab	424,7	±	26,0	a	10,25	±	1,47	b
<b>TF</b>																				
<b>0</b>	65,15	±	9,11	de	10,85	±	0,40	ab	51,5	±	2,6	c	19,2	±	3,2	f	12,31	±	1,05	bc
<b>P</b>	31,06	±	1,46	f	8,16	±	1,06	ab	49,9	±	5,4	c	11,9	±	0,1	f	6,57	±	0,97	d
<b>PF</b>	43,71	±	2,54	ef	8,52	±	0,86	ab	49,4	±	1,5	c	27,1	±	6,2	f	9,01	±	0,58	cd
<b>PG</b>	40,66	±	1,66	ef	8,49	±	1,43	b	52,8	±	2,1	c	31,7	±	4,8	f	9,60	±	1,41	cd
<b>E</b>	77,81	±	2,92	cd	10,18	±	0,54	ab	55,0	±	5,3	c	54,4	±	1,2	ef	20,74	±	2,09	a
<b>Kt</b>	92,00	±	13,38	bc	10,15	±	1,57	ab	84,8	±	3,4	ab	154,4	±	17,4	bc	12,43	±	1,36	bc
<b>KtPF</b>	115,39	±	2,53	ab	11,17	±	0,99	ab	87,4	±	6,6	ab	134,1	±	16,4	cd	10,91	±	0,14	bd
<b>KtA</b>	64,35	±	6,20	de	11,21	±	1,59	a	83,9	±	13,3	b	91,8	±	7,1	de	10,69	±	1,18	bd
<b>KtE</b>	132,98	±	10,55	a	9,88	±	0,33	ab	105,4	±	10,8	ab	157,4	±	16,3	bc	15,37	±	3,11	b
<b>KtAE</b>	126,06	±	6,87	a	10,70	±	1,03	ab	95,0	±	5,3	ab	206,0	±	15,5	a	12,76	±	2,09	bc
<b>KtAEPF</b>	138,80	±	2,81	a	10,13	±	0,98	ab	101,3	±	2,8	ab	197,2	±	14,3	ab	11,91	±	1,97	bd

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

\*Koncentracija analiziranih spojeva u uzorku 0 smatrana koncentracijom u uzorcima P, PF, PG i E

**Tablica 35.** Koncentracija aromatskih ugljikovodika, fenola i sumpornih spojeva ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kiselog tijesta (KT), krušnog tijesta prije (T0) i nakon (TF) fermentacije, kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	Stiren			Toluen			Fenol			2-Metoksi-4-vinilfenol			Dimetil-disulfid							
<b>KRUH</b>																				
<b>0</b>	17,92	±	1,78	c	5,99	±	0,05	a	57,1	±	2,3	d	395,0	±	17,8	ef	20,22	±	1,67	bc
<b>P</b>	7,31	±	1,17	de	2,86	±	0,55	ce	48,9	±	2,5	d	146,1	±	19,1	f	9,98	±	0,65	e
<b>PF</b>	8,81	±	1,75	de	2,71	±	0,24	de	52,7	±	1,9	d	272,8	±	22,0	ef	16,13	±	1,61	d
<b>PG</b>	6,54	±	0,25	e	1,83	±	0,22	e	51,5	±	1,8	d	215,5	±	39,3	f	19,11	±	1,30	bd
<b>E</b>	12,17	±	1,38	d	3,86	±	0,68	bcd	56,1	±	2,9	d	471,7	±	73,3	e	21,12	±	0,57	b
<b>Kt</b>	25,10	±	1,05	b	5,18	±	0,42	a	89,5	±	5,2	bc	1194,4	±	77,7	b	17,30	±	0,58	bd
<b>KtPF</b>	17,48	±	0,78	c	5,74	±	0,61	a	92,4	±	7,5	b	859,6	±	148,9	cd	9,15	±	0,54	e
<b>KtA</b>	19,63	±	2,85	c	4,31	±	0,30	ac	92,9	±	4,4	b	696,1	±	54,9	d	20,21	±	1,82	bd
<b>KtE</b>	23,14	±	1,75	bc	4,81	±	0,46	ab	76,6	±	4,0	c	941,4	±	63,5	c	16,38	±	1,20	cd
<b>KtAE</b>	25,02	±	2,26	b	5,08	±	0,44	ab	98,1	±	11,5	b	1455,5	±	36,6	a	21,44	±	1,00	b
<b>KtAEPF</b>	30,24	±	2,37	a	4,91	±	0,76	ab	113,6	±	9,5	a	1525,4	±	24,3	a	27,54	±	0,95	a
<b>KORA</b>																				
<b>0</b>	11,63	±	1,29	de	5,13	±	0,24	bc	72,2	±	1,3	eg	809,9	±	76,6	fg	61,53	±	5,25	cde
<b>P</b>	6,06	±	1,21	f	2,78	±	0,25	d	55,6	±	4,3	h	436,5	±	24,5	h	37,05	±	6,02	df
<b>PF</b>	6,74	±	1,04	f	4,24	±	0,36	cd	58,4	±	2,1	gh	584,3	±	55,0	gh	39,51	±	4,94	df
<b>PG</b>	5,97	±	0,88	f	3,15	±	0,42	d	58,3	±	1,4	h	479,2	±	83,8	h	45,12	±	8,79	df
<b>E</b>	9,23	±	0,05	ef	5,35	±	0,79	bc	60,0	±	2,2	gh	1182,4	±	119,2	de	98,53	±	15,45	ab
<b>Kt</b>	14,42	±	0,94	cd	7,53	±	0,51	a	84,4	±	6,4	def	1626,7	±	97,8	c	68,64	±	12,26	bd
<b>KtPF</b>	11,76	±	0,83	de	6,61	±	0,86	ab	87,8	±	6,9	bcd	1286,9	±	96,8	d	34,97	±	6,42	ef
<b>KtA</b>	11,90	±	1,09	de	6,40	±	0,88	ac	95,2	±	5,8	acf	938,7	±	31,8	ef	63,84	±	1,64	cde
<b>KtE</b>	18,76	±	1,41	bc	7,28	±	0,58	a	82,0	±	2,8	ce	1679,8	±	108,1	c	48,30	±	5,27	cde
<b>KtAE</b>	18,43	±	2,01	b	7,69	±	0,91	a	101,0	±	2,4	ab	1966,6	±	95,2	b	82,03	±	10,17	bc
<b>KtAEPF</b>	23,66	±	2,29	a	6,90	±	0,67	ab	107,7	±	7,5	a	2461,6	±	70,4	a	125,22	±	4,88	a

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 36.** Koncentracija pirazina, pirola i furana ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

	2-Metilpirazin			2-Etilpirazin			2,5-Dimetilpirazin			2,6-Dimetilpirazin			2,3,5-Trimetilpirazin			2-Etil-5(6)-metilpirazin		
<b>KRUH</b>																		
<b>0</b>	34,8	± 1,3	def	4,66	± 0,19	cd	22,3	± 2,2	d	8,50	± 0,32	e	2,04	± 0,05	e	3,61	± 0,32	de
<b>P</b>	31,1	± 4,0	ef	4,11	± 0,17	d	18,8	± 1,4	d	6,97	± 0,79	de	< LOQ		f	2,80	± 0,08	e
<b>PF</b>	41,0	± 1,1	ce	5,28	± 0,08	cd	30,9	± 1,5	c	13,58	± 0,35	c	2,10	± 0,24	e	4,63	± 0,22	de
<b>PG</b>	27,5	± 1,5	f	3,22	± 0,23	d	18,3	± 0,4	d	7,52	± 0,72	de	< LOQ		f	2,89	± 0,11	e
<b>E</b>	35,1	± 2,2	def	4,78	± 0,43	cd	34,3	± 0,6	bc	10,08	± 1,25	ce	2,91	± 0,12	e	4,94	± 0,17	de
<b>Kt</b>	45,4	± 7,0	cd	6,59	± 0,32	bc	21,0	± 2,7	d	9,38	± 1,42	de	3,10	± 0,42	de	5,60	± 0,35	cd
<b>KtPF</b>	39,7	± 2,5	cf	5,44	± 0,15	cd	27,3	± 0,1	cd	12,20	± 0,29	cd	3,12	± 0,03	de	6,23	± 0,16	cd
<b>KtA</b>	65,9	± 3,4	ab	8,43	± 0,48	b	34,1	± 4,0	bc	22,81	± 2,03	b	4,17	± 0,54	cd	8,22	± 0,35	bc
<b>KtE</b>	70,0	± 9,1	a	13,85	± 1,15	a	57,2	± 5,0	a	28,40	± 2,67	a	10,28	± 0,55	a	20,67	± 1,86	a
<b>KtAE</b>	53,2	± 8,8	bc	8,87	± 1,37	b	35,5	± 3,5	bc	20,78	± 2,44	b	5,53	± 0,30	bc	10,29	± 1,72	b
<b>KtAEPF</b>	63,7	± 3,3	ab	7,90	± 0,33	b	38,7	± 0,1	b	31,03	± 0,74	a	6,32	± 0,60	b	10,80	± 0,21	b
<b>KORA</b>																		
<b>0</b>	66,4	± 5,3	ef	11,75	± 1,92	ef	63,3	± 5,2	gh	26,71	± 1,68	eg	7,74	± 0,37	fg	13,60	± 1,20	gh
<b>P</b>	60,4	± 0,7	ef	8,96	± 0,62	ef	51,5	± 2,0	hi	20,65	± 0,58	fg	5,09	± 0,07	g	7,55	± 0,24	hi
<b>PF</b>	63,1	± 5,7	ef	9,80	± 0,98	f	68,0	± 5,7	fh	27,91	± 1,13	ef	6,28	± 0,73	g	9,98	± 0,11	hi
<b>PG</b>	55,4	± 5,7	f	8,43	± 0,24	f	43,8	± 4,0	i	19,89	± 2,03	g	4,20	± 0,55	g	7,42	± 0,35	i
<b>E</b>	105,0	± 12,8	d	19,59	± 2,70	cd	103,6	± 8,3	de	31,70	± 5,81	e	12,48	± 1,33	ef	20,33	± 2,59	ef
<b>Kt</b>	98,5	± 3,5	d	22,11	± 0,65	c	84,1	± 2,2	ef	41,79	± 1,62	d	13,13	± 1,00	e	25,63	± 1,20	e
<b>KtPF</b>	86,9	± 7,4	de	15,26	± 1,59	de	78,7	± 7,1	fg	40,71	± 2,16	d	11,25	± 1,15	ef	18,59	± 0,69	fg
<b>KtA</b>	190,6	± 3,1	bc	32,08	± 1,49	b	117,1	± 11,8	cd	86,76	± 1,27	c	19,71	± 2,58	d	35,95	± 2,44	d
<b>KtE</b>	217,6	± 6,0	b	51,58	± 0,62	a	198,2	± 0,8	a	101,26	± 1,43	b	41,09	± 1,10	a	84,15	± 1,01	a
<b>KtAE</b>	172,1	± 9,6	c	32,63	± 0,13	b	126,6	± 4,4	c	84,54	± 1,21	c	25,16	± 1,03	c	43,81	± 1,65	c
<b>KtAEPF</b>	300,3	± 28,9	a	49,55	± 4,62	a	176,0	± 4,9	b	163,05	± 4,54	a	35,28	± 1,22	b	65,30	± 3,17	b

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano  
Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

**Tablica 36.** Koncentracija pirazina, pirola i furana ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima kruha i kore kruha različitim s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima – nastavak

	2-Acetilpirol			2-Acetilfuran			Furfural			2-Furanmetanol		
<b>KRUH</b>												
<b>0</b>	69,3	± 10,4	e	4,75	± 0,26	e	22,1	± 0,9	ab	690	± 104	cde
<b>P</b>	57,7	± 6,5	e	3,99	± 0,50	e	16,7	± 0,8	b	775	± 37	be
<b>PF</b>	93,6	± 7,7	d	6,50	± 0,81	cd	24,0	± 2,1	a	1178	± 73	a
<b>PG</b>	62,5	± 3,3	e	4,79	± 0,20	de	17,5	± 1,4	b	589	± 45	e
<b>E</b>	95,3	± 4,4	d	6,42	± 0,28	c	23,9	± 3,7	a	873	± 16	bc
<b>Kt</b>	120,0	± 7,6	cd	6,29	± 0,46	cd	25,7	± 0,5	a	617	± 61	e
<b>KtPF</b>	129,7	± 5,3	c	6,77	± 0,33	c	24,5	± 1,0	a	858	± 96	bd
<b>KtA</b>	129,5	± 9,7	c	6,63	± 0,16	c	17,8	± 1,3	b	650	± 66	de
<b>KtE</b>	242,0	± 10,6	a	11,08	± 0,54	a	28,7	± 2,1	a	980	± 48	ab
<b>KtAE</b>	182,2	± 12,5	b	7,35	± 0,94	c	24,4	± 2,7	a	791	± 45	be
<b>KtAEPF</b>	232,7	± 16,0	a	9,34	± 0,31	b	28,9	± 2,9	a	868	± 108	bc
<b>KORA</b>												
<b>0</b>	210,2	± 19,0	e	13,12	± 1,09	ef	75,7	± 11,6	b	2839	± 247	cd
<b>P</b>	177,5	± 9,8	e	9,90	± 0,82	f	35,8	± 0,9	e	2269	± 98	d
<b>PF</b>	253,3	± 18,5	e	12,72	± 0,65	f	48,8	± 2,1	cde	3009	± 194	bd
<b>PG</b>	216,2	± 19,5	e	10,99	± 0,68	f	45,5	± 1,5	de	2503	± 54	cd
<b>E</b>	463,9	± 38,1	cd	17,29	± 2,01	de	73,1	± 7,7	bc	3797	± 394	b
<b>Kt</b>	576,7	± 54,3	c	17,07	± 1,47	de	74,8	± 5,9	bc	2676	± 151	cd
<b>KtPF</b>	442,5	± 54,5	d	16,74	± 0,15	d	58,6	± 0,6	be	2590	± 225	cd
<b>KtA</b>	549,3	± 36,0	cd	20,08	± 1,64	cd	58,6	± 7,4	be	2549	± 4	cd
<b>KtE</b>	884,1	± 11,0	b	32,52	± 0,15	b	81,1	± 1,4	b	3275	± 117	bc
<b>KtAE</b>	792,8	± 97,8	b	21,80	± 0,94	c	67,5	± 6,4	bd	2614	± 134	cd
<b>KtAEPF</b>	1210,7	± 65,1	a	42,24	± 1,22	a	116,6	± 15,3	a	5358	± 535	a

Različitim slovima označene su statistički značajno različite koncentracije pojedinog spoja u jednoj fazi pripreme kruha (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektirano

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

U odnosu na kruh bez njegovog dodatka (0), u kruhu s dodatkom prolina (P) utvrđena je značajno veća koncentracija 2,3-butandiona (60 %) te značajno manja koncentracija aldehida heksanala (37 %), (*E*)-2-heksenala (38 %), heptanala (40 %), (*E*)-2-heptenala (33 %), (*E*)-2-oktenala (35 %) i benzaldehida (54 %); ketona 2-heptanona (51 %) i 2-oktanona (55 %); alkohola 2-metil-1-propanola (35 %), 1-heksanola (22 %), 2-etil-1-heksanola (69 %), 1-heptanola (44 %), 1-oktanola (37 %), (*E*)-2-okten-1-ola (26 %), 1-okten-3-ola (41 %), fenilmetanola (68 %), 2-feniletanola (46 %); dekanske kiseline (36 %); estera etil-heksanoata (32 %) i etil-benzoata (33 %); aromatskih ugljikovodika stirena (59 %) i toluena (52 %); dimetil-disulfida (51 %) i 2,3,5-trimetilpirazina ( $< \text{LOQ}$ ). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u odnosu na kruh bez dodatka prolina. Bredie i sur. (2006) su utvrdili kako dodatak prolina povećava koncentraciju pirola u kori kruha, no u



ovom istraživanju utjecaj dodatka prolina na povećanje koncentracije pirola, pirazina i furana u kori kruha nije utvrđen. Naprotiv, u kori kruha s dodatkom prolina utvrđena je 54 % manja koncentracija furfurala u odnosu na koru kruha bez njegovog dodatka. Prolin je poznati prekursor za nastanak 2-acetil-1-pirolina, spoja koji značajno utječe na poželjan miris i aromu kore pšeničnog kruha. U ovom istraživanju navedeni spoj nije detektiran u bezglutenskom kruhu i kori, što je u skladu s rezultatima Pacyński i sur. (2015) koji su ga odredili u tragovima samo u kori bezglutenskog kruha s dodatkom specifične kombinacije dodanih prekursora (prolina i glukoze). Nasuprot tome, Pico i sur. (2018a) su detektirali 2-acetil-1-pirolin u kori bezglutenskog kruha.

U odnosu na kruh bez njihovog dodatka (0), u kruhu s dodatkom prolina i fruktoze (PF) utvrđena je značajno veća koncentracija aldehida oktanala (39 %) i nonanala (78 %); ketona 2,3-butandiona (43 %), 2,3-pentandiona (51 %) i 6-metil-5-hepten-2-ona (93 %); pirazina 2,5-dimetilpirazina (39 %) i 2,6-dimetilpirazina (60 %); 2-acetilpirola (35 %), 2-acetilfurana (37 %) i 2-furanmetanola (71 %). Također, utvrđena je značajno manja koncentracija aldehida heksanala (40 %), (*E*)-2-heksenala (29 %), (*E,E*)-2,4-dekadienala (41 %) i benzaldehida (40 %); ketona 2-heptanona (49 %) i 2-oktanona (47 %); alkohola 2-metil-1-propanola (48 %), 3-metil-1-butanola (50 %), 1-heksanola (22 %), 2-etil-1-heksanola (64 %), 1-heptanola (42 %), 1-oktanola (32 %), (*E*)-2-okten-1-ola (20 %), 1-okten-3-ola (33 %), fenilmetanola (58 %), 2-feniletanola (29 %); estera etil-heksanoata (29 %); aromatskih ugljikovodika stirena (51 %) i toluena (55 %) te dimetil-disulfida (20 %). U odnosu na kruh bez njihovog dodatka (0), u kruhu s dodatkom prolina i glukoze (PG) utvrđena je značajno veća koncentracija ketona 2,3-butandiona (32 %), a značajno manja koncentracija aldehida heksanala (41 %), (*E*)-2-heksenala (38 %), (*E*)-2-heptenala (29 %), (*E*)-2-oktenala (36 %), (*E,E*)-2,4-nonadienala (34 %), (*E,E*)-2,4-dekadienala (56 %) i benzaldehida (48 %); ketona 2-heptanona (54 %) i 2-oktanona (53 %); alkohola 2-metil-1-propanola (44 %), 3-metil-1-butanola (43 %), 2-etil-1-heksanola (65 %), 1-heptanola (54 %), 1-oktanola (48 %), (*E*)-2-okten-1-ola (25 %), 1-okten-3-ola (42 %), (*Z*)-3-nonenola (20 %), fenilmetanola (61 %), 2-feniletanola (39 %); oktanske kiseline (36 %); estera etil-heksanoata (35 %) i etil-benzoata (29 %); aromatskih ugljikovodika stirena (63 %) i toluena (69 %) te 2,3,5-trimetilpirazina (< LOQ). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u odnosu na kruh bez dodatka prolina i fruktoze/glukoze. Pacyński i sur. (2015) su također ispitali utjecaj dodatka kombinacije prolina i fruktoze te prolina i glukoze na profil hlapljivih spojeva arome kore bezglutenskog kruha. Pirazine, pirole i furane nisu detektirali u

kori bezglutenskog kruha bez dodatka prekursora. Nadalje, utvrdili su kako je pri dodatku obje kombinacije prekursora došlo do povećanja koncentracije 2-metilpirazina, furfurala, 2-furanmetanola, fenilacetaldehida; smanjenja koncentracije 3-metilbutanala u slučaju dodatka prolina i fruktoze te smanjenja koncentracije 3-metil-1-butanola u slučaju dodatka prolina i glukoze. Zaključili su kako se dodatkom prolina i glukoze postiže miris najbliži mirisu pšeničnog kruha. U usporedbi s rezultatima Pacyński i sur. (2015), u ovom istraživanju je utvrđeno samo smanjenje koncentracije 3-metil-1-butanola u kori kruha s dodatkom prolina i fruktoze. Također, kao i u slučaju dodatka prolina, u kori kruha s dodatkom prolina i fruktoze/glukoze utvrđena je manja koncentracija furfurala u odnosu na kruh bez njihovog dodatka. Budući da je koncentracija analiziranih pirazina, pirola i furana bila veća u kruhu s dodatkom prolina i fruktoze ( $1400 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) nego u kruhu s dodatkom prolina i glukoze ( $733 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), kombinacija prolin i fruktoza odabrana je za nastavak istraživanja, odnosno ispitivanje dodatka u kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta (KtPF i KtAEPF).

U odnosu na kruh s dodatkom kiselog tijesta (Kt), u kruhu s dodatkom kiselog tijesta, prolina i fruktoze (KtPF) utvrđena je značajno veća koncentracija aldehida nonanala (45 %) i benzaldehida (46 %); ketona 2,3-butandiona (27 %) i 6-metil-5-hepten-2-ona (51 %) te 2-furanmetanola (39 %). Također, utvrđena je značajno manja koncentracija aldehida (*E*)-2-heksenala (33 %), (*E*)-2-heptenala (15 %), (*E*)-2-oktenala (22 %); ketona 2-heptanona (33 %) i 2-oktanona (34 %); alkohola 2-metil-1-propanola (28 %), 1-pentanola (15 %), 1-heksanola (23 %), 2-etil-1-heksanola (25 %), 1-heptanola (40 %), 1-oktanola (34 %), (*E*)-2-okten-1-ola (25 %), 1-okten-3-ola (26 %); oktanske kiseline (24 %); aromatskog ugljikovodika stirena (30 %), 2-metoksi-4-vinilfenola (28 %) i dimetil-disulfida (47 %). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u odnosu na kruh bez dodatka prolina i fruktoze.

U odnosu na kruh bez njihovog dodatka (0), u kruhu s dodatkom enzima proteaza (E) utvrđena je značajno veća koncentracija aldehida (*E*)-2-heptenala (32 %), oktanala (60 %), nonanala (121 %), (*E*)-2-nonenala (101 %), (*E,E*)-2,4-nonadienala (37 %) i dekanala (74 %); ketona 2,3-butandiona (52 %) i 6-metil-5-hepten-2-ona (70 %); estera etil-tetradekanoata (98 %) i etil-heksadekanoata (70 %); 2,5-dimetilpirazina (54 %), 2-acetilpirola (38 %) i 2-acetilfurana (35 %). Također, utvrđena je značajno manja koncentracija ketona 2-heptanona (40 %) i 2-oktanona (23 %); alkohola 2-etil-1-heksanola (35 %), 1-heptanola (18 %) i fenilmetanola (25 %); benzojeve kiseline (29 %); aromatskih ugljikovodika stirena (32 %) i toluena (36 %). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u

odnosu na kruh bez dodatka enzima proteaza. U kori kruha s dodatkom proteaza utvrđena je veća koncentracija 2-metilpirazina (58 %), 2-etil pirazina (67 %), 2,5-dimetilpirazina (64 %), 2-etil-5(6)-metilpirazina (49 %), 2-acetilpirola (121 %) i 2-furanmetanola (34 %).

U odnosu na kruh s dodatkom kiselog tijesta (Kt), u kruhu s dodatkom kiselog tijesta i enzima proteaza (KtE) utvrđena je značajno veća koncentracija aldehida 2-metilbutanala (239 %) i 3-metilbutanala (309 %), (*E,E*)-2,4-dekadienala (40 %), benzaldehida (47 %), fenilacetaldehida (238 %); ketona 2,3-butandiona (50 %), 2,3-pentandiona (46 %) i 6-metil-5-hepten-2-ona (38 %); alkohola 3-metil-1-butanola (51 %) i fenilmetanola (16 %); 2-metilbutanske (31 %), heksanske (22 %), heptanske (27 %) i benzojeve kiseline (33 %); estera etil-tetradekanoata (37 %) i etil-heksadekanoata (50 %); pirazina 2-metilpirazina (54 %), 2-etilpirazina (110 %), 2,5-dimetilpirazina (173 %), 2,6-dimetilpirazina (203 %), 2,3,5-trimetilpirazina (232 %) i 2-etil-(5,6)-metilpirazina (269 %); pirola 2-acetilpirola (102 %) te furana 2-acetilfurana (76 %) i 2-furanmetanola (59 %). Također, utvrđena je značajno manja koncentracija ketona 2-oktanona (18 %); alkohola 1-heptanola (37 %), 1-oktanola (21 %) i 1-okten-3-ola (19 %) te 2-metoksi-4-vinilfenola (21 %). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u odnosu na kruh bez dodatka proteaza. U kori kruha s dodatkom proteaza i kiselog tijesta (KtE) je u odnosu na kruh s dodatkom kiselog tijesta (Kt) utvrđena veća koncentracija svih analiziranih pirazina (od 121 do 228 %), 2-acetilpirola (53 %), 2-acetilfurana (91 %) i 2-furanmetanola (22 %). Utvrđen različit utjecaj dodatka proteaza u krušno i kiselo tijesto na koncentraciju analiziranih hlapljivih spojeva arome može biti posljedica duljeg vremena djelovanja enzima u slučaju dodatka u kiselo tijesto, veće aktivnosti enzima pri manjem pH i/ili kompleksne interakcije proteaza i metabolizma bakterija mliječne kiseline.

Arginin je dodavan u kiselo tijesto radi potencijalno mogućeg utjecaja na povećanje koncentracije 2-acetil-1-pirolina budući da primijenjene bakterije mliječne kiseline prema literaturi imaju sposobnost konverzije arginina u ornitin, a koji je prekursor nastanka 2-acetil-1-pirolina (Gänzle i sur., 2007). 2-Acetil-1-pirolin nije detektiran ni u jednom od analiziranih uzoraka, no u odnosu na kruh s dodatkom kiselog tijesta (Kt), u kruhu s dodatkom kiselog tijesta i arginina (KtA) utvrđena je značajno veća koncentracija 2-metilpirazina (93 %), 2,5-dimetilpirazina (39 %) i 2,6-dimetilpirazina (108 %). Također, utvrđena je značajno manja koncentracija aldehida (*E*)-2-heksenala (32 %), (*E*)-2-heptenala (15 %), (*E*)-2-oktenala (22 %) i (*E,E*)-2,4-nonadienala (26 %); ketona 2-oktanona (28 %); alkohola 2-metil-1-propanola (36 %), 3-metil-1-butanola (39 %), 2-etil-1-heksanola (18 %), 1-heptanola (22 %),

1-oktanola (15 %), (*E*)-2-okten-1-ola (17 %), 1-okten-3-ola (21 %), 2-feniletanola (25 %); oktanske (19 %) i dekanske kiseline (25 %); aromatskog ugljikovodika stirena (22 %) i 2-metoksi-4-vinilfenola (42 %). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u odnosu na kruh bez dodatka arginina.

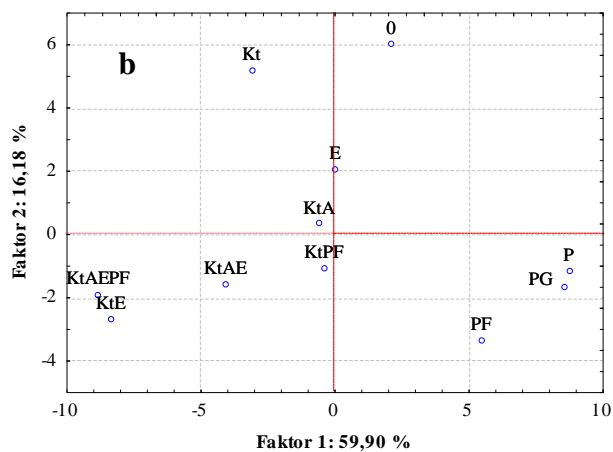
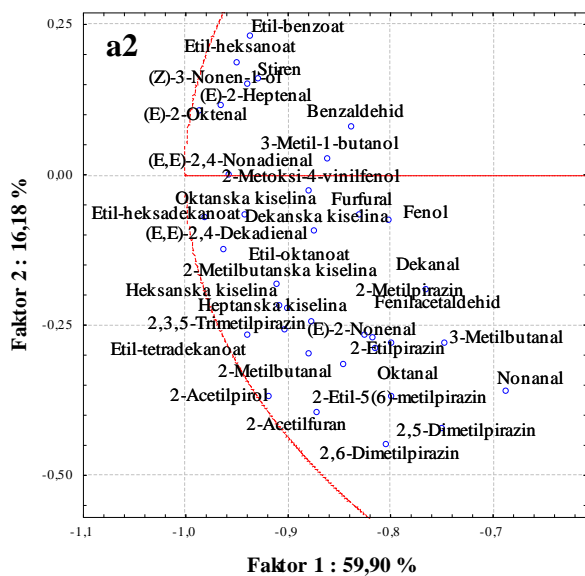
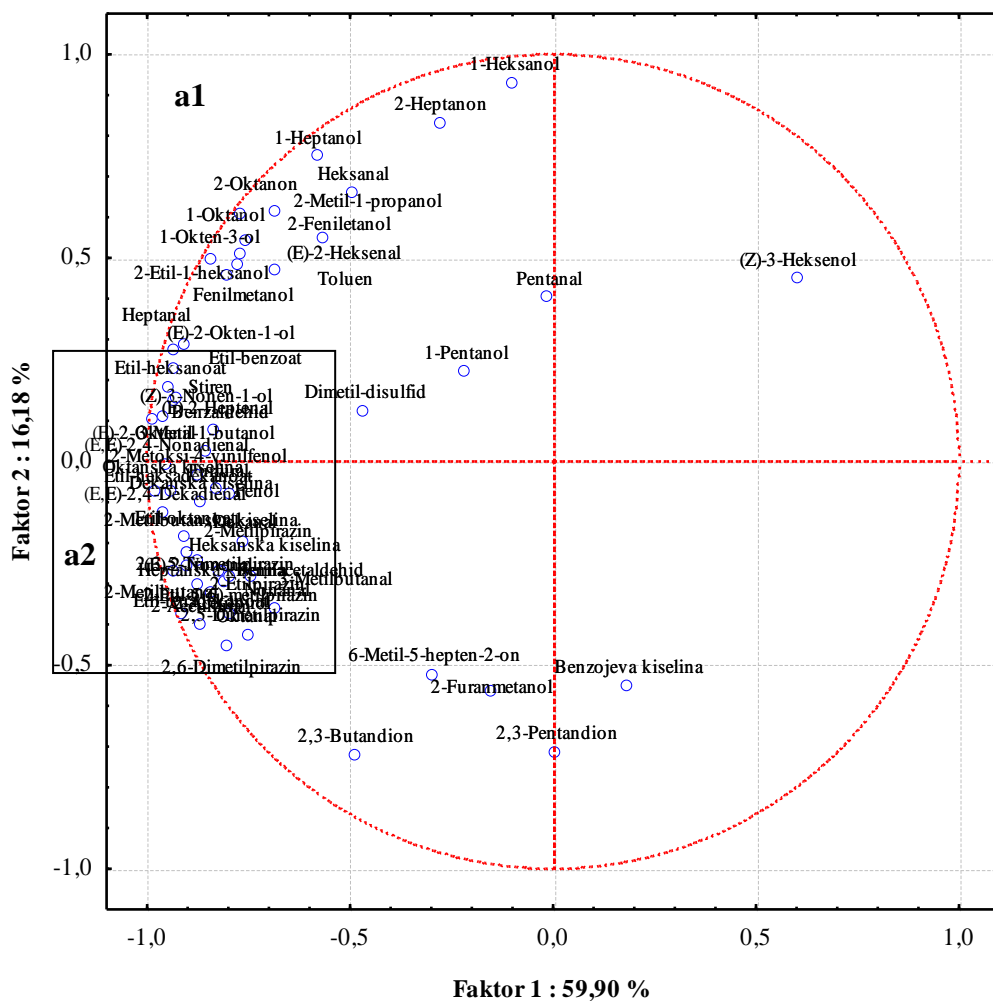
U odnosu na kruh s dodatkom kiselog tijesta (Kt), u kruhu s dodatkom kiselog tijesta, arginina i enzima proteaza (KtAE) utvrđena je značajno veća koncentracija benzaldehida (48 %); ketona 2,3-butandiona (28 %) i 6-metil-5-hepten-2-ona (47 %); 2-metilbutanske (33 %), heptanske (26 %) i dekanske kiseline (31 %); estera etil-oktanoata (49 %), etil-tetradekanoata (18 %) i etil-heksadekanoata (29 %); 2-metoksi-4-vinilfenola (22 %); pirazina 2,5-dimetilpirazina (69 %), 2,6-dimetilpirazina (122 %), 2,3,5-trimetilpirazina (78 %) i 2-etil-(5,6)-metilpirazina (84 %); pirola 2-acetilpirola (52 %) te furana 2-furanmetanola (28 %). Također, utvrđena je značajno manja koncentracija aldehida (*E*)-2-heksenala (30 %); ketona 2-heptanona (31 %) i 2-oktanona (29 %); alkohola 1-heksanola (21 %), (*Z*)-3-heksenola (27 %), 2-etil-1-heksanola (30 %), 1-heptanola (34 %), 1-oktanola (34 %), (*E*)-2-okten-1-ola (24 %), 1-okten-3-ola (21 %) i 2-feniletanola (21 %). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u odnosu na kruh bez dodatka proteaza i arginina. Prema dobivenim rezultatima, dodatak arginina je smanjio utjecaj proteaza na povećanje koncentracije hlapljivih spojeva arome. Tako je u kruhu s dodatkom kiselog tijesta, arginina i enzima (KtAE) u odnosu na kruh bez dodatka arginina (KtE) utvrđeno smanjenje koncentracije aldehida 2-metilbutanala, 3-metilbutanala, (*E*)-2-heksenala, (*E,E*)-2,4-dekadienal, fenilacetaldehida; alkohola 3-metil-1-butanola, 2-etil-1-heksanola, (*E*)-2-okten-1-ola, fenilmetanola; svih analiziranih pirazina; 2-acetilpirola i 2-acetilfurana. Navedeni utjecaj mogao bi biti posljedica većeg pH tijesta s dodatkom arginina koji može utjecati na smanjenu aktivnost dodanih enzima.

U odnosu na kruh s dodatkom kiselog tijesta (Kt), u kruhu s dodatkom kiselog tijesta, arginina, proteaza, prolina i fruktoze (KtAEPF) utvrđena je značajno veća koncentracija aldehida 2-metilbutanala (95 %), 3-metilbutanala (57 %), (*E*)-2-heptenala (18 %), nonanala (70 %), (*E*)-2-nonenala (65 %), (*E,E*)-2,4-nonadienala (37 %), (*E,E*)-2,4-dekadienala (69 %), benzaldehida (55 %) i fenilacetaldehida (66 %); ketona 2,3-butandiona (29 %) i 6-metil-5-hepten-2-ona (35 %); svih analiziranih kiselina (od 50 do 94 %); estera etil-oktanoata (72 %), etil-tetradekanoata (50 %) i etil-heksadekanoata (50 %); aromatskog ugljikovodika stirena (20 %); fenola (27 %) i 2-metoksi-4-vinilfenola (28 %); dimetil-disulfida (59 %); pirazina 2-metilpirazina (40 %), 2,5-dimetilpirazina (85 %), 2,6-dimetilpirazina (231 %),

2,3,5-trimetilpirazina (104 %) i 2-etil-(5,6)-metilpirazina (93 %); pirola 2-acetilpirola (94 %) te furana 2-acetilfurana (48 %) i 2-furanmetanola (41 %). Također, utvrđena je značajno manja koncentracija aldehida heksanala (12 %); ketona 2-heptanona (27 %); alkohola 2-metil-1-propanola (22 %), 1-pentanola (14 %), 1-heksanola (23 %), (*Z*)-3-heksenola (26 %), 1-heptanola (27 %) i 1-oktanola (16 %). Za ostale analizirane spojeve nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji u odnosu na kruh bez dodatka proteaza, arginina, prolina i fruktoze. S obzirom na prisutnost pirazina, pirola i furana u kori, u kori kruha KtAEPF određena je veća koncentracija svih analiziranih pirazina (od 109 do 290 %), pirola (110 %) i furana (od 56 do 147 %).

Uspoređujući kruh bez dodataka (0) s kruhom s dodatkom kiselog tijesta, arginina, proteaza, prolina i fruktoze (KtAEPF), u kruhu KtAEPF utvrđena je značajno veća koncentracija većine analiziranih aldehida (od 62 do 485 %), pri čemu je najveće povećanje koncentracije utvrđeno za 2-metilbutanal (485 %), 3-metilbutanal (366 %), fenilacetaldehid (347 %) i (*E,E*)-2,4-dekadienal (234 %); ketona 2,3-butandiona (67 %), 6-metil-5-heptan-2-ona (49 %); alkohola (*E*)-2-okten-1-ola (29 %), (*Z*)-3-nonenola (26 %); većine analiziranih kiselina (od 121 do 290 %), pri čemu je do najvećeg povećanja koncentracije došlo kod heptanske kiseline; svih analiziranih estera (od 26 do 196 %); stirena (69 %); fenola (99 %), 2-metoksi-4-vinilfenola (286 %); svih analiziranih pirazina (od 70 do 265 %), 2-acetilpirola (236 %) i 2-acetilfurana (96 %). Osim toga, u kruhu KtAEPF utvrđena je manja koncentracija aldehida heksanala (25 %); ketona 2-heptanona (41 %); alkohola 1-heksanola (22 %), (*Z*)-3-heksenola (38 %), 2-etil-1-heksanola (18 %), 1-heptanola (12 %). S obzirom na prisutnost pirazina, pirola i furana u kori, u kori kruha KtAEPF određena je veća koncentracija svih analiziranih pirazina (od 178 % do 510 %), pirola (476 %) i furana (od 54 % do 222 %).

Na slici 36 prikazani su rezultati PCA analize profila hlapljivih spojeva arome kruha ovisno o dodatku prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta.



**Slika 36.** Faktorsko opterećenje (engl. *loadings*) (a1 i a2) i faktorski bodovi (engl. *scores*) (b) dobiveni PCA analizom profila hlapljivih spojeva arome uzoraka kruha različitih prema dodatku kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

Prikazani faktori 1 i 2 opisuju 76,07 % varijance te je vidljiva podjela uzoraka bez i s dodatkom kiselog tijesta po faktoru 1 te podjela uzoraka bez i s dodatkom prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima po faktoru 2. Faktor 1 bio je u negativnoj korelaciji s koncentracijom većine aldehida, alkohola, kiselina, estera, pirazina, pirola, furana, aromatskih ugljikovodika i fenola. Prema tome je uzorke kruha s dodatkom kiselog tijesta karakterizirala veća koncentracija svih navedenih spojeva, a uzorke kruha bez dodatka kiselog tijesta manja koncentracija istih te veća koncentracija (Z)-3-heksenola. Faktor 2 bio je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom 1-heksanola, 1-heptanola, heksanala i 2-heptanona te je njihova veća koncentracija karakterizirala kruh bez dodatka šećera, aminokiselina i enzima. Faktor 2 bio je u negativnoj korelaciji s koncentracijom 2,3-butandiona i 2,3-pentandiona te je njihova veća koncentracija karakterizirala kruh s dodatkom šećera, aminokiselina i enzima. S obzirom na uobičajeni nedostatak pirazina i drugih spojeva koji doprinose aromi pečenog u bezglutenskom kruhu u odnosu na pšenični, poželjno je povećanje njihove koncentracije u analiziranim uzorcima kruha. Najveća koncentracija pirazina, pirola i furana karakterizirala je uzorke kruha KtAEPF i KtE. Koncentracija navedenih spojeva u kruhu s dodatkom enzima proteaza (E) bila je slična njihovoj koncentraciji u kruhu s dodatkom kiselog tijesta i arginina (KtA) te prolina i fruktoze (KtPF), što ukazuje na značajan doprinos dodanih enzima povećanju koncentracije navedenih spojeva. Nadalje, vidljivo je kako je dodatak arginina utjecao na smanjenja koncentracije navedenih spojeva u kruhu. Prema tome bi se možda u slučaju isključivanja arginina iz recepture za pripremu kruha, odnosno pripremom kruha s dodatkom kiselog tijesta, enzima proteaza, prolina i fruktoze (KtEPF) postiglo dodatno povećanje koncentracije navedenih poželjnih spojeva.

#### 4.3.3. Senzorska analiza

Prema rezultatima HS-SPME/GC-MS analize, utvrđene su značajne razlike u profilu hlapljivih spojeva arome kruha ovisno o dodatku kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. S obzirom na navedeno, cilj senzorske analize istih bio je utvrditi u kojoj su mjeri utvrđene razlike u profilu hlapljivih spojeva arome utjecale na percepciju mirisa i arome navedenih uzoraka kruha. Provedene su deskriptivna i hedonistička analiza s ciljem utvrđivanja razlike u intenzitetu pojedinih atributa te njihove povezanosti s prihvatljivošću mirisa i arome.

U tablicama 37, 38 i 39 (str. 193, 194 i 195) prikazani su rezultati faktorske analize varijance utjecaja uzorka i panelista na intenzitet atributa mirisa sredine i kore te atributa arome uzoraka

kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Analizom varijance je kod pojedinih atributa mirisa i arome utvrđen značajan utjecaj interakcije uzorka i panelista. Kako je već navedeno u poglavlju 4.2.5., mogući uzroci navedene interakcije su različita percepcija pojedinih senzorskih svojstava između panelista te različito korištenje ljestvice intenziteta pri senzorskoj analizi (Romano i sur., 2008). Navedene utjecaje nije moguće u potpunosti izbjeći (Romano i sur., 2008), no dodatni trening panelista bi potencijalno doprinio ujednačenijem korištenju ljestvice intenziteta pa time i homogenosti panela (ISO 11132: 2012).

Na slikama 37, 38 i 39 prikazani su rezultati deskriptivne analize, a na slikama 40 i 41 rezultati hedonističke analize mirisa sredine i kore kruha ovisno o dodatku kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima.



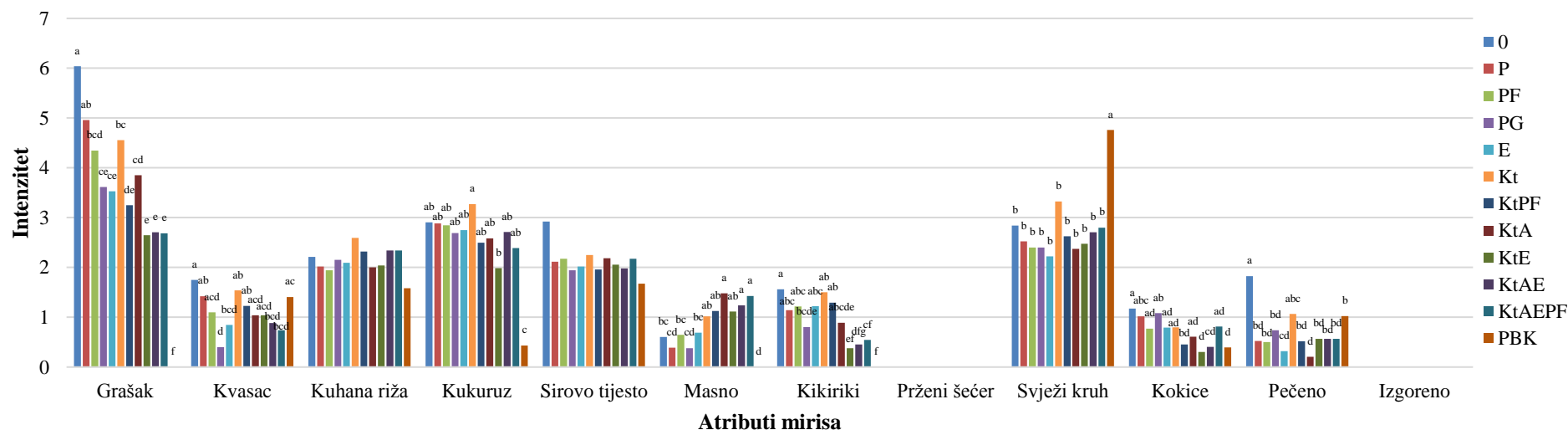
**Tablica 37.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize mirisa sredine uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (12 uzoraka, 15 panelista, dva ponavljanja)

	Grašak		Kvasac		Kuhana riža		Kukuruz		Sirovo tijesto		Masno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	34,56	< 0,001	4,45	< 0,001	1,63	0,096	20,02	< 0,001	1,68	0,082	14,33	< 0,001
<b>Panelist</b>	10,12	< 0,001	12,75	< 0,001	13,13	< 0,001	15,30	< 0,001	14,58	< 0,001	17,90	< 0,001
<b>Uzorak*panelist</b>	2,52	< 0,001	1,18	0,118	1,46	0,004	1,50	0,002	1,40	0,008	2,00	< 0,001

	Kikiriki		Prženi šećer*		Svježi kruh		Kokice		Pečeno		Izgoreno*		Ocjena svidanja	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	10,47	< 0,001			12,35	< 0,001	3,84	< 0,001	5,37	< 0,001			8,14	< 0,001
<b>Panelist</b>	13,37	< 0,001			18,99	< 0,001	9,86	< 0,001	8,31	< 0,001			11,07	< 0,001
<b>Uzorak*panelist</b>	1,72	< 0,001			1,37	0,013	1,34	0,019	1,20	0,096			1,33	0,021

\*Zavisna varijabla nema varijancu



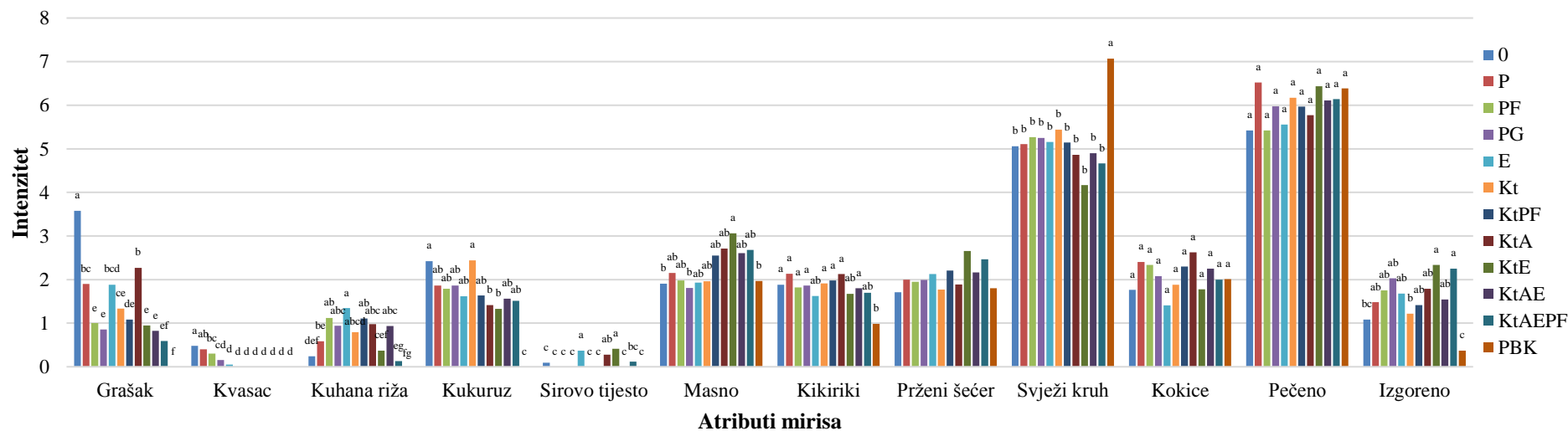
**Slika 37.** Srednja vrijednost intenziteta atributa mirisa sredine uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (15 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripravljeno s *L. brevis*, A – arginin; PBK – pšenični bijeli kruh

**Tablica 38.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize mirisa kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (12 uzoraka, 15 panelista, dva ponavljanja)

	Grašak		Kvasac		Kuhana riža		Kukuruz		Sirovo tijesto		Masno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	17,68	< 0,001	7,80	< 0,001	7,79	< 0,001	12,07	< 0,001	5,76	< 0,001	3,50	< 0,001
Panelist	6,61	< 0,001	3,12	< 0,001	11,64	< 0,001	10,22	< 0,001	2,99	< 0,001	13,71	< 0,001
Uzorak*panelist	2,37	< 0,001	4,18	< 0,001	1,99	< 0,001	1,92	< 0,001	3,79	< 0,001	0,90	0,773

	Kikiriki		Prženi šećer		Svježi kruh		Kokice		Pečeno		Izgoreno		Ocjena svidanja	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	3,48	< 0,001	1,34	0,207	7,49	< 0,001	2,11	0,022	2,13	0,021	9,39	< 0,001	7,20	< 0,001
Panelist	20,83	< 0,001	24,04	< 0,001	23,59	< 0,001	19,84	< 0,001	31,31	< 0,001	18,80	< 0,001	14,84	< 0,001
Uzorak*panelist	1,41	0,007	1,40	0,009	1,21	0,084	0,66	0,998	1,09	0,272	1,54	0,001	1,38	0,011

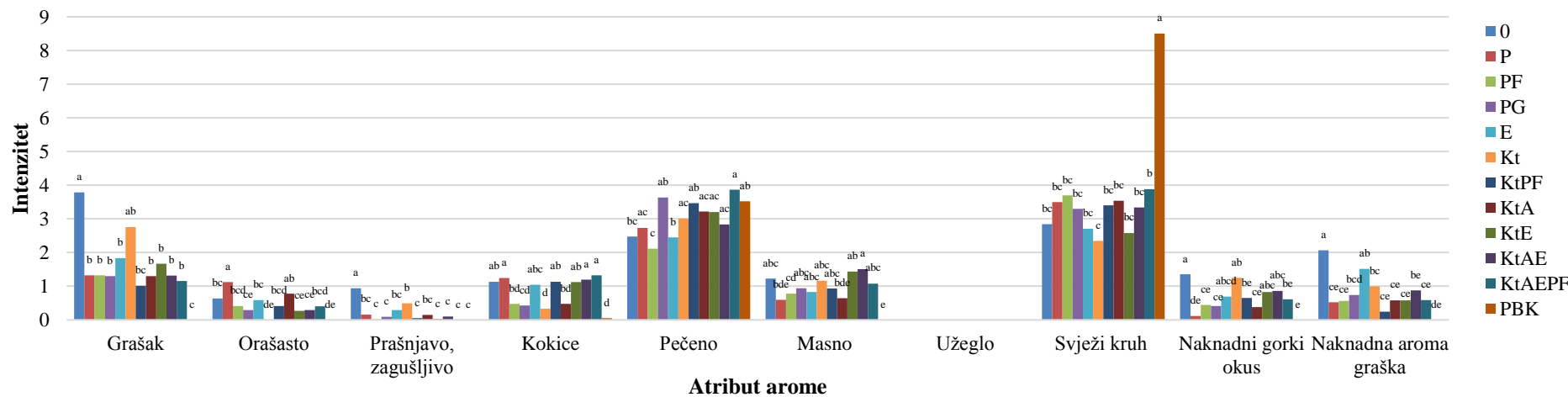
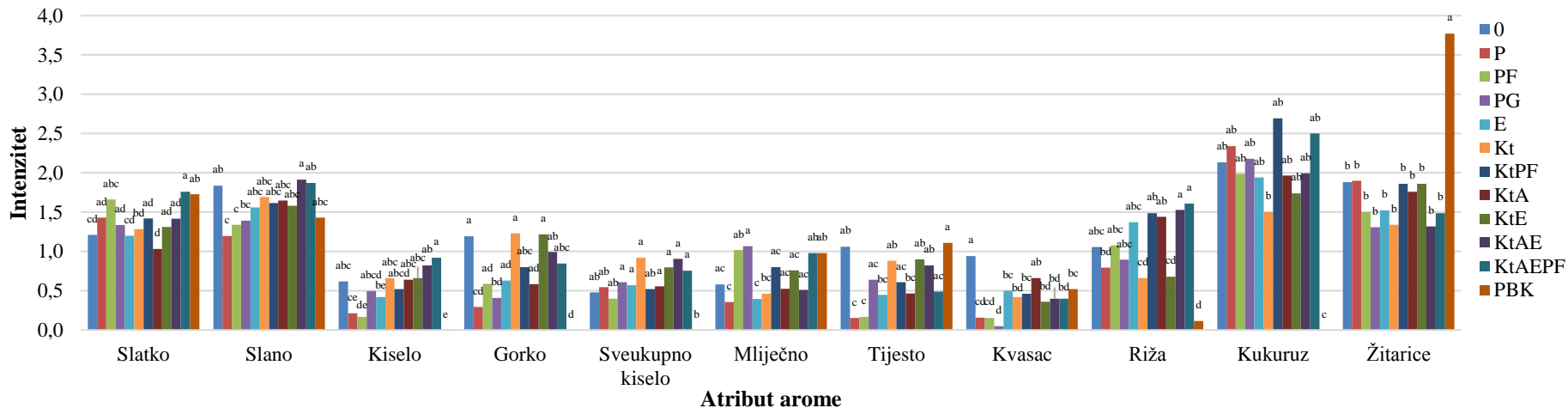


**Slika 38.** Srednja vrijednost intenziteta atributa mirisa kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (15 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin; PBK – pšenični bijeli kruh

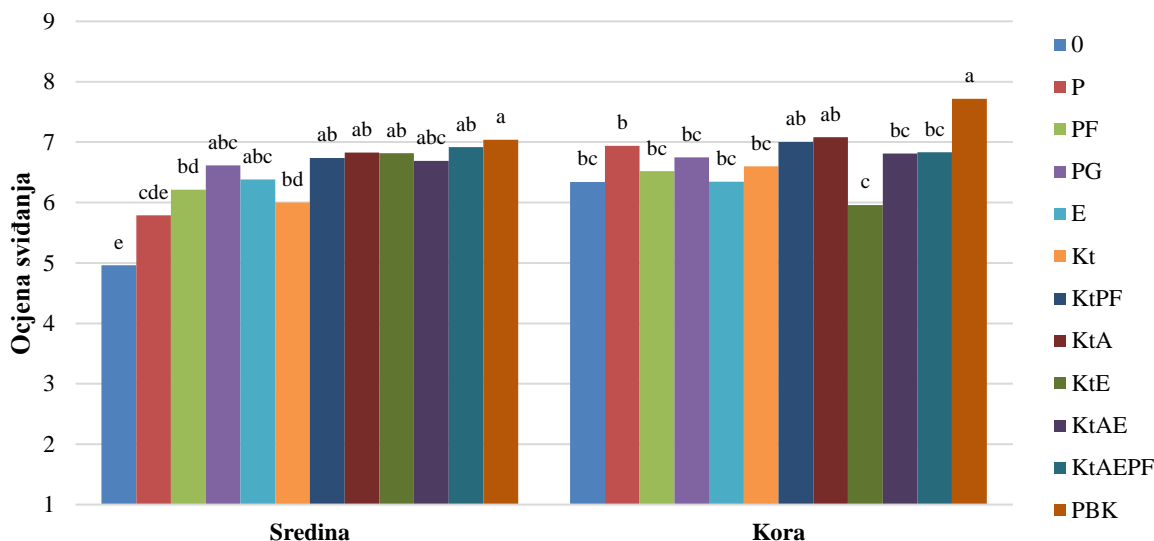
**Tablica 39.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (12 uzoraka, 13 panelista, dva ponavljanja)

	Slatko		Slano		Kiselo		Gorko		Sveukupno kiselo		Mliječno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	2,74	0,003	4,87	< 0,001	4,83	< 0,001	6,57	< 0,001	3,92	< 0,001	3,61	< 0,001
<b>Panelist</b>	9,73	< 0,001	23,36	< 0,001	11,24	< 0,001	6,08	< 0,001	12,13	< 0,001	27,19	< 0,001
<b>Uzorak*panelist</b>	1,73	0,001	0,86	0,815	1,63	0,002	1,13	0,229	1,13	0,230	1,21	0,130
	Tijesto		Kvasac		Riža		Kukuruz		Žitarice		Grašak	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	4,17	< 0,001	4,12	< 0,001	4,55	< 0,001	8,29	< 0,001	10,70	< 0,001	10,03	< 0,001
<b>Panelist</b>	11,86	< 0,001	16,68	< 0,001	21,17	< 0,001	15,08	< 0,001	38,93	< 0,001	3,53	< 0,001
<b>Uzorak*panelist</b>	1,33	0,045	1,93	< 0,001	1,85	< 0,001	1,29	0,064	0,95	0,621	1,66	0,001
	Orašasto		Prašnjavo, zagušljivo		Kokice		Pečeno		Masno		Užeglo*	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	3,54	< 0,001	11,88	< 0,001	6,89	< 0,001	3,30	0,001	4,37	< 0,001		
<b>Panelist</b>	7,59	< 0,001	4,96	< 0,001	19,95	< 0,001	16,79	< 0,001	15,14	< 0,001		
<b>Uzorak*panelist</b>	2,82	< 0,001	1,01	0,473	1,33	0,045	1,28	0,069	1,65	0,001		
	Svježi kruh		Naknadni gorki okus		Naknadna aroma graška		Ocjena svidanja					
	F	p	F	p	F	p	F	p				
<b>Uzorak</b>	24,22	< 0,001	8,80	< 0,001	11,12	< 0,001	6,09	< 0,001				
<b>Panelist</b>	27,16	< 0,001	6,89	< 0,001	6,02	< 0,001	14,02	< 0,001				
<b>Uzorak*panelist</b>	1,03	0,433	0,90	0,739	0,74	0,964	1,93	< 0,001				

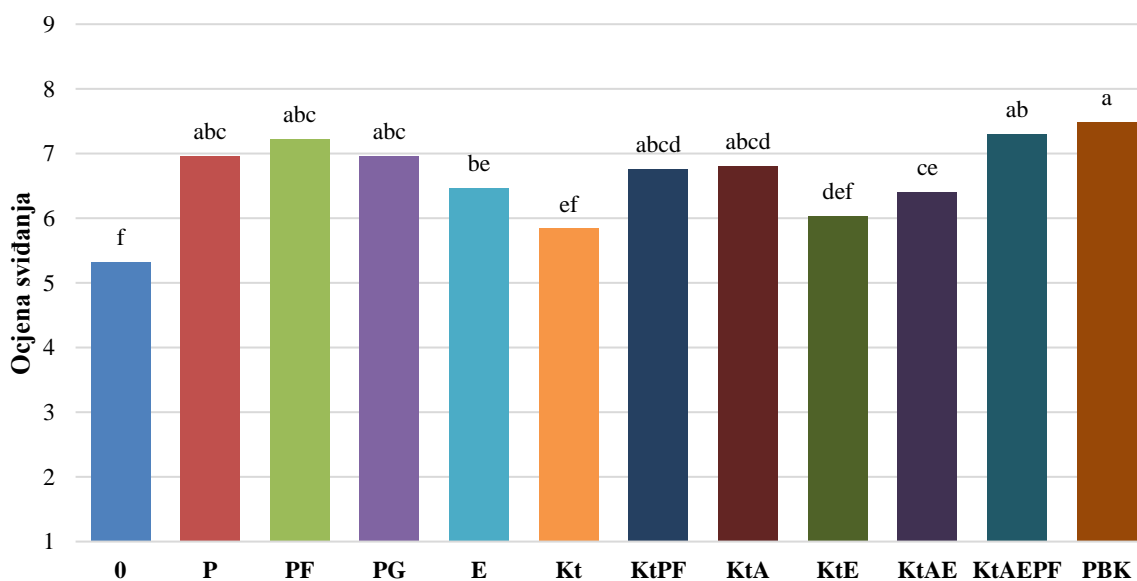
\*Zavisna varijabla nema varijancu



**Slika 39.** Srednja vrijednost intenziteta atributa arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (13 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin; PBK – pšenični bijeli kruh



**Slika 40.** Prihvatljivost mirisa sredine i kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (15 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripravljeno s *L. brevis*, A – arginin; PBK – pšenični bijeli kruh



**Slika 41.** Prihvatljivost arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (13 panelista, dva ponavljanja). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripravljeno s *L. brevis*, A – arginin; PBK – pšenični bijeli kruh

Prema dobivenim rezultatima, ocjena sviđanja mirisa sredine kruha bila je u negativnoj korelaciji s mirisom po grašku ( $r = -0,840$ ,  $p = 0,001$ ), sirovom tijestu ( $r = -0,825$ ,  $p = 0,001$ ), kikirikiju ( $r = -0,750$ ,  $p = 0,005$ ), kokicama ( $r = -0,721$ ,  $p = 0,008$ ), pečenom ( $r = -0,647$ ,  $p = 0,023$ ) i kvascu ( $r = -0,613$ ,  $p = 0,034$ ). Nadalje, ocjena sviđanja mirisa kore kruha bila je u negativnoj korelaciji s mirisom po kukuruzu ( $r = -0,610$ ,  $p = 0,035$ ) i izgorenom ( $r = -0,577$ ,  $p = 0,049$ ), a u pozitivnoj korelaciji s mirisom po svježem kruhu ( $r = 0,728$ ,  $p = 0,007$ ).

Ocjena sviđanja arome kruha bila je u pozitivnoj korelaciji sa slatkim okusom ( $r = 0,828$ ,  $p = 0,006$ ), aromom žitarica ( $r = 0,779$ ,  $p = 0,013$ ) i svježeg kruha ( $r = 0,760$ ,  $p = 0,017$ ), a u negativnoj korelaciji s aromom graška ( $r = -0,921$ ,  $p < 0,001$ ), naknadnom aromom graška ( $r = -0,859$ ,  $p = 0,003$ ), aromom masnog ( $r = -0,791$ ,  $p = 0,011$ ), prašnjavom, zagušljivoj aromom ( $r = -0,750$ ,  $p = 0,020$ ), sveukupno kiselom aromom ( $r = -0,677$ ,  $p = 0,045$ ), kiselim ( $r = -0,789$ ,  $p = 0,011$ ) i gorkim okusom ( $r = -0,687$ ,  $p = 0,041$ ).

Provedena je i faktorska analiza varijance s dodatkom prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta kao fiksnom nezavisnom varijablom te panelistima kao slučajnom (engl. *random*) nezavisnom varijablom. Pšenični bijeli kruh nije bio uključen u navedenu analizu. Utvrđeni značajni utjecaji dodatka prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta navedeni u nastavku ovog poglavlja rezultat su spomenute analize. U tablicama 40 i 41 prikazani su statistički značajni utjecaji dodatka prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta na pojedine attribute mirisa sredine i kore te arome kruha. U raspravi će većinom biti navedeni atributi mirisa i arome koji su u snažnoj korelaciji ( $|r| > 0,7$ ) s prihvatljivošću kruha.

**Tablica 40.** Utjecaj prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta na miris sredine i kore kruha određen senzorskom analizom (p-vrijednosti statistički značajnih utjecaja i opis utjecaja na intenzitet pojedinog atributa mirisa×)

Atributi	P*	F u PF <sup>□</sup>	G u PG <sup>□</sup>	PF*	PG*	E*	Kt*	PF s Kt <sup>#</sup>	A s Kt <sup>#</sup>	E s Kt <sup>#</sup>	AE s Kt <sup>#</sup>	AEPF s Kt <sup>#</sup>	KtAEPF*
<b>SREDINA</b>													
Grašak			0,001 ↓	0,004 ↓	0,002 ↓	0,004 ↓	0,009 ↓	0,046 ↓		0,001 ↓	0,008 ↓	0,004 ↓	< 0,001 ↓
Kvasac		0,028 ↓	0,001 ↓	0,036 ↓	0,001 ↓	0,007 ↓						0,033 ↓	0,008 ↓
Kuhana riža													
Kukuruz										0,008 ↓		0,044 ↓	
Sirovo tijesto					0,029 ↓	0,039 ↓							
Masno							0,036 ↑		0,035 ↑				0,001 ↑
Kikiriki					0,005 ↓				0,023 ↓	0,005 ↓	0,010 ↓	0,014 ↓	0,001 ↓
Prženi šećer													
Svježi kruh													
Kokice										0,014 ↓	0,042 ↓		
Pečeno	0,020 ↓			0,025 ↓	0,030 ↓	0,015 ↓			0,009 ↓				0,030 ↓
Izgoreno													
Ocjena svidanja			0,006 ↑	0,003 ↑	0,002 ↑	0,009 ↑	0,009 ↑	0,008 ↑	0,048 ↑	0,011 ↑	0,045 ↑	0,011 ↑	< 0,001 ↑
<b>KORA</b>													
Grašak	0,018 ↓	< 0,001 ↓	0,001 ↓	0,001 ↓	< 0,001 ↓	0,004 ↓	0,001 ↓					0,046 ↓	< 0,001 ↓
Kvasac					0,050 ↓	0,016 ↓	0,008 ↓					0,006 ↓	0,008 ↓
Kuhana riža	0,048 ↑	0,024 ↑	0,039 ↑	0,008 ↑	0,016 ↑	0,022 ↑	0,016 ↑						
Kukuruz						0,044 ↓				0,019 ↓			
Sirovo tijesto	0,046 ↓			0,046 ↓	0,046 ↓	0,043 ↑	0,046 ↓			0,022 ↑		0,027 ↑	
Masno										0,014 ↑			0,042 ↑
Kikiriki													
Prženi šećer										0,027 ↑			
Svježi kruh													
Kokice									0,039 ↑				
Pečeno	0,012 ↑	0,020 ↓						0,005 ↑					
Izgoreno			0,033 ↑	0,024 ↑	0,008 ↑	0,041 ↑				0,017 ↑		0,011 ↑	0,004 ↑
Ocjena svidanja													

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripravljeno s *L. brevis*, A – arginin

× ↑ - povećanje, ↓ - smanjenje intenziteta atributa

Uzorak uspoređen s uzorkom: \*0, <sup>□</sup>P, # Kt

Korelacija s ocjenom svidanja: r < -0,7; r od -0,5 do -0,7; r > 0,7

**Tablica 41.** Utjecaj prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta na aromu kruha određenu senzorskom analizom (p-vrijednosti značajnih utjecaja i opis utjecaja na intenzitet pojedinog atributa arome×)

Atributi	P*	F u PF <sup>#</sup>	G u PG <sup>□</sup>	PF*	PG*	E*	Kt*	PF s Kt <sup>#</sup>	A s Kt <sup>#</sup>	E s Kt <sup>#</sup>	AE s Kt <sup>#</sup>	AEPF s Kt <sup>#</sup>	KtAEPF*
<b>Slatko</b>									< 0,001 ↓			0,036 ↑	0,017 ↑
<b>Slano</b>	< 0,001 ↓			0,019 ↓	0,032 ↓								
<b>Kiselost</b>	0,032 ↓			0,005 ↓									
<b>Gorko</b>	0,001 ↓	0,031 ↑		0,017 ↓	0,005 ↓	0,028 ↓		0,022 ↓	0,020 ↓				
<b>Sveukupno kiselost</b>									0,043 ↓				
<b>Mliječno</b>	0,043 ↓	0,007 ↑	0,011 ↑	0,041 ↑	0,025 ↑							0,031 ↑	0,026 ↑
<b>Tijesto</b>	0,004 ↓			0,004 ↓		0,050 ↓			0,031 ↓			0,003 ↓	0,027 ↓
<b>Kvasac</b>	0,006 ↓		0,041 ↓	0,010 ↓	0,005 ↓								0,039 ↓
<b>Riža</b>											0,034 ↑		0,033 ↑
<b>Kukuruz</b>								0,017 ↑				0,012 ↑	
<b>Žitarice</b>		0,027 ↓	0,006 ↓		0,039 ↓			0,037 ↑		0,020 ↑			
<b>Grašak</b>	0,002 ↓			0,001 ↓	0,001 ↓	0,007 ↓	0,034 ↓	0,026 ↓	0,050 ↓			0,028 ↓	0,001 ↓
<b>Orašasto</b>							0,041 ↓	0,014 ↑	0,028 ↑		0,012 ↑		
<b>Prašnjavo, zagušljivo</b>	0,001 ↓	0,045 ↓		0,001 ↓	0,001 ↓	0,003 ↓	0,006 ↓	0,022 ↓	0,048 ↓	0,019 ↓	0,024 ↓	0,018 ↓	0,001 ↓
<b>Kokice</b>		0,019 ↓	0,022 ↓	0,031 ↓	0,032 ↓		0,020 ↓	0,009 ↑		0,004 ↑	0,001 ↑	0,001 ↑	
<b>Pečeno</b>												0,012 ↑	0,004 ↑
<b>Masno</b>			0,041 ↑						0,017 ↓				
<b>Užeglo</b>													
<b>Svježi kruh</b>												0,014 ↑	0,015 ↑
<b>Naknadni gorki okus</b>	0,002 ↓	0,011 ↑	0,016 ↑	0,005 ↓	0,004 ↓			0,018 ↓	< 0,001 ↓			0,001 ↓	0,011 ↓
<b>Naknadna aroma graška</b>	< 0,001 ↓			< 0,001 ↓	0,001 ↓		0,001 ↓	0,003 ↓	0,050 ↓				0,001 ↓
<b>Ocjena svidanja</b>	0,002 ↑			0,001 ↑	0,003 ↑	0,008 ↑		0,006 ↑	0,028 ↑			0,002 ↑	< 0,001 ↑

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

× ↑ - povećanje, ↓ - smanjenje intenziteta atributa

Uzorak uspoređen s uzorkom: \*0, □P, #Kt

Korelacija s ocjenom svidanja: r < -0,7; r od -0,5 do -0,7; r > 0,7



Prema dobivenim rezultatima, dodatak prolina u krušno tijesto nije utjecao niti na jedan atribut mirisa sredine i kore koji je u snažnoj korelaciji s ocjenom svidanja. U kori kruha s njegovim dodatkom utvrđeno je povećanje intenziteta mirisa po pečenom. Dodatak prolina utjecao je na smanjenje intenziteta nepoželjne arome i naknadne arome graška te prašnjave, zagušljive arome kruha. Bredie i sur. (2006) su utvrdili povećanje intenziteta gorkog okusa s dodatkom 1 % prolina na masu brašna. Nasuprot tome, u ovom istraživanju određeno je smanjenje intenziteta gorkog i naknadnog gorkog okusa kruha s dodatkom prolina.

Dodatak glukoze u krušno tijesto utjecao je na smanjenje intenziteta nepoželjnog mirisa sredine kruha po grašku, a povećanje intenziteta mirisa kore po izgorenom. Bredie i sur. (2006) su također utvrdili povećanje intenziteta mirisa i arome kruha po izgorenom s dodatkom 1 % glukoze na masu brašna. U slučaju dodatka fruktoze nije utvrđen takav utjecaj. Dodatak glukoze i fruktoze utjecao je na smanjenje intenziteta poželjne arome žitarica, dok je samo dodatak glukoze utjecao na povećanje intenziteta nepoželjne masne arome, a samo dodatak fruktoze na smanjenje intenziteta nepoželjne prašnjave, zagušljive arome. Utvrđen je i utjecaj dodatka navedenih šećera na povećanje intenziteta gorkog i naknadno gorkog okusa.

Kod kruha s dodatkom kombinacije prolina i glukoze (PG) te prolina i fruktoze (PF) u krušno tijesto utvrđen je smanjeni intenzitet nepoželjnog mirisa sredine po grašku i povećani intenzitet mirisa kore po izgorenom. U slučaju dodatka prolina i glukoze također je utvrđen i utjecaj na smanjenje intenziteta nepoželjnog mirisa sredine po sirovom tijestu i kikirikiju, koji nije zabilježen pojedinačno za prolin ili glukozu, te smanjeni intenzitet arome žitarica što bi se moglo pripisati utjecaju glukoze. Kod kruha s dodatkom kombinacije prolina i glukoze te prolina i fruktoze u krušno tijesto utvrđen je smanjeni intenzitet arome i naknadne arome graška te prašnjave, zagušljive arome koji je utvrđen i u slučaju dodatka samo prolina. Nadalje, iako je utvrđeno povećanje gorkog i naknadno gorkog okusa s dodatkom glukoze i fruktoze, u kruhu s dodatkom njihove kombinacije s prolinom utvrđen je smanjeni intenzitet istih, a što bi se moglo pripisati utjecaju prolina. Kao u slučaju dodatka samo prolina i fruktoze (PF), i u slučaju njihovog dodatka u kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta (KtPF) utvrđeno je smanjenje intenziteta nepoželjnog mirisa sredine po grašku, arome i naknadne arome graška, prašnjave, zagušljive arome, gorkog i naknadnog gorkog okusa. No, kod njihovog dodatka u kombinaciji s kiselim tijestom nije utvrđeno povećanje intenziteta mirisa kore po izgorenom, a došlo je do povećanja intenziteta poželjne arome žitarica.

U kruhu s dodatkom enzima proteaza u krušno tijesto (E) utvrđen je manji intenzitet nepoželjnog mirisa sredine po grašku, sirovom tijestu, arome graška, prašnjave, zagušljive

arome te veći intenzitet mirisa kore po izgorenom. U kruhu s dodatkom proteaza u kiselo tijesto (KtE) je također utvrđen manji intenzitet nepoželjnog mirisa sredine po grašku, prašnjave, zagušljive arome te veći intenzitet mirisa kore po izgorenom. U usporedbi s kruhom u kojem su proteaze dodane u krušno tijesto, u kruhu s dodatkom proteaza u kiselo tijesto nije utvrđen njegov utjecaj na intenzitet mirisa sredine po sirovom tijestu i aromu graška, no utvrđen je manji intenzitet nepoželjnog mirisa sredine po kikirikiju i kokicama, veći intenzitet poželjne arome žitarica i mirisa kore po prženom šećeru. Različiti utjecaji dodatka enzima u krušno i kiselo tijesto može biti posljedica različitog vremena njihove aktivnosti (kraćeg u krušnom odnosno dužeg u kiselom tijestu) i/ili procesa kiseljenja pri kojem dolazi do promjene aktivnosti enzima uslijed promjene pH te značajnih promjena u profilu hlapljivih spojeva arome kojima proteaze doprinose u manjoj ili većoj mjeri.

Prema dobivenim rezultatima, u kruhu s dodatkom kiselog tijesta s argininom (KtA) utvrđen je manji intenzitet nepoželjnog mirisa sredine po kikirikiju, arome i naknadne arome graška, masne, prašnjave, zagušljive arome, gorkog i naknadnog gorkog okusa te manji intenzitet poželjnog slatkog okusa u odnosu na kruh s kiselim tijestom bez dodatka arginina (Kt).

U odnosu na kruh s dodatkom samo kiselog tijesta (Kt), u kruhu s dodatkom kiselog tijesta s argininom i proteazama (KtAE) utvrđeno je smanjenje intenziteta nepoželjnog mirisa sredine po grašku, kikirikiju, kokicama i prašnjave, zagušljive arome. Ni jedan od navedenih utjecaja nije utvrđen samo u slučaju dodatka kombinacije arginina i enzima, već su utvrđeni i kod pojedinačnog dodatka arginina i/ili enzima. Ostali utjecaji određeni pri pojedinačnom dodatku enzima ili arginina, pri dodatku njihove kombinacije nisu utvrđeni.

U usporedbi s utjecajem dodatka samo kiselog tijesta (Kt), pri dodatku enzima i arginina u kiselo tijesto, prolina i fruktoze u krušno tijesto (KtAEPF) utvrđen je dodatni značajan utjecaj na povećanje poželjnog slatkog okusa i arome svježeg kruha te mirisa kore po izgorenom i arome pečenog. Utvrđeni značajni utjecaji kombinacije navedenih dodataka na ostale atribute koji su bili u snažnoj korelaciji s ocjenom sviđanja (smanjenje intenziteta mirisa sredine po grašku, kikirikiju, arome i naknadne arome graška, prašnjave, zagušljive arome) su prethodno određeni i kod njihove pojedinačne ili kombinirane primjene u pripremi kruha.

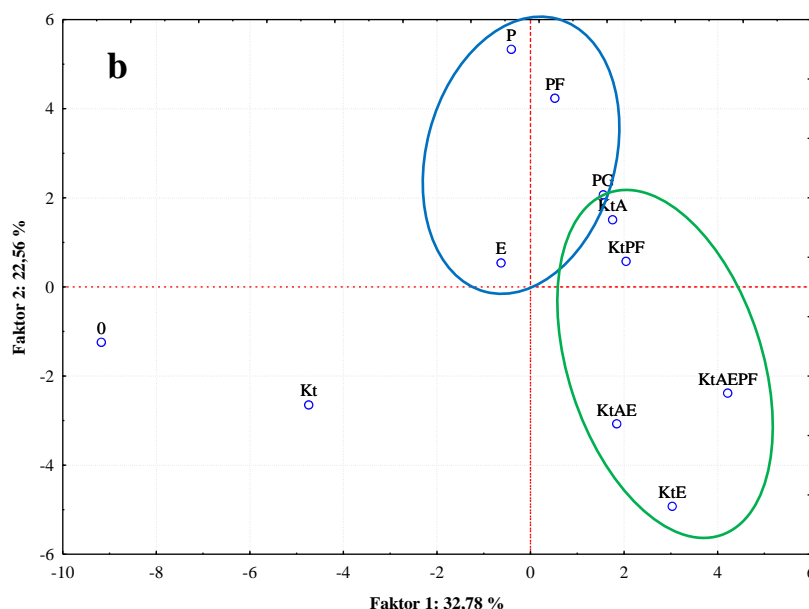
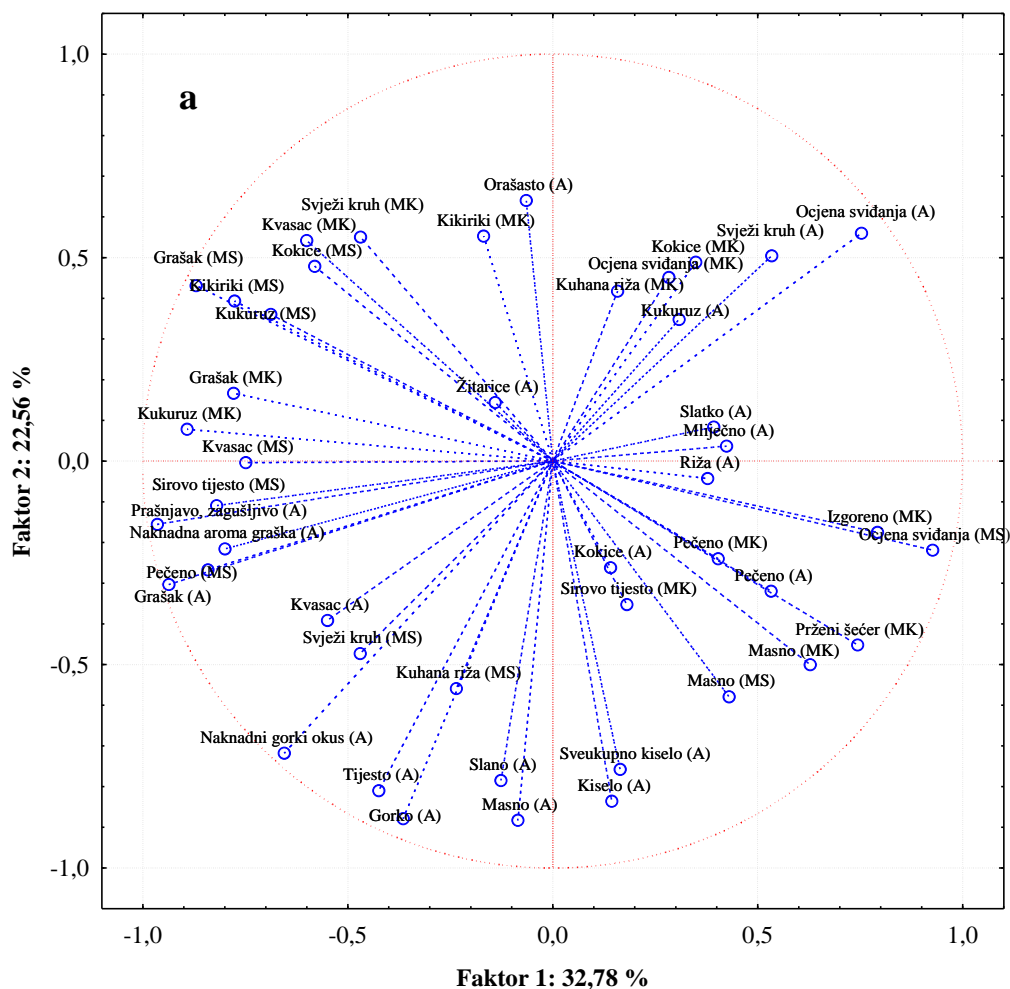
Prema rezultatima drugih istraživača, s dodatkom šećera i aminokiselina kao prekursora hlapljivih spojeva arome povećava se preferencija mirisa bezglutenskog kruha (Pacyński i sur., 2015), a s dodatkom proteaza prihvatljivost arome keksa (Hassan i sur., 2014). U ovom istraživanju je također utvrđen pozitivan utjecaj dodatka svih prekursora hlapljivih spojeva

arome (osim u slučaju dodatka prolina (P) i prolina i fruktoze (PF)), enzima, kiselog tijesta i njihovih kombinacija na prihvatljivost mirisa sredine kruha. Nasuprot tome, ni jedan od navedenih dodataka nije značajno utjecao na prihvatljivost mirisa kore. Većina navedenih dodataka i njihove kombinacije utjecali su na povećanje prihvatljivosti arome kruha. Prema dobivenim rezultatima, fruktoza i glukoza dodane u krušno tijesto te enzimi proteaze samostalno ili u kombinaciji s argininom dodani u kiselo tijesto nisu doveli do povećanja prihvatljivosti arome. U slučaju navedenih dodataka nije utvrđeno ni značajno smanjenje intenziteta nepoželjnog mirisa sredine, arome i naknadne arome graška, što je mogući razlog neutvrđene razlike u ocjeni sviđanja s njihovim dodatkom u navedenim kombinacijama.

U poglavlju 4.2.6. opisane su značajne korelacije između intenziteta pojedinih atributa mirisa i arome te koncentracije analiziranih hlapljivih spojeva. Kao što je već navedeno, intenzitet mirisa i/ili arome po grašku bio je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom 1-heksanola, (Z)-3-heksenola, 1-heptanola i heksanala koje karakterizira miris i/ili aroma po zelenom i travi te s koncentracijom 1-pentanola, pentanala i 2-heptanona. Kod uzoraka s manjom koncentracijom navedenih spojeva utvrđen je i manji intenzitet mirisa i/ili arome po grašku. Nadalje, utvrđena razlika u intenzitetu mirisa po pečenom, prženom šećeru, svježem kruhu i izgorenom bila je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom analiziranih pirazina, pirola i furana koje karakterizira miris i/ili aroma po kori kruha, pečenom, tostiranom, smeđem, kokicama, orašastom, izgorenom i karameli. Povećanje intenziteta mirisa masnog je također bilo u korelaciji s povećanjem koncentracije navedenih pirazina, pirola i furana, no i 2,3-pentandiona kojeg karakterizira slatki, masni, karamelasti, orašasti miris i miris maslaca; zatim benzaldehida kojeg karakterizira oštri, orašasti, karamelasti miris te dimetil-disulfida kojeg karakterizira miris sumpora, kupusa i luka. Značajna pozitivna korelacija intenziteta slatkog i gorkog okusa nije utvrđena ni s jednim analiziranim hlapljivim spojem. Utvrđeno povećanje intenziteta slatkog okusa moguća je posljedica dodatka šećera u pojedine recepture. Nadalje, utvrđeno povećanje intenziteta gorkog okusa u slučaju dodatka glukoze i fruktoze (usporedba kruha PG i PF u odnosu na P) moguća je posljedica povećane koncentracije gorkih produkata karamelizacije (Pico i sur., 2015). Povećanje intenziteta arome kukuruza i žitarica moguća je posljedica veće koncentracije 2-metil-1-propanola i etil-benzoata te smanjenja koncentracije spojeva odgovornih za zelenu aromu koji su maskirali aromu kukuruza i žitarica. Nadalje, utvrđenom smanjenju intenziteta mirisa po kvascu i tijestu doprinijelo je smanjenje koncentracije pojedinih alkohola, poput 2-metil-1-propanola kojeg karakterizira alkoholni i slatki miris. Osim navedenih spojeva, i drugi spojevi za koje je

utvrđena slabija korelacija s pojedinim atributima mirisa/arome su također mogli utjecati na njihov intenzitet.

Rezultati PCA analize intenziteta atributa mirisa sredine i kore te arome uzoraka bezglutenskog kruha s dodatkom kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima prikazani su na slici 42.



**Slika 42.** Faktorsko opterećenje (engl. *loadings*) (a) i faktorski bodovi (engl. *scores*) (b) dobiveni PCA analizom intenziteta atributa mirisa sredine (MS) i kore (MK) te arome (A) uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

Faktori 1 i 2 opisuju 55,34 % ukupne varijance. Iz prikaza faktorskih bodova atributa mirisa i arome kruha vidljivo je jasno odvajanje uzorka kruha bez dodataka (0), kruha s dodatkom kiselog tijesta (Kt) te uzoraka kruha s dodatkom kiselog tijesta i/ili prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima prema faktoru 1. Faktor 1 bio je u negativnoj korelaciji ( $r < -0,7$ ) ponajviše s mirisom i aromom graška, prašnjavom, zagušljivom aromom, mirisom sredine po kvascu, sirovom tijestu, kikirikiju, pečenom, a kore po kukuruzu te su navedeni atributi više karakterizirali uzorke kruha 0 i Kt. Faktor 1 bio je u pozitivnoj korelaciji ( $r > 0,7$ ) ponajviše s ocjenom sviđanja mirisa sredine i arome kruha, mirisom kore po prženom šećeru i izgorenom koji su više karakterizirali uzorke kruha s dodatkom kiselog tijesta i/ili prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Nadalje, vidljivo je i odvajanje uzoraka po faktoru 2 ovisno o dodatku prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima, bez ili u kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta. Pri tome su uzorke s dodatkom kombinacije kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima karakterizirali izraženiji osnovni okusi, aroma tijesta i masnog koji su bili u negativnoj korelaciji ( $r < -0,7$ ) s faktorom 2. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je utvrđena veća razlika između mirisa i arome kruha bez i s dodatkom prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima nego ovisno o njihovom dodatku bez ili u kombinaciji s kiselim tijestom.

Prema rezultatima analize profila poželjnosti metodom općih linearnih modela (tablica 42), s obzirom na ocjenu sviđanja mirisa sredine i kore kruha te arome kruha, kruh KtAEPF se pokazao najpoželjnijim s ocjenom sviđanja mirisa i arome „umjereno mi se sviđa“ te je navedena receptura korištena u daljnjim eksperimentima.

**Tablica 42.** Faktori poželjnosti uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima, izračunati na temelju ocjena sviđanja mirisa i arome

Uzorak	Faktor poželjnosti
<b>0</b>	0,00
<b>P</b>	0,50
<b>PF</b>	0,51
<b>PG</b>	0,61
<b>E</b>	0,40
<b>Kt</b>	0,32
<b>KtPF</b>	0,66
<b>KtA</b>	0,70
<b>KtE</b>	0,00
<b>KtAE</b>	0,56
<b>KtAEPF</b>	0,72

Oznake uzoraka: 0 – bez dodataka; dodaci: P – prolin, G – glukoza, F – fruktoza, E – enzimi proteaze, Kt – kiselo tijesto pripremljeno s *L. brevis*, A – arginin

U odnosu na pšenični bijeli kruh, kruh KtAEPF karakterizirao je očekivani veći intenzitet nepoželjnog mirisa sredine po grašku, arome graška i masnog, a manji intenzitet poželjnog mirisa kore i arome svježeg kruha te arome žitarica.

#### 4.4. Optimizacija udjela dodanog kiselog tijesta

Poznato je kako kiselo tijesto može pozitivno djelovati na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva te prihvatljivost kruha, no udjel dodanog kiselog tijesta treba biti optimiziran s obzirom na primijenjene sirovine i druge uvjete procesa proizvodnje kruha (Hansen i Hansen, 1996; Rózylo i sur., 2015). Stoga je u ovom dijelu istraživanja ispitan utjecaj dodatka 10 %, 20 % i 30 % kiselog tijesta na fizikalno-kemijska (pH, ukupnu kiselost, boju, specifični volumen, teksturu) i senzorska svojstva kruha. Za pripremu kruha s dodatkom kiselog tijesta korištena je receptura s brašnom žutog graška, dodatkom prolina i fruktoze u krušno tijesto te enzima proteaza i arginina u kiselo tijesto koje je pripravljeno s *L. brevis* (KtAEPF), a koja se u prethodnom dijelu istraživanja pokazala senzorski najpoželjnijom. Osim toga, navedena svojstva kruha KtAEPF s 10 %, 20 % i 30 % kiselog tijesta uspoređena su sa svojstvima kruha bez brašna žutog graška i navedenih dodataka (0-G), odnosno početnom recepturom u ovom istraživanju. Prije početka eksperimenta, optimizirano je vrijeme fermentacije kruha KtAEPF, a što je opisano u poglavlju 3.2.2.

##### 4.4.1. Fizikalno-kemijska svojstva kruha

U tablici 43 prikazani su rezultati određivanja pH i ukupne kiselosti kruha.

**Tablica 43.** pH i ukupna kiselost uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta

	pH				Ukupna kiselost			
<b>0-G</b>	7,28	±	0,02	a	2,71	±	0,03	d
<b>KtAEPF, 10 % KT</b>	6,91	±	0,02	b	3,83	±	0,05	c
<b>KtAEPF, 20 % KT</b>	6,46	±	0,02	c	5,86	±	0,15	b
<b>KtAEPF, 30 % KT</b>	6,11	±	0,06	d	7,34	±	0,22	a

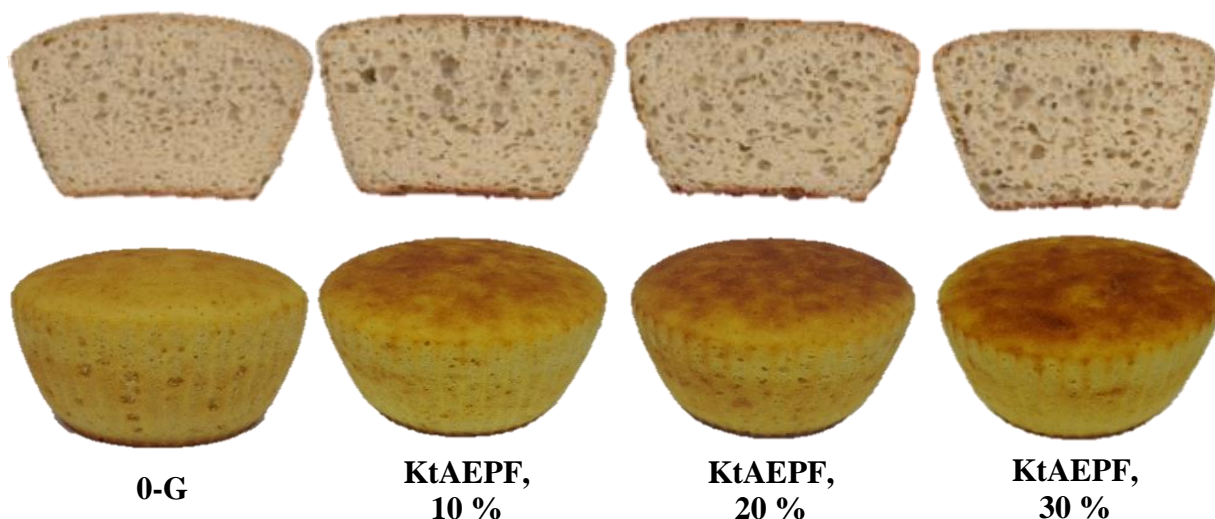
\*Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ )

Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

U kruhu s većim udjelom dodanog kiselog tijesta utvrđen je manji pH i veća ukupna kiselost. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima drugih istraživača prema kojima s povećanjem udjela kiselog tijesta dodanog u kruh također dolazi do smanjenja pH, povećanja koncentracije mliječne i octene kiseline te ukupne kiselosti (Galle i sur., 2012; Moroni i sur., 2012; Novotni i sur., 2012; Rózylo i sur., 2015; Torrieri i sur., 2014).

Na slici 43 prikazan je poprečni presjek i vanjski izgled analiziranih uzoraka kruha.



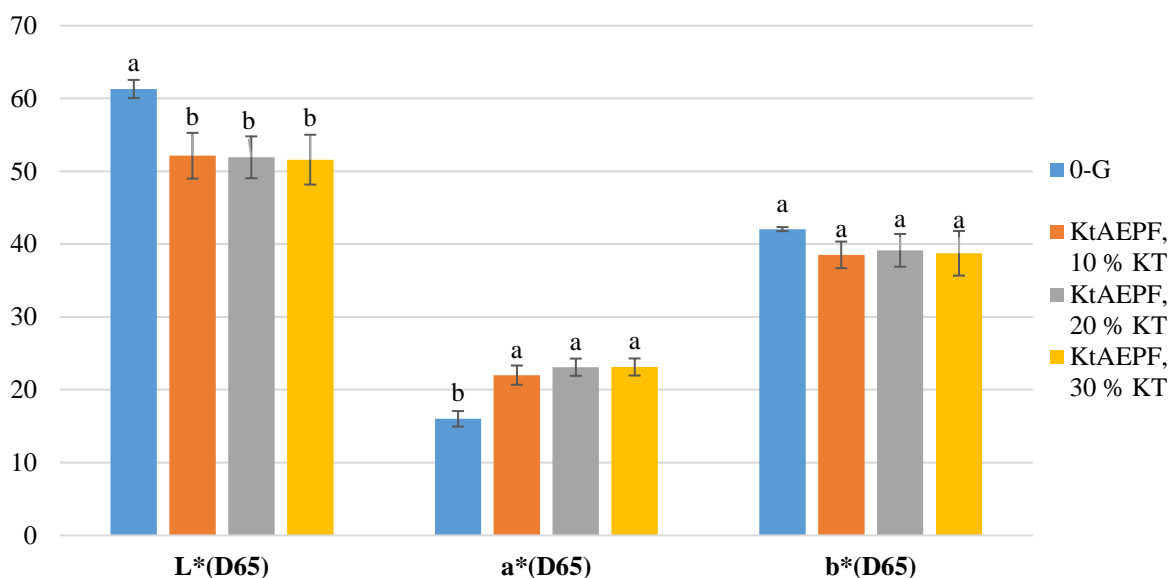


**Slika 43.** Poprečni presjek i vanjski izgled uzoraka bezglutenskog kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta. Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

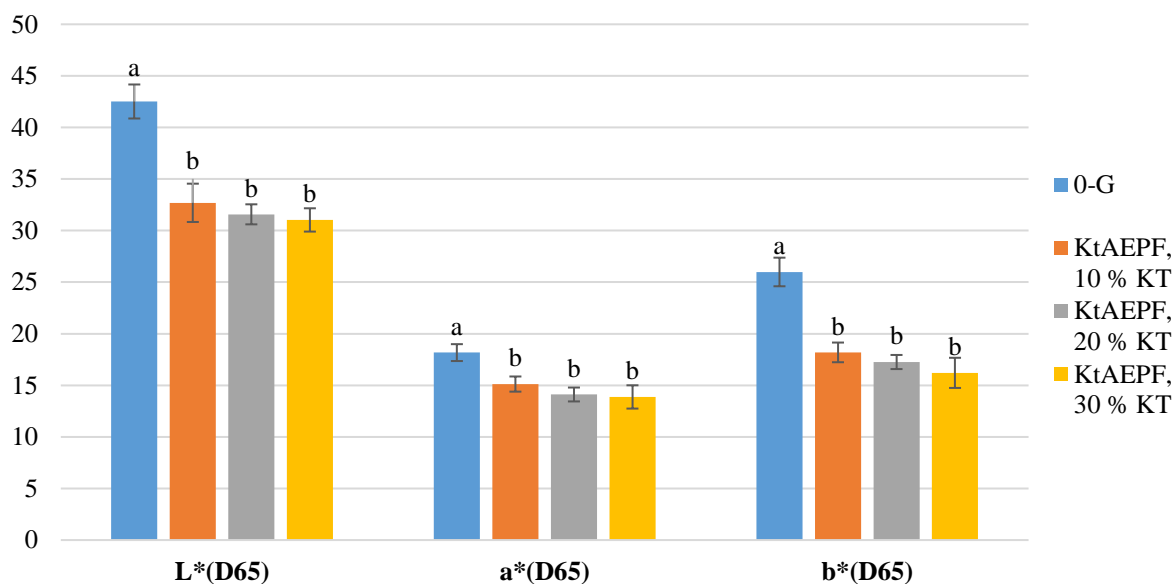
Veličina pora i ukupna poroznost u kruhu KtAEPF povećavala se s udjelom dodanog kiselog tijesta. Moore i sur. (2007), Rózylo i sur. (2015), Wolter i sur. (2014) su također utvrdili povećanje veličine pora i/ili ukupne poroznosti bezglutenskog kruha s dodatkom kiselog tijesta, što je moguća posljedica povećanja proizvodnje CO<sub>2</sub> tijekom fermentacije (Gobbetti i sur., 1995a). Također, budući da proteini mogu značajno utjecati na strukturu bezglutenskog kruha djelujući na vezanje vode i stabilizaciju škrobnog gela (Ziobro i sur., 2016), i dodatak brašna žutog graška koje je bogato proteinima dobrih funkcionalnih svojstava (sposobnosti vezanja vode, stvaranja gelova, pjenjenja i emulgirajućim svojstava) (Agboola i sur., 2010; Aluko i sur., 2009; Toews i Wang, 2013) mogao je utjecati na poroznost kruha i dovesti do razlike u odnosu na kruh bez njegovog dodatka. Ziobro i sur. (2016) su utvrdili kako je s dodatkom izolata proteina graška došlo do povećanja veličine pora i ukupne poroznosti bezglutenskog kruha. Osim toga, nakon tretmana s proteazama također može doći do poboljšanja funkcionalnih svojstava brašna graška (Periago i sur., 1998), a koje se moglo odraziti na poroznosti. Prema rezultatima Shen i sur. (2018), dodatak fruktoze nije utjecao na poroznost pšeničnog kruha.

Boja kore jedan je od ključnih faktora koji utječu na prihvatljivost kruha od strane potrošača. Do posmeđivanja, odnosno razvoja žuto-zlatne do smeđe boje kore kruha, dolazi uslijed Maillardove reakcije i reakcija karamelizacije pri pečenju kruha. U konačnici boja kruha ovisi

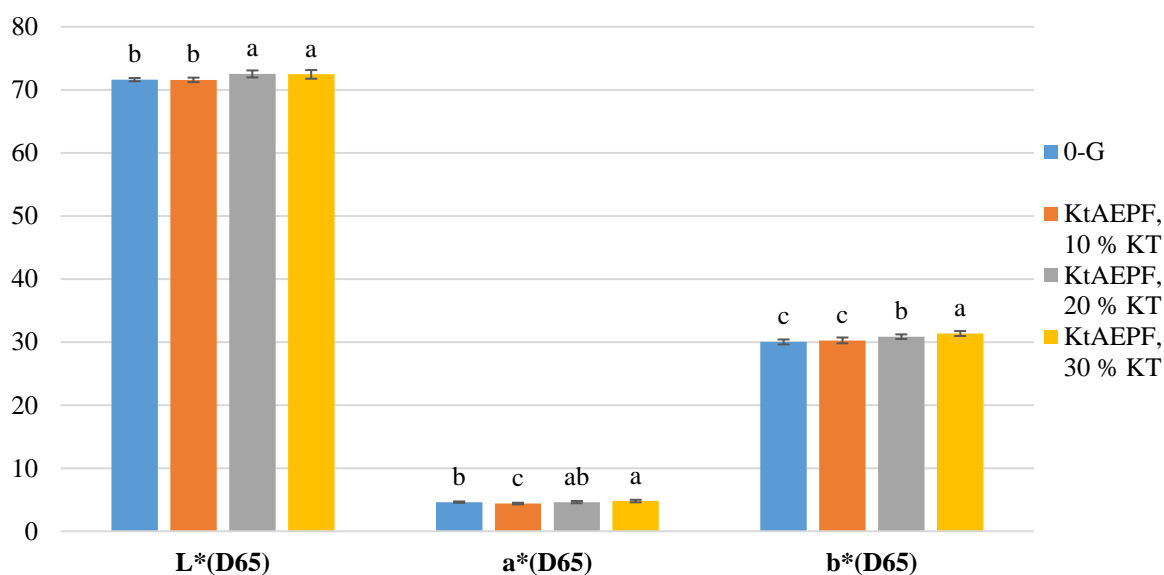
o recepturi za pripremu kruha (primijenjenim sirovinama, udjelu dostupnih šećera i aminokiselina, udjelu vode, pH) te uvjetima njegove pripreme (vremenu i temperaturi pečenja, prijenosu topline, relativnoj vlažnosti) (Purlis, 2010). Na slici 43 vidljiva je i tamnija boja gornje kore kruha KTAEPF u odnosu na 0-G, što je u skladu s rezultatima određivanja parametara boje pomoću kolorimetra. Rezultati određivanja parametara boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) gornje i donje kore te sredine kruha prikazani su na slikama 44, 45 i 46.



**Slika 44.** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) gornje kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta



**Slika 45.** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) donje kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

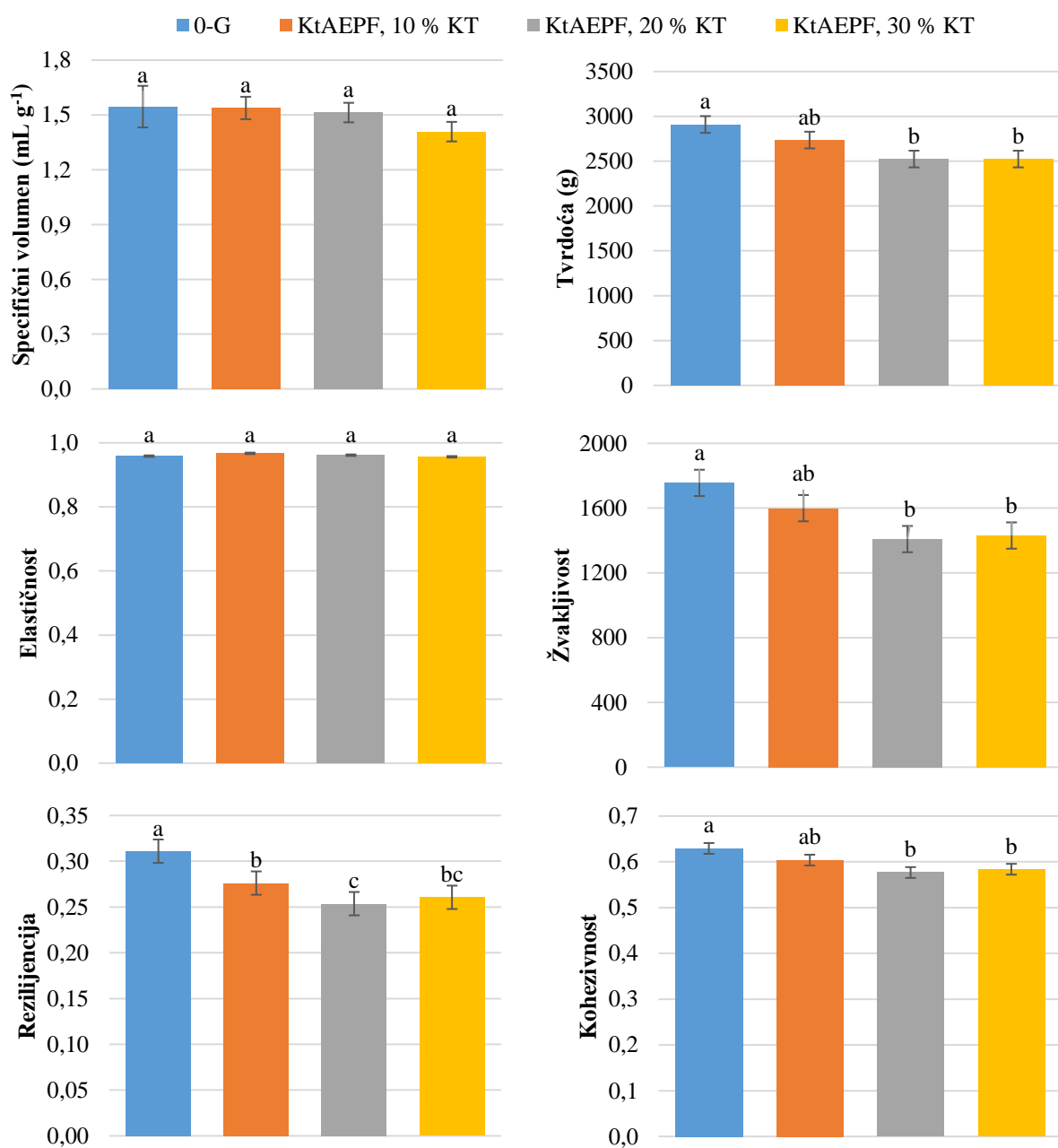


**Slika 46.** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) sredine uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

Gornja kora kruha KTAEPF je u odnosu na kruh 0-G bila tamnija (oko 15 %), s većim intenzitetom crvene boje (od 37 % do 44 %, ovisno o dodanom udjelu kiselog tijesta). Značajna promjena intenziteta žute boje gornje kore nije utvrđena. Donja kora kruha KTAEPF je u odnosu na kruh 0-G bila tamnija (od 23 % do 27 %), s manjim intenzitetom crvene (od 17 % do 24 %) i žute boje (od 30 % do 38 %). Različiti udjel dodanog kiselog tijesta (od 10 % do 30 %) nije utjecao na razliku u navedenim parametrima boje gornje i donje kore. U odnosu na kruh 0-G, kod kruha KTAEPF s dodatkom 20 % i 30 % kiselog tijesta određena je i 1 % svjetlija sredina s od 3 % do 4 % većim intenzitetom žute boje, a kod kruha KtAEPF s dodatkom 10 % kiselog tijesta 5 % manji intenzitet crvene boje. S povećanjem udjela kiselog tijesta došlo je do povećanja svjetline (1 %), intenziteta crvene (9 %) i žute boje sredine kruha (4 %). Prema literaturi, dodatak kiselog tijesta može utjecati na boju kore kruha. Smanjeni pH kiselog tijesta dovodi do smanjenja pH krušnog tijesta, a manji pH pospješuje inicijalnu fazu Maillardove reakcije (Parker, 2015). Također, i proteolitička aktivnost enzima pri kiseljenju tijesta može doprinijeti povećanju koncentracije aminokiselina koje su prekursori za nastanak obojenih spojeva (De Vuyst i sur., 2009; Gänzle i sur., 2007). Cappa i sur. (2016b) su utvrdili kako je dodatak kiselog tijesta u bezglutenski kruh doveo do svjetlije sredine te tamnije kore s većim intenzitetom crvene i žute boje. Bourré i sur. (2019) su utvrdili tamniju i crveniju koru pšeničnog kruha s dodatkom kiselog tijesta na bazi brašna žutog graška u odnosu na nefermentirano brašno žutog graška. Nasuprot tome, prema rezultatima Moore i sur. (2007) te Üçok i Hayta (2015), dodatak do 30 % kiselog tijesta nije utjecao na značajnu promjenu boje sredine i/ili kore bezglutenskog kruha. Kao što je već navedeno, šećeri i aminokiseline su prekursori za nastanak boje. Stoga udjel i vrsta šećera i aminokiselina u recepturi značajno utječu na razvoj boje kruha pri pečenju (Ait Ameer i sur., 2007; Shen i sur., 2019, 2018). U brašnu žutog graška određen je veći udjel jednostavnih šećera u odnosu na rižino integralno brašno (tablica 9), što je također moglo utjecati na boju kruha. Također, budući da je u kruh KTAEPF dodana fruktoza, moglo je doći i njenog utjecaja na boju konačnog proizvoda. Prema istraživanju Shen i sur. (2018), pšenični bijeli kruh s dodatkom fruktoze imao je tamniju koru s većim intenzitetom crvene i manjim intenzitetom žute boje. Nadalje, Hidalgo i Brandolini (2011) su utvrdili snažnu negativnu korelaciju udjela fruktoze i svjetline te pozitivnu korelaciju udjela fruktoze i intenziteta crvene boje kore kruha. Dodatak slobodnih aminokiselina prolina i arginina te fungalne proteaze je također mogao utjecati na boju kruha KTAEPF. Shen i sur. (2019) su utvrdili kako je dodatak prolina i arginina doveo do tamnije kore pšeničnog kruha, s manjim intenzitetom

žute boje. Prema rezultatima Kawamura-Konishi i sur. (2013), tretman rižinog brašna proteazom nije značajno utjecao na boju sredine bezglutenskog kruha. I brašno graška može utjecati na boju kruha. Matos i sur. (2014), Pico i sur. (2019b) te Ziobro i sur. (2013b) su kod kruha i/ili *muffina* s dodatkom izolata proteina graška ili brašna žutog graška utvrdili tamniju boju kore kruha i sredine *muffina* s većim intenzitetom crvene i žute boje. Ficco i sur. (2018) su odredili smanjenje svjetline, intenziteta žute i crvene boje kore pšeničnog kruha s povećanjem udjela brašna žutog graška do 30 %. S obzirom na rezultate dobivene u ovom istraživanju, može se zaključiti kako različit udjel dodanog kiselog tijesta nije utjecao na značajnu promjenu boje kore i sredine kruha. Boja uzoraka kruha 0-G i KtAEPF se razlikovala te je pri tome utvrđena izraženija razlika u boji kore nego sredine kruha.

Na slici 47 prikazani su rezultati određivanja specifičnog volumena i parametara teksture sredine kruha.



**Slika 47.** Specifični volumen i parametri teksture (tvrdoća, elastičnost, žvakljivost, rezilijencija, kohezivnost) uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

Specifični volumen predstavlja omjer volumena i mase kruha (mL g<sup>-1</sup>). Prema dobivenim rezultatima, nije utvrđena značajna razlika u specifičnom volumenu kruha ovisno o dodatku brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjelu dodanog kiselog

tijesta, a što je moguća posljedica suprotnog utjecaja pojedinih dodataka. Prema literaturi, utjecaj kiselog tijesta na volumen kruha ovisi o primijenjenim sirovinama i soju bakterija te stupnju zakiseljavanja (Bender i sur., 2018a; Katina i sur., 2006). O sastavu sirovina ovisi struktura i sposobnost zadržavanja plina u tijestu (Zannini i sur., 2012), polisaharidi bubre pri manjem pH (Moore i sur., 2008) te pojedine bakterije mliječne kiseline proizvode egzopolisaharide (Torrieri i sur., 2014), a što može pozitivno utjecati na volumen kruha. Sukladno rezultatima ovog istraživanja, ni Moore i sur. (2007) nisu utvrdili značajan utjecaj dodatka kiselog tijesta na specifični volumen bezglutenskog kruha, a što su pripisali nedostatku glutenske mreže na koju bi moglo pozitivno djelovati. Nasuprot tome, Üçok i Hayta (2015) su utvrdili smanjenje specifičnog volumena do 15 %, a Cappa i sur. (2016b) te Novotni i sur. (2012) povećanje specifičnog volumena do 20 % odnosno 35 % s dodatkom kiselog tijesta u bezglutenski kruh. Proteini graška su također potencijalno mogli doprinijeti volumenu bezglutenskog kruha uslijed utjecaja na strukturu kruha radi svoje sposobnosti bubrenja i emulgirajućih svojstava (Agboola i sur., 2010; Aluko i sur., 2009). No unatoč tome, Matos i sur. (2014) te Ziobro i sur. (2013b) nisu utvrdili značajan utjecaj dodatka izolata proteina graška na volumen bezglutenskog kruha i *muffina*, dok su (Pico i sur., 2019b) utvrdili smanjenje volumena bezglutenskog kruha s dodatkom proteina graška. Također, prema dosadašnjim istraživanjima je dodatak graška u pšenični kruh utjecao isključivo na smanjenje njegovog volumena (Bourré i sur., 2019; Dabija i sur., 2017; Ficco i sur., 2018; Kamaljic i sur., 2010; Sadowska i sur., 2003), a što je pripisano razrjeđenju, odnosno smanjenju koncentracije glutena (Dabija i sur., 2017). Kawamura-Konishi i sur. (2013) ispitali su utjecaj tretmana proteazama na kvalitetu rižinog bezglutenskog kruha i utvrdili kako proteaza A, koja je korištena i u ovom istraživanju, ne dovodi do značajne razlike u volumenu kruha. Nasuprot tome, Hamada i sur. (2013) te Renzetti i Arendt (2009b) utvrdili su veći volumen bezglutenskog kruha nakon tretmana rižinog brašna proteazom što objašnjavaju interakcijom škroba i djelomično hidroliziranih proteina koja dovodi do olakšanog zadržavanja plina. Budući da su šećeri, uključujući fruktozu koja je dodana u kruh KTAEPF, supstrat za fermentaciju tijekom koje nastaje CO<sub>2</sub> odgovoran za povećanje volumena kruha (Gobbetti i sur., 1995a), njihov dodatak je također mogao utjecati na volumen kruha. U skladu s tim, Shen i sur. (2018) su utvrdili povećanje volumena pšeničnog kruha s dodatkom fruktoze.

Parametri teksture određeni su TPA testom s dvostrukom kompresijom te je iz dobivenog prikaza ovisnosti sile o vremenu analize izračunata tvrdoća, elastičnost, žvakljivost,

rezilijencija i kohezivnost kruha. Tvrdoća označava maksimalnu silu pri prvoj kompresiji. Elastičnost (engl. *springiness*) opisuje sposobnost povratka kruha u početno stanje nakon deformacije. Žvakljivost predstavlja odnos gumenosti i elastičnosti. Rezilijencija opisuje sposobnost povratka kruha na početnu visinu. Kohezivnost podrazumijeva koliko kruh podnosi drugu kompresiju u usporedbi s prvom („Texture Profile Analysis“, 2020). Prema dobivenim rezultatima prikazanim na slici 47, različit udjel dodanog kiselog tijesta nije utjecao na značajnu promjenu većine parametara teksture, osim rezilijencije, pri čemu je najmanja rezilijencija utvrđena kod kruha s dodatkom 20 % kiselog tijesta. U odnosu na kruh 0-G, u kruhu KtAEPF s dodatkom 20 % i 30 % kiselog tijesta utvrđeno je smanjenje tvrdoće (13 %), žvakljivosti (20 % i 19 %) i kohezivnosti (8 % i 7 %). Također, došlo je i do smanjenja rezilijencije od 11 % do 18 % u kruhu KTAEPF u odnosu na kruh 0-G, neovisno o udjelu dodanog kiselog tijesta. Razlika u elastičnosti analiziranih uzoraka nije utvrđena. Prema literaturi, tvrdoća kruha značajno utječe na prihvatljivost kruha, a povezana je s poroznošću sredine i svojstvima stijenki pora. Što je sredina kruha zbijenija, gušća i manje porozna, to je tvrdoća kruha veća, a prihvatljivost manja (Cappa i sur., 2016b). Sukladno rezultatima ovog istraživanja su i Rózylo i sur. (2015) utvrdili smanjenje tvrdoće bezglutenskog kruha s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta do 40 %, a Novotni i sur. (2012) smanjenje čvrstoće bezglutenskog kruha s dodatkom od 15 % do 30 % kiselog tijesta. Üçok i Hayta (2015) utvrdili su smanjenje tvrdoće i žvakljivosti bezglutenskog kruha s dodatkom 10 % i 20 % kiselog tijesta, a povećanje s dodatkom 30 % kiselog tijesta. Moguće objašnjenje navedenog utjecaja je djelovanje manjeg pH na proteine i polisaharide tijesta koje dovodi do mekše sredine kruha (Bender i sur., 2018a). Nasuprot prethodno navedenim istraživanjima, Moore i sur. (2007) nisu utvrdili značajan utjecaj dodatka kiselog tijesta na tvrdoću bezglutenskog kruha. Što se tiče mogućeg utjecaja dodatka brašna žutog graška, prema rezultatima Ziobro i sur. (2013b) je dodatak izolata proteina graška utjecao na smanjenje tvrdoće i žvakljivosti bezglutenskog kruha. Nasuprot tome, prema rezultatima Dabija i sur. (2017) te Sadowska i sur. (2003) je dodatak brašna žutog graška negativno utjecao na teksturu pšeničnog kruha djelujući na povećanje njegove tvrdoće i žvakljivosti te smanjenje kohezivnosti. Elastičnost je također značajan parametar teksture. S njenim smanjenjem smanjuje se i prihvatljivost bezglutenskog kruha (Rózylo i sur., 2015). Nasuprot rezultatima ovog istraživanja, Üçok i Hayta (2015) su utvrdili smanjenje elastičnosti bezglutenskog kruha s dodatkom 20 % i 30 % kiselog tijesta, a Rózylo i sur. (2015) povećanje elastičnosti bezglutenskog kruha s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta do 40 %.



Smanjenje kohezivnosti povezuje se sa slabijom strukturom kruha (Schober i sur., 2005), a značajno smanjenje kohezivnosti očituje se povećanjem mrvljivosti kruha, što negativno utječe na njegovu prihvatljivost (Ziobro i sur., 2013b). Smanjeni pH kiselog tijesta i primjena proteaza mogu utjecati na strukturne komponente tijesta (Bender i sur., 2018a; Kieffer i sur., 1990), a što se može odraziti na teksturi kruha. Nasuprot rezultatima ovog istraživanja, prema rezultatima Uçok i Hayta (2015) te Ziobro i sur. (2013b), kiselo tijesto, kao ni proteini graška nisu imali značajan utjecaj na kohezivnost bezglutenskog kruha. Što se tiče utjecaja šećera i aminokiselina na teksturu kruha, Shen i sur. (2018) su utvrdili pozitivan utjecaj dodatka fruktoze na teksturu pšeničnog kruha uslijed smanjenja njegove tvrdoće i žvackljivosti, a Shen i sur. (2019) negativan utjecaj dodatka prolina i arginina uslijed povećanja njegove tvrdoće i žvackljivosti. Prema literaturi, dodatak proteaza je također mogao potencijalno pozitivno djelovati na teksturu bezglutenskog kruha. Periago i sur. (1998) su utvrdili kako tretman brašna graška proteazom poboljšava njegova funkcionalna svojstva (topljivost pri kiselom pH i emulgirajuća svojstva), a što je moglo pozitivno utjecati na teksturu kruha. Renzetti i Arendt (2009b) te Kawamura-Konishi i sur. (2013) utvrdili su značajan utjecaj tretmana proteazama na smanjenje tvrdoće i žvackljivosti bezglutenskog kruha, ali ne i nakon tretmana proteazom A koja je korištena u ovom istraživanju. S obzirom na dobivene rezultate, može se zaključiti kako povećanje udjela dodanog kiselog tijesta nije utjecalo na značajnu promjenu teksturalnih svojstva sredine bezglutenskog kruha. U odnosu na kruh 0-G, kod kruha KtAEPF s dodatkom 20 % i 30 % kiselog tijesta došlo je do poželjnog smanjenja tvrdoće i žvackljivosti te nepoželjnog smanjenja kohezivnosti, a kod kruha KtAEPF, neovisno o udjelu dodanog kiselog tijesta, do nepoželjnog smanjenja rezilijencije sredine kruha.

#### 4.4.2. Senzorska analiza

U okviru senzorske analize provedene su deskriptivna i hedonistička analiza mirisa kore i sredine kruha te arome kruha, deskriptivna analiza izgleda i teksture kruha te hedonistička analiza sveukupnog doživljaja i test nizanja po preferenciji. U tablicama 44, 45, 46 i 47 prikazani su rezultati analize varijance utjecaja uzorka i panelista na intenzitet atributa mirisa sredine i kore, atributa arome, izgleda i teksture uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i različitog udjela kiselog tijesta. Na slikama 48, 49, 50 i 51 prikazani su rezultati deskriptivne analize mirisa sredine i kore, arome, izgleda i teksture uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i različitog udjela kiselog tijesta.

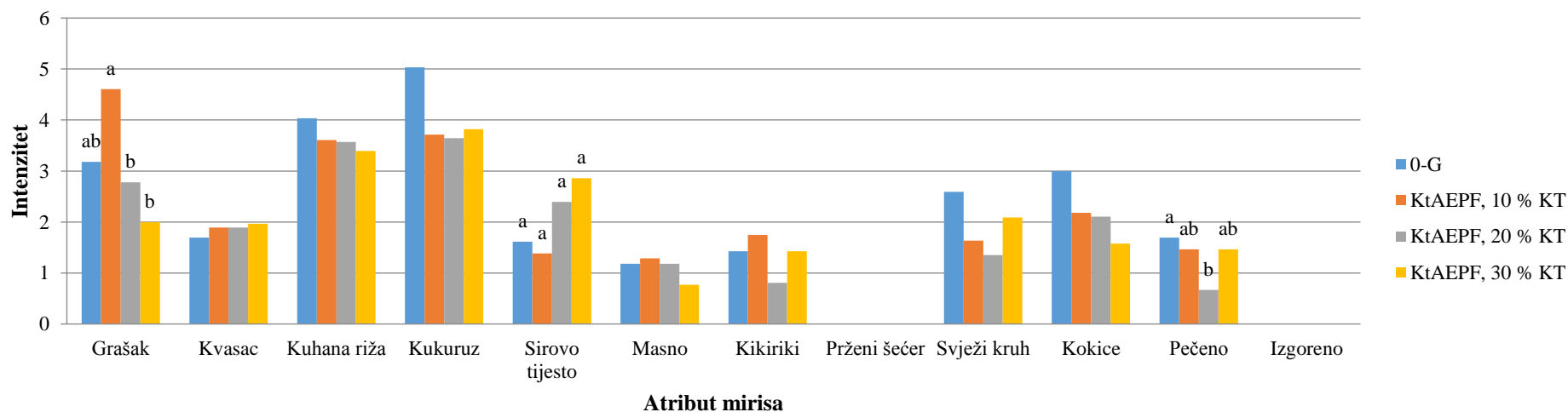
**Tablica 44.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize mirisa sredine uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (četiri uzorka, 14 panelista, jedno ponavljanje)

	Grašak		Kvasac		Kuhana riža		Kukuruz		Sirovo tijesto		Masno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	5,27	0,004	0,37	0,775	0,65	0,586	2,33	0,089	3,09	0,038	1,10	0,362
Panelist	2,44	0,016	12,13	< 0,001	9,85	< 0,001	2,80	0,007	6,91	< 0,001	7,05	< 0,001

	Kikiriki		Prženi šećer*		Svježi kruh		Kokice		Pečeno		Izgoreno*		Ocjena svidanja	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Uzorak	1,89	0,148			1,82	0,159	2,72	0,058	3,56	0,023			0,61	0,613
Panelist	4,60	< 0,001			3,34	0,002	5,69	< 0,001	11,72	< 0,001			2,79	0,007

\*Zavisna varijabla nema varijancu



**Slika 48.** Srednja vrijednost intenziteta atributa mirisa sredine uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (14 panelista, jedno ponavljanje). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

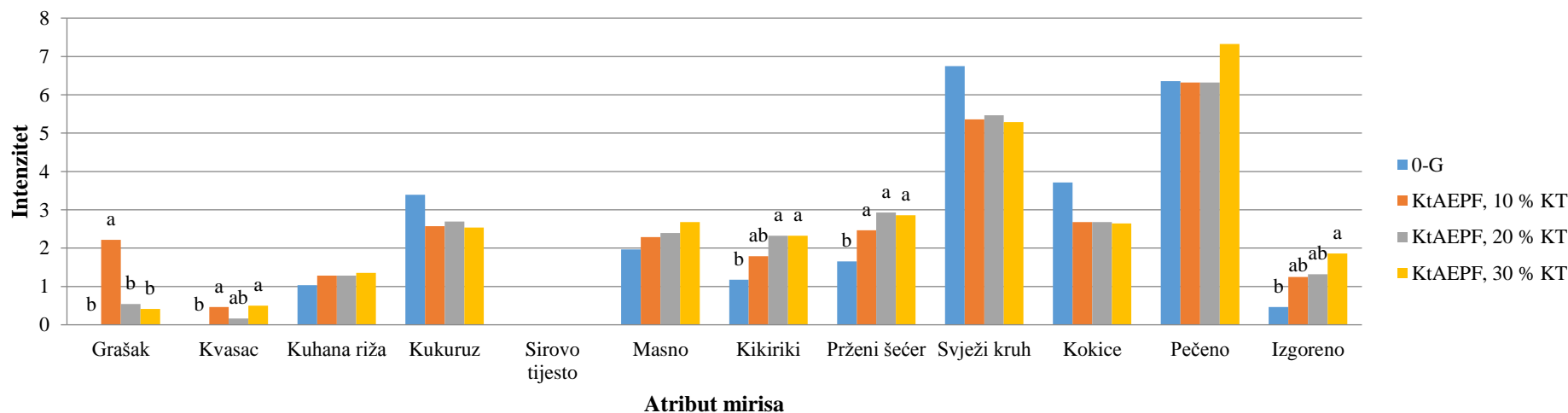
**Tablica 45.** Analiza varijance rezultata i hedonističke deskriptivne analize mirisa kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (četiri uzorka, 14 panelista, jedno ponavljanje)

	Grašak		Kvasac		Kuhana riža		Kukuruz		Sirovo tijesto*		Masno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	13,44	< 0,001	4,12	0,012	0,72	0,547	1,00	0,403			1,19	0,324
<b>Panelist</b>	1,54	0,147	3,46	0,001	22,06	< 0,001	2,03	0,044			16,23	< 0,001

	Kikiriki		Prženi šećer		Svježi kruh		Kokice		Pečeno		Izgoreno		Ocjena svidanja	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	3,30	0,030	7,93	< 0,001	1,92	0,143	1,40	0,259	2,53	0,071	5,17	0,004	0,84	0,478
<b>Panelist</b>	9,11	< 0,001	28,15	< 0,001	5,11	< 0,001	5,81	< 0,001	9,62	< 0,001	5,52	< 0,001	1,91	0,060

\*Zavisna varijabla nema varijancu

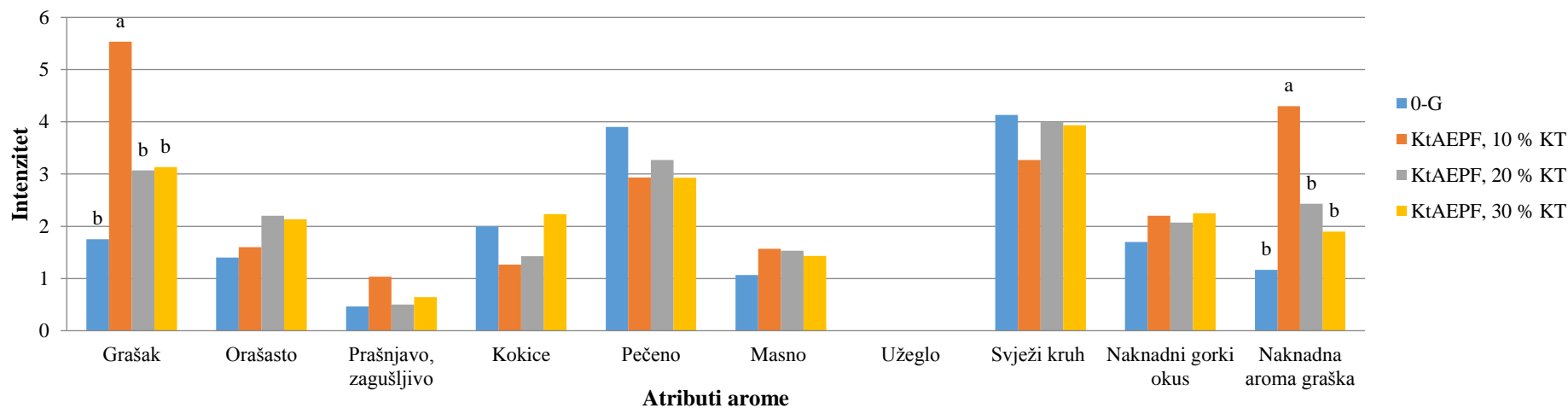
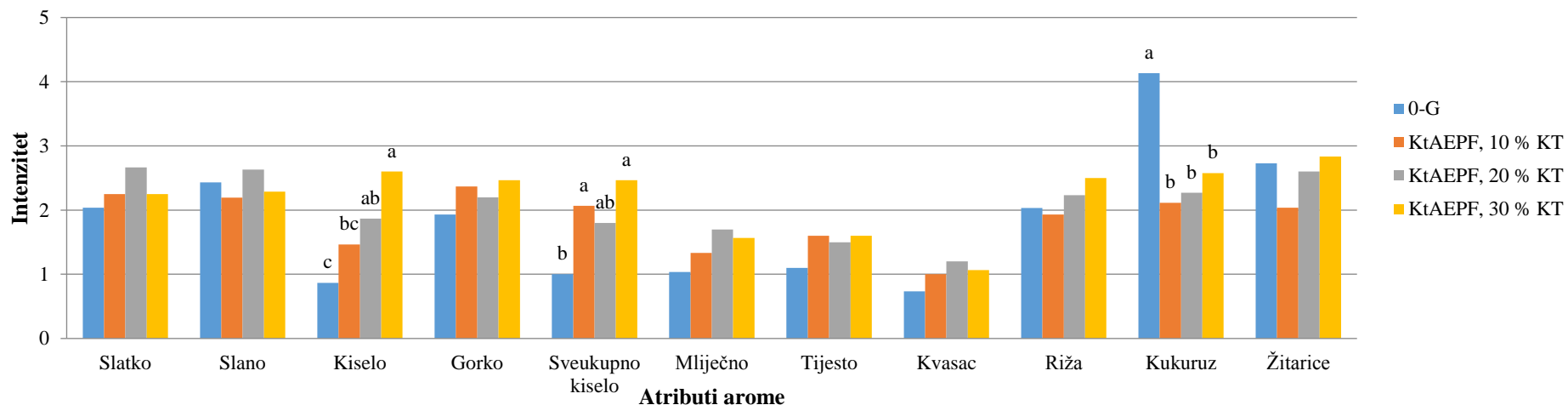


**Slika 49.** Srednja vrijednost intenziteta atributa mirisa kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (14 panelista, jedno ponavljanje). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

**Tablica 46.** Analiza varijance rezultata deskriptivne i hedonističke analize arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (četiri uzorka, 15 panelista, jedno ponavljanje)

	Slatko		Slano		Kiselo		Gorko		Sveukupno kiselo		Mliječno	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	1,43	0,249	0,77	0,515	7,80	< 0,001	0,57	0,635	6,60	0,001	1,78	0,165
<b>Panelist</b>	2,42	0,014	6,11	< 0,001	3,17	0,002	5,87	< 0,001	7,29	< 0,001	7,59	< 0,001
	Tijesto		Kvasac		Riža		Kukuruz		Žitarice		Grašak	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	1,64	0,196	1,33	0,278	0,94	0,428	7,36	< 0,001	2,35	0,086	12,62	< 0,001
<b>Panelist</b>	13,47	< 0,001	9,53	< 0,001	5,23	< 0,001	1,45	0,173	5,67	< 0,001	2,49	0,011
	Orašasto		Prašnjavo, zagušljivo		Kokice		Pečeno		Masno		Užeglo*	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	1,77	0,168	2,37	0,085	1,99	0,131	1,28	0,292	0,59	0,625		
<b>Panelist</b>	8,10	< 0,001	2,09	0,033	6,43	< 0,001	7,15	< 0,001	3,17	0,002		
	Svježi kruh		Naknadni gorki okus		Naknadna aroma graška		Ocjena svidanja					
	F	p	F	p	F	p	F	p				
<b>Uzorak</b>	1,71	0,180	0,56	0,645	11,92	< 0,001	7,58	< 0,001				
<b>Panelist</b>	20,35	< 0,001	3,63	0,001	2,43	0,014	6,17	< 0,001				

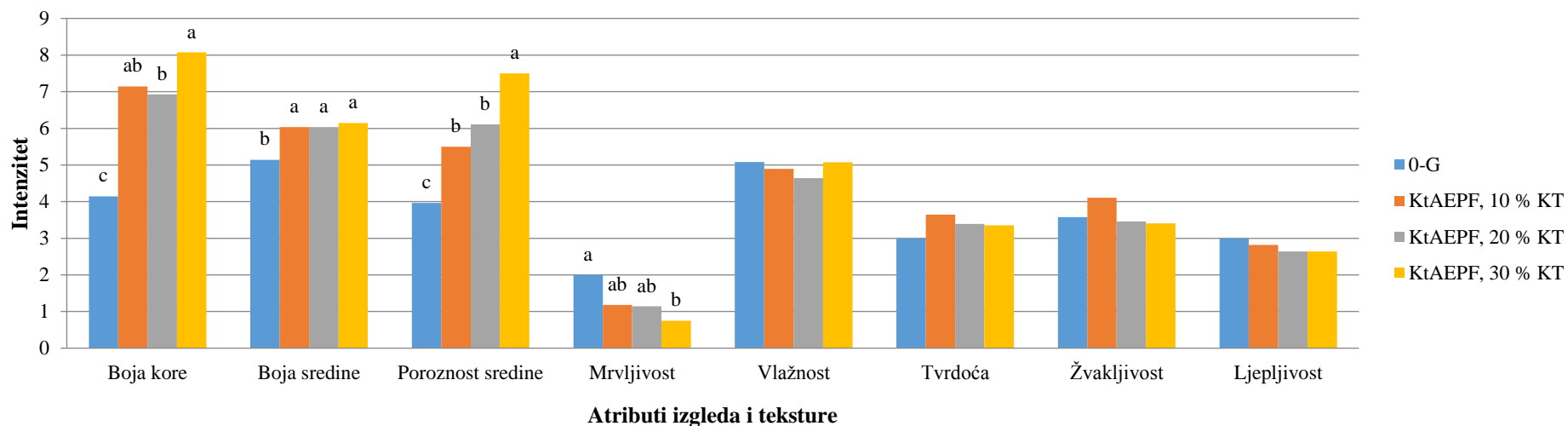
\*Zavisna varijabla nema varijancu



**Slika 50.** Srednja vrijednost intenziteta atributa arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (15 panelista, jedno ponavljanje). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

**Tablica 47.** Analiza varijance rezultata deskriptivne analize izgleda i teksture uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (četiri uzorka, 14 panelista, jedno ponavljanje)

	Boja kore		Boja sredine		Poroznost sredine		Mrvljivost		Vlažnost		Tvrdća		Žvkljivost		Ljepljivost	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Uzorak</b>	32,23	< 0,001	8,45	< 0,001	25,50	< 0,001	3,45	0,026	0,38	0,767	1,44	0,245	1,40	0,257	1,31	0,286
<b>Panelist</b>	5,60	< 0,001	37,01	< 0,001	7,63	< 0,001	3,57	0,001	8,41	< 0,001	13,25	< 0,001	3,79	0,001	41,04	< 0,001



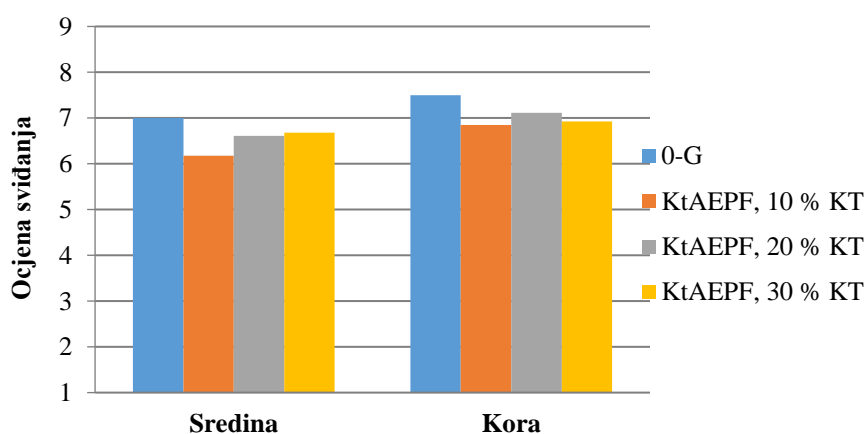
**Slika 51.** Srednja vrijednost intenziteta atributa izgleda i teksture uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (14 panelista, jedno ponavljanje). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti istog parametra (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Kod rezultata koji nisu označeni slovima nije utvrđen značajan utjecaj uzorka (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

Provedena je i analiza varijance s dodatkom različitog udjela kiselog tijesta kao fiksnom nezavisnom varijablom te panelistima kao slučajnom (engl. *random*) nezavisnom varijablom. Kruh bez dodatka brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta (0-G) nije bio uključen u navedenu analizu. Utvrđen značajan utjecaj udjela dodanog kiselog tijesta naveden u nastavku ovog poglavlja rezultat je spomenute analize.

Dodatak različitog udjela kiselog tijesta je značajno utjecao na intenzitet mirisa sredine i kore te arome kruha po grašku ( $p = 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,001$ ) i naknadne arome graška ( $p = 0,001$ ). Pri tome se intenzitet navedenih atributa mirisa i arome smanjivao s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta (slike 48, 49 i 50). Smanjenje intenziteta mirisa i arome po grašku bilo je u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa smanjenjem koncentracije pojedinih alkohola, aldehida i ketona koje ponajviše karakterizira miris i/ili aroma po zelenom i travi, a što je detaljnije opisano u poglavlju 4.2.6. U prethodnom dijelu istraživanja utvrđeno je kako je dodatak kiselog tijesta u kruh s dodatkom brašna žutog graška utjecao na smanjenje intenziteta mirisa i arome po grašku (tablice 40 i 41). Stoga je logično i utvrđeno smanjenje intenziteta mirisa i arome po grašku s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta. Dodatak različitog udjela kiselog tijesta je značajno utjecao i na intenzitet mirisa sredine kruha po sirovom tijestu ( $p = 0,016$ ), kiselog okusa ( $p = 0,024$ ), arome žitarica ( $p = 0,026$ ), kokica ( $p = 0,019$ ) te intenzitet boje kore ( $p < 0,001$ ) i poroznost sredine kruha ( $p < 0,001$ ). Pri tome se intenzitet navedenih atributa mirisa, arome, izgleda i teksture povećavao s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta (slike 48, 50 i 51). Do povećanja intenziteta kiselog okusa došlo je radi povećanja koncentracije kiselina u kruhu (Novotni i sur., 2012). U skladu s tim, utvrđena je snažna pozitivna korelacija kiselog okusa s ukupnom kiselosti kruha ( $r = 0,983$ ,  $p = 0,017$ ) te kiselog okusa i sveukupno kisele arome s koncentracijom analiziranih organskih kiselina (poglavlje 4.2.6.). Hansen i Hansen (1996) su također utvrdili povećanje intenziteta kiselog okusa s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta (od 0 % do 20 %) u pšenični kruh, a Flander i sur. (2011) povećanje intenziteta kisele arome s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta (od 10 % do 36 %) u miješani pšenično-zobeni kruh. Mogući razlozi utvrđenog povećanja intenziteta mirisa sredine kruha po sirovom tijestu, arome žitarica i kokica su povećanje koncentracije spojeva koje karakteriziraju navedeni atributi mirisa odnosno arome i/ili smanjenje intenziteta maskirajućeg mirisa i arome graška, pri čemu dolazi do povećanja izraženosti navedenih atributa mirisa i arome (poglavlje 4.2.5.). Tamnija boja kore kruha s dodatkom većeg udjela kiselog tijesta mogla bi biti posljedica povećanja koncentracije prekursora za posmeđivanje i smanjenog pH koji pospješuje inicijalnu fazu Maillardove

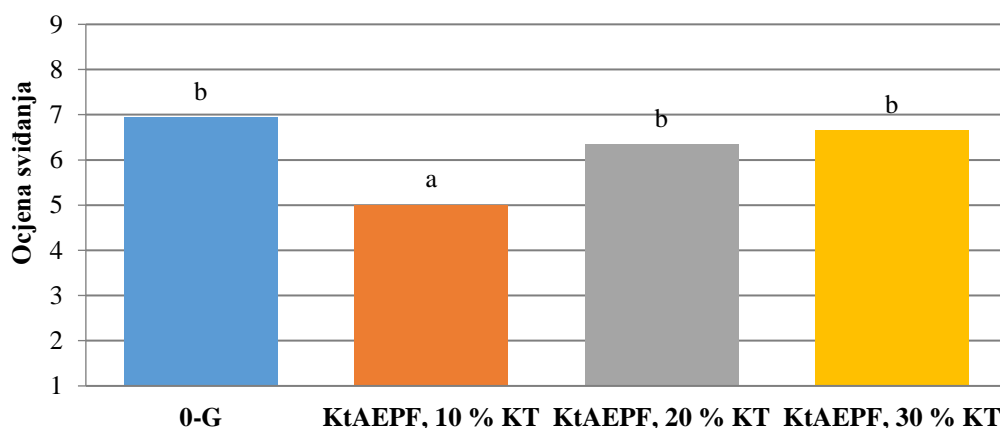
reakcije (Parker, 2015; Purlis, 2010). Prema rezultatima instrumentalne analize boje od strane Torrieri i sur. (2014), povećanje udjela dodanog kiselog tijesta je također dovelo do tamnjenja kore kruha. U ovom istraživanju je utvrđena značajna korelacija rezultata senzorske analize i analize boje kore kruha pomoću kolorimetra ( $L^*$   $r = -0,967$ ,  $p = 0,033$ ;  $a^*$   $r = 0,961$ ,  $p = 0,039$ ). S obzirom na rezultate određivanja poroznosti, Rózylo i sur. (2015) su također utvrdili povećanje poroznosti kruha s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta (od 10 % do 40 %) u bezglutenski kruh. U ovom istraživanju nije utvrđena značajna korelacija rezultata senzorske i instrumentalne analize boje sredine kruha, tvrdoće i žvackljivosti. Prema rezultatima instrumentalne analize, kod sredine kruha s dodatkom 20 % i 30 % kiselog tijesta došlo je do povećanja svjetline, intenziteta žute i crvene boje (slika 46) te smanjenja tvrdoće i žvackljivosti (slika 47), dok prema rezultatima senzorske analize nije utvrđena razlika u intenzitetu sveukupne boje, tvrdoće i žvackljivost sredine kruha (slika 51). Takvi rezultati senzorske analize boje su očekivani budući da je ukupna promjena boje  $\Delta E$  iznosila 1,4 što se smatra slabo izraženom promjenom (Adekunte i sur., 2010). Također, izostanak razlike u tvrdoći i žvackljivosti između analiziranih uzoraka određen senzorskom analizom mogao bi biti posljedica manje osjetljivosti ljudskih osjetila u odnosu na osjetljivost instrumenta.

Na slikama 52 i 53 prikazani su rezultati hedonističke analize mirisa sredine i kore te arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i različitog udjela kiselog tijesta.



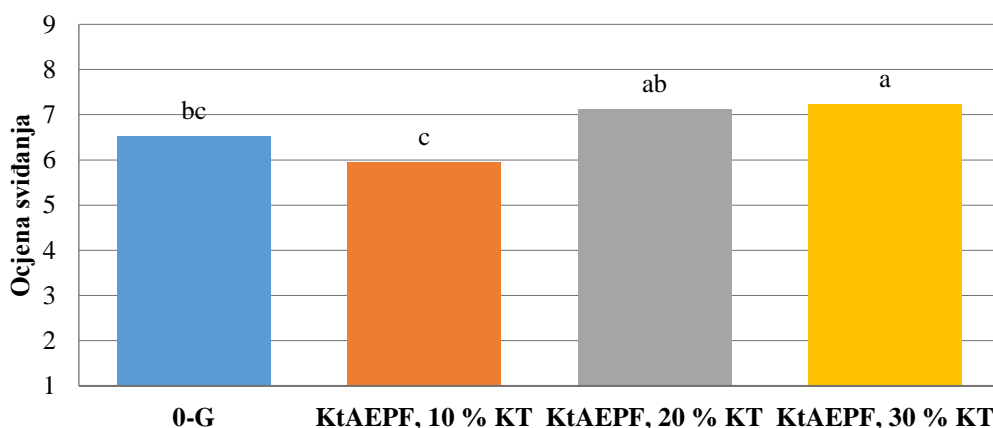
**Slika 52.** Prihvatljivost mirisa sredine i kore uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (14 panelista, jedno ponavljanje). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta



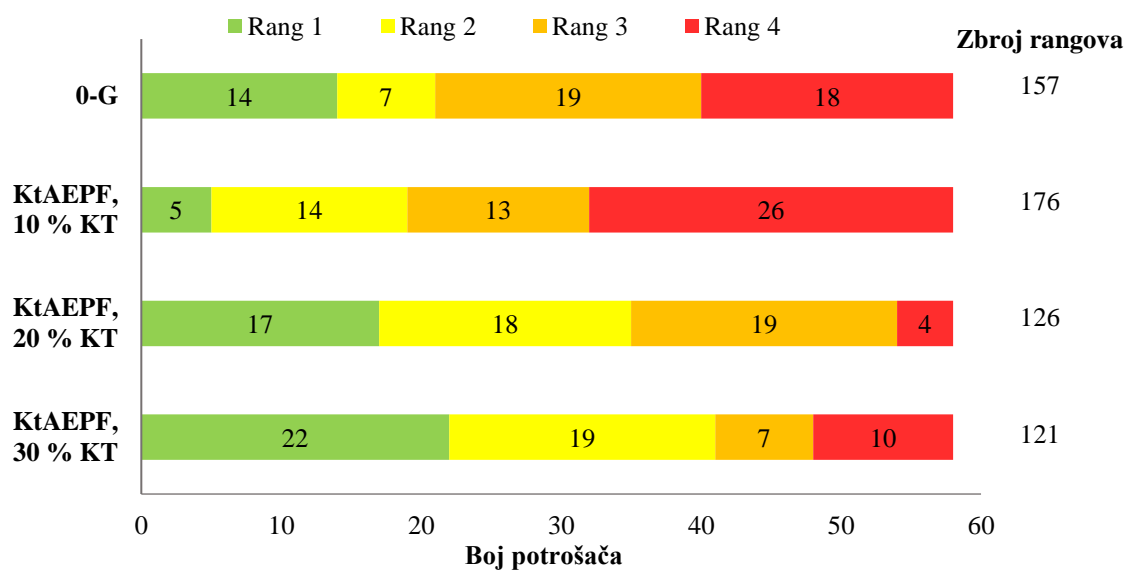


**Slika 53.** Prihvatljivost arome uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (15 panelista, jedno ponavljanje). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

Prema dobivenim rezultatima, nije utvrđen značajan utjecaj udjela dodanog kiselog tijesta na prihvatljivost mirisa sredine i kore kruha (slika 52). Utvrđeno je povećanje prihvatljivosti arome kruha s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta ( $p = 0,002$ ) (slika 53). Takav utjecaj dodatka većeg udjela kiselog tijesta je i očekivan budući da se s povećanjem njegovog dodanog udjela smanjivao intenzitet arome graška i naknadne arome graška koje su bile u negativnoj korelaciji s prihvatljivosti arome kruha ( $r = -0,973$ ,  $p = 0,027$ ;  $r = -0,994$ ,  $p = 0,006$ ), a povećavao intenzitet arome žitarica koja je bila u pozitivnoj korelaciji s prihvatljivosti arome kruha ( $r = 0,966$ ,  $p = 0,034$ ). Rózylo i sur. (2015) su također utvrdili povećanu prihvatljivost arome te sveukupnu prihvatljivost bezglutenskog kruha s dodatkom 20 % i 30 % kiselog tijesta u odnosu na kruh s 10 % kiselog tijesta. Na slikama 54 i 55 prikazani su rezultati hedonističke analize i nizanja po preferenciji sveukupnog doživljaja uzoraka kruha različitih prema dodatku brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjelu dodanog kiselog tijesta.



**Slika 54.** Prihvatljivost sveukupnog doživljaja uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (58 potrošača, jedno ponavljanje). Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta



**Slika 55.** Rezultati nizanja po preferenciji uzoraka kruha različitih s obzirom na dodatak brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i udjel dodanog kiselog tijesta (1 – najviše preferirani, 4 – najmanje preferirani). Najveći zbroj rangova – najviše preferirani kruh; najmanji zbroj rangova – najmanje preferirani kruh. Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF – s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze; 10 %, 20 % i 30 % KT – udjel dodanog kiselog tijesta

Prema dobivenim rezultatima, utvrđena je značajna razlika u prihvatljivosti (ANOVA,  $p < 0,001$ ) i preferenciji (Friedman ANOVA,  $p < 0,001$ ) analiziranih uzoraka kruha. U usporedbi s ostalim analiziranim uzorcima kruha, kruh s dodatkom 30 % kiselog tijesta (KtAEPF, 30 %) bio je najviše rangiran te je ocijenjen najvišom ocjenom sviđanja (7,2 – „umjereno mi se sviđa“). S obzirom na dobivene rezultate analize prihvatljivosti i preferencije, kruh KtAEPF, 30 % se pokazao najboljim te je korišten u analizi trajnosti.

U odnosu na kruh bez dodatka brašna žutog graška, prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima i kiselog tijesta (0-G), kruh KtAEPF, 30 % karakterizirao je veći intenzitet mirisa kore kruha po kvascu, kikirikiju, prženom šećeru i izgorenom (slika 49); veći intenzitet kiselog okusa, sveukupno kisele arome, manji intenzitet arome kukuruza (slika 50); tamnija boja kore i sredine, veća poroznost sredine i manja mrvljivost (slika 51).

## 4.5. Prehrambena vrijednost i trajnost kruha

### 4.5.1. Prehrambena vrijednost kruha

Bezglutenska prehrana je uobičajeno siromašna vlaknima i pojedinim mikronutrijentima poput magnezija, kalcija, cinka, željeza, folne kiseline i drugih vitamina B skupine te vitamina D. Također, uobičajeno ju karakterizira i prekomjeren unos energije, jednostavnih šećera, zasićenih masti i masti općenito (Vici i sur., 2016). S obzirom na to da se najčešće proizvodi na bazi škroba, rižinog i kukuruznog brašna, bezglutenski kruh uobičajeno karakterizira mala prehrambena vrijednost (Arendt i Dal Bello, 2008; Capriles i sur., 2016; Witczak i sur., 2016). Stoga je ispitan utjecaj dodatka brašna žutog graška, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima na prehrambenu vrijednost proizvedenog kruha.

U odnosu na kruh 0-G, pri pripremi kruha KTAEPF, 30 % KT je 25 % integralnog rižinog brašna zamijenjeno brašnom žutog graška te mu je dodano 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginin, prolin, fruktoza i enzimi proteaze. Rezultati određivanja prehrambene vrijednosti uzoraka kruha 0-G i KTAEPF, 30 % KT prikazani su u tablici 48.

**Tablica 48.** Prehrambena vrijednost uzoraka bezglutenskog kruha proizvedenog bez i s dodatkom brašna žutog graška, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima

Prehrambena vrijednost kruha (na 100 g)	0-G	KtAEPF, 30 % KT
<b>Energija</b>	868 kJ/207 kcal	888 kJ/212 kcal
<b>Masti</b>	2,7 g	2,9 g
od kojih		
zasićene masne kiseline	1,3 g	1,6 g
jednostruko nezasićene masne kiseline	0,8 g	0,8 g
višestruko nezasićene masne kiseline	0,6 g	0,4 g
<b>Ugljikohidrati</b>	33 g	30 g
od kojih		
šećeri	1,4 g	2,1 g
škrob	32 g	28 g
<b>Vlakna</b>	3,4 g	4,6 g
od kojih		
IDF*	1,9 g	2,5 g
SDFP*	0,4 g	0,6 g
SDFS*	1,1 g	1,5 g
<b>Bjelančevine</b>	7,7 g	9,8 g
<b>Sol</b>	1,1 g	1,1 g
<b>Pepeo</b>	2,3 g	2,5 g
<b>Voda</b>	48 g	46 g

\*IDF – netopljiva vlakna; SDFP – vlakna topljiva u vodi, netopljiva u 78 % etanolu; SDFS – vlakna topljiva u vodi i 78 % etanolu

Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF, 30 % KT – s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze

U odnosu na kruh 0-G, kruh KTAEPF, 30 % KT sadržavao je 6 % više masti (više zasićenih i manje nezasićenih masnih kiselina), 11 % manje ukupnih ugljikohidrata (više šećera, manje škroba), 33 % više vlakana, 27 % više proteina te 10 % više pepela. Povećanje udjela vlakana, proteina, pepela i masti te smanjenje udjela škroba je očekivano s obzirom na njihov utvrđen veći udjel u brašnu žutog graška u odnosu na integralno rižino brašno. Povećani udjel šećera je također očekivan budući da je u recepturu za pripremu kruha dodana fruktoza.

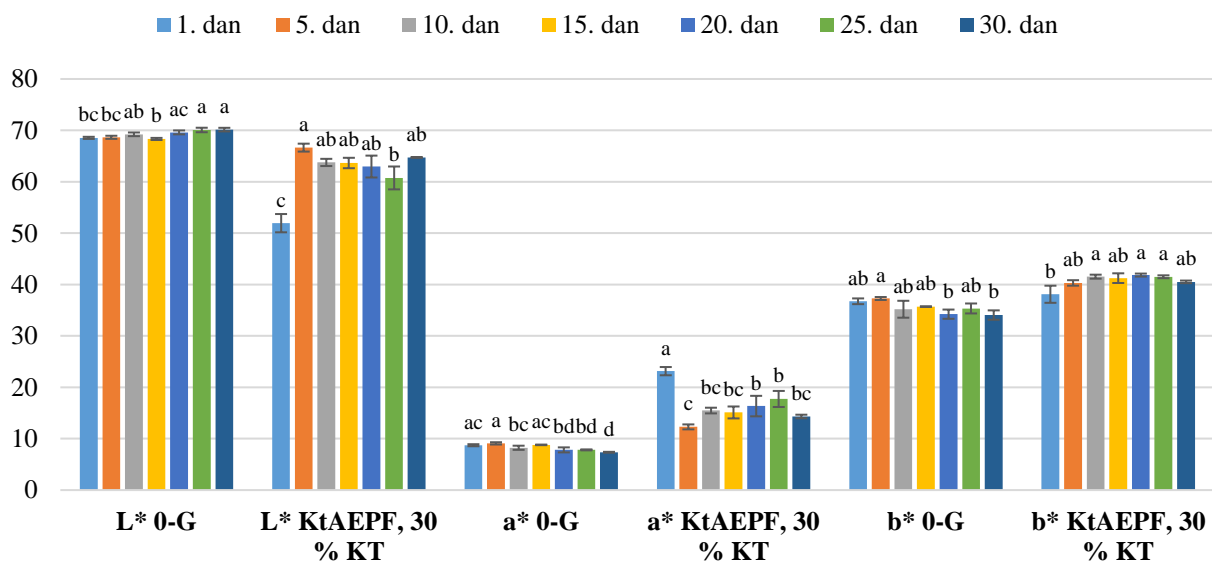
Podaci dobiveni određivanjem prehrabene vrijednosti kruha potrebni su za izradu nutritivne deklaracije proizvoda (NN 8/2013). Prema Pravilniku o prehrabnim i zdravstvenim tvrdnjama, kao „izvor vlakana“ mogu se označiti proizvodi s najmanje 3 g vlakana na 100 g proizvoda, a kao „izvor proteina“ proizvodi s najmanje 12 % energetske vrijednosti iz proteina (NN 84/2010). Udjel vlakana u uzorcima kruha 0-G i KTAEPF, 30 % KT iznosio je 3,4 g i 4,6 g na 100 g kruha te prema tome mogu biti označeni kao „izvor vlakana“. Postotak doprinosa proteina energetske vrijednosti navedenih uzoraka kruha iznosio je 15 % za kruh 0-G odnosno 19 % za kruh KTAEPF, 30 % KT te prema tome oni mogu biti označeni prehrabnom tvrdnjom „izvor proteina“. Udjel soli u kruhu bio je u skladu s maksimalnim udjelom od 1,4 % dozvoljenim Pravilnikom o žitaricama i proizvodima od žitarica (NN 81/2016). Također je potrebno naglasiti da su u ovom istraživanju za pripremu kruha korištene sirovine koje prirodno ne sadrže gluten te da bi u slučaju njegovog označavanja navodom „bez glutena“ pri stavljanju na tržište bilo potrebno analitički potvrditi da ne sadrži više od 20 mg kg<sup>-1</sup> glutena (Provedbena uredba Komisije (EU) br. 828/2014).

#### 4.5.2. Trajnost kruha

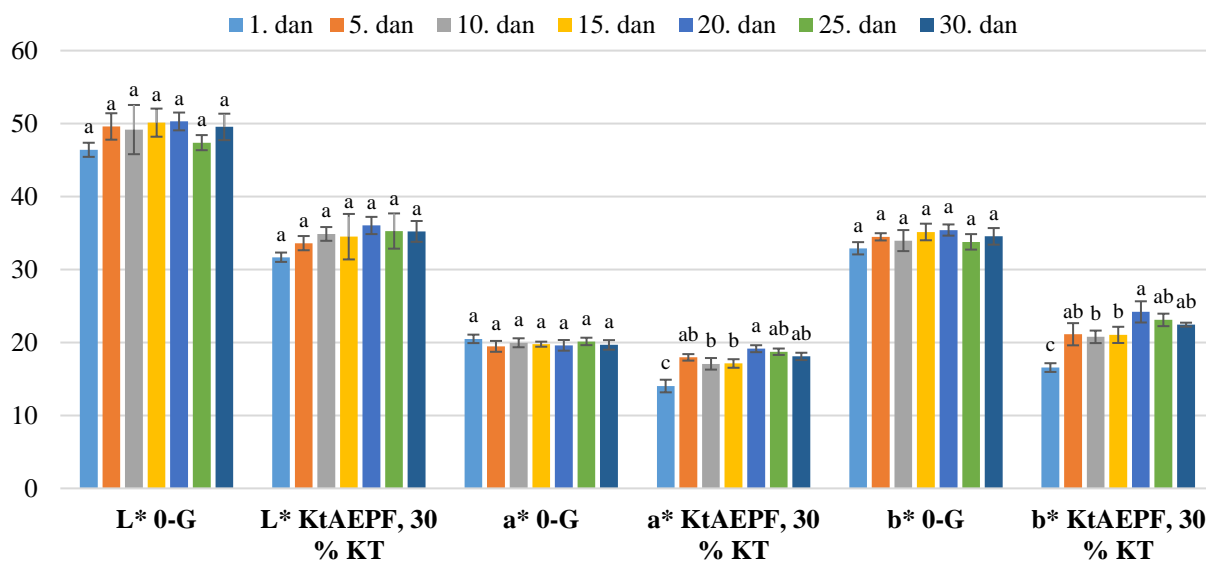
Trajnost kruha jedan je od ključnih parametara njegove kvalitete. Stoga su u ovom dijelu istraživanja ispitane promjene koje nastaju tijekom skladištenja uzoraka kruha bez (0-G) i s dodatkom brašna žutog graška, fruktoze, prolina, arginina, proteaza i 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* (KTAEPF, 30 %) te je određena njihova trajnost. Pri ispitivanju trajnosti kruha primijenjena je tehnika polupečenja kruha radi mogućnosti produljenja njegove trajnosti (Almeida i sur., 2016). Polupečeni uzorci kruha hlađeni su u vakuumu, površinski poprskani etanolom te zapakirani u modificiranoj atmosferi. Svi navedeni postupci mogu doprinijeti produljenju trajnosti kruha. Vakuum hlađenje temelji se na brzom isparavanju vode u vakuumu te predstavlja brzu metodu hlađenja i njime se smanjuje mogućnost kontaminacije plijesnima tijekom hlađenja (Sun i Zheng, 2006). Prskanje površine kruha etanolom također djeluje antifungalno, a ne utječe na značajnu promjenu senzorskih

svojtava kruha (Hempel i sur., 2013). Pakiranje kruha u modificiranoj atmosferi sa 70 % CO<sub>2</sub> i 30 % N<sub>2</sub>, bez prisutnosti O<sub>2</sub> smanjuje rast kvasaca, plijesni i sporogenih bakterija te tako djeluje na produljenje trajnosti kruha (Debonne i sur., 2018). Polupečeni kruh skladišten je 30 dana pri sobnoj temperaturi, a svaki 5. dan skladištenja provedena je analiza mikrobiološke ispravnosti određivanjem broja aerobnih mezofilnih bakterija, aerobnih sporogenih bakterija i plijesni u polupečenom kruhu te analiza boje kore i sredine, teksture sredine i specifičnog volumena dopečenog kruha.

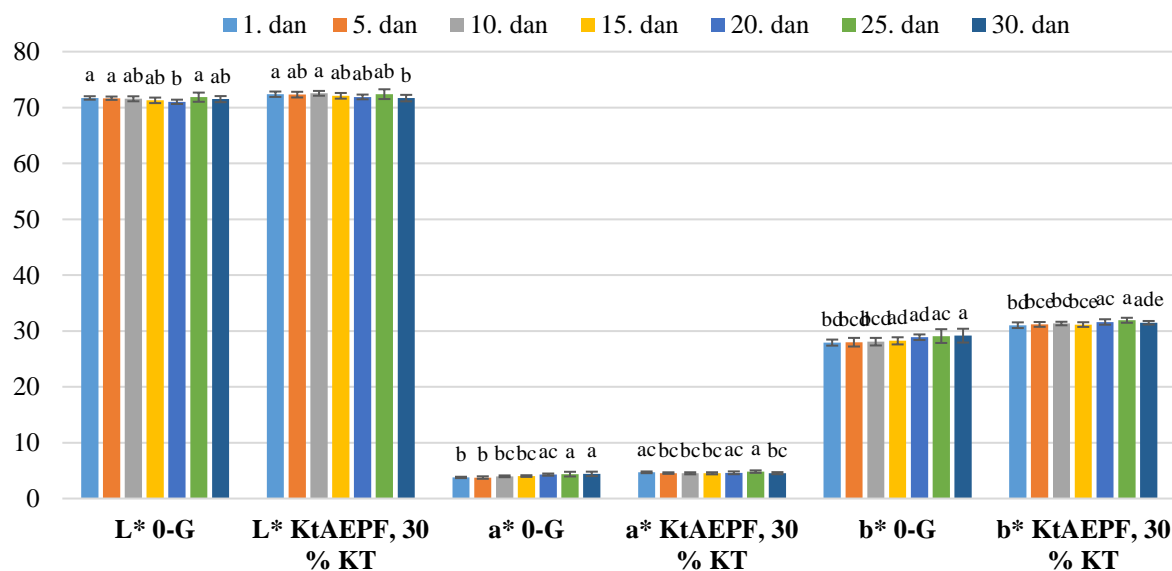
Na slikama 56, 57 i 58 prikazani su rezultati određivanja parametara boje (L\*, a\* i b\*) gornje i donje kore te sredine kruha tijekom skladištenja.



**Slika 56.** Parametri boje (L\*, a\*, b\*) gornje kore uzoraka kruha tijekom 30 dana skladištenja u modificiranoj atmosferi, pri sobnoj temperaturi. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra analiziranog uzorka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF, 30 % KT – s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze



**Slika 57.** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) donje kore uzoraka kruha tijekom 30 dana skladištenja u modificiranoj atmosferi, pri sobnoj temperaturi. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra analiziranog uzorka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF, 30 % KT – s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze



**Slika 58.** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) sredine uzoraka kruha tijekom 30 dana skladištenja u modificiranoj atmosferi, pri sobnoj temperaturi. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra analiziranog uzorka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF, 30 % KT – s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze

Tijekom skladištenja došlo je do izraženije promjene svjetline ( $L^*$ ) i intenziteta crvene boje ( $a^*$ ) gornje kore kruha KtAEPF, 30 % KT (od 17 % do 28 % za  $L^*$ , od 23 % do 47 % za  $a^*$ ) u odnosu na kruh 0-G (2 % za  $L^*$ , od 10 % do 16 % za  $a^*$ ). Kod kruha KtAEPF, 30 % KT je do povećanja svjetline i smanjenja intenziteta crvene boje gornje kore došlo već 5. dan skladištenja, a kod kruha 0-G tek 20. dan skladištenja. Što se tiče boje donje kore, kod kruha 0-G nije utvrđena promjena niti jednog parametra, dok je kod kruha KtAEPF, 30 % KT utvrđeno povećanje intenziteta crvene (od 22 % do 36 %) i žute (od 25 % do 46 %) boje nakon 5. dana skladištenja. Tijekom skladištenja oba kruha utvrđena je promjena svjetline sredine kruha do 1 %, povećanje intenziteta crvene boje sredine kruha 0-G (od 13 % do 17 %) nakon 20. dana skladištenja te povećanja intenziteta žute boje sredine oba kruha (od 3 % do 4 %) nakon 20. dana skladištenja. Pri skladištenju dolazi do migracije vode iz sredine prema kori (Piazza i Masi, 1995). Budući da do intenzivnijeg posmeđivanja dolazi pri nižem aktivitetu vode (Capuano i sur., 2008), povećanje udjela vode u kori moglo je utjecati na posmeđivanje kore tijekom dopečenja kruha. U skladu s rezultatima ovog istraživanja, Karaoglu i Kotancilar (2006) su kod pojedinih analiziranih uzoraka polupečenog pšeničnog kruha utvrdili povećanje svjetline i smanjenje intenziteta crvene boje kore tijekom skladištenja 21 dan pri 4 °C. Khoshakhlagh i sur. (2014) su utvrdili povećanje svjetline i intenziteta crvene boje te smanjenje intenziteta žute boje kore lepinje tijekom skladištenja 21 dan pri sobnoj temperaturi. U tablici 49 prikazani su rezultati određivanja ukupne promjene boje ( $\Delta E$ ) kore i sredine kruha tijekom skladištenja.



**Tablica 49.** Ukupna promjena boje ( $\Delta E$ ) gornje kore, donje kore i sredine uzoraka kruha tijekom 30 dana skladištenja u modificiranoj atmosferi, pri sobnoj temperaturi

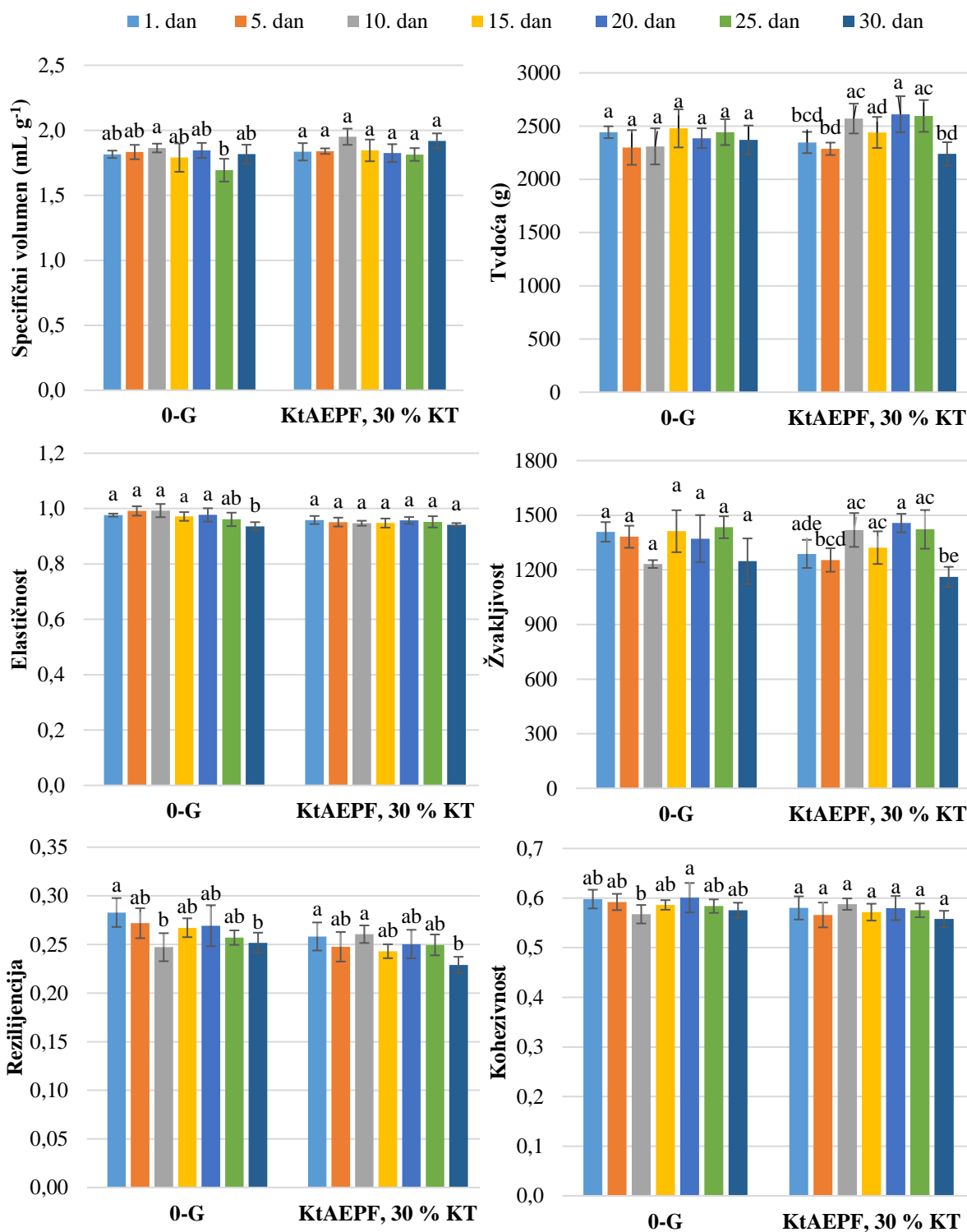
	$\Delta E$ gornja kora				$\Delta E$ donja kora				$\Delta E$ sredina			
<b>0-G</b>												
5. dan	0,72	±	0,32	bd	3,87	±	1,51	a	0,69	±	0,48	a
10. dan	1,95	±	1,28	acd	3,02	±	3,71	a	0,76	±	0,40	a
15. dan	1,07	±	0,04	bc	4,44	±	2,13	a	0,82	±	0,56	a
20. dan	2,88	±	1,08	ac	4,74	±	1,44	a	1,35	±	0,53	a
25. dan	2,41	±	0,28	acd	1,65	±	1,09	a	1,65	±	1,12	a
30. dan	3,48	±	0,60	a	3,81	±	1,81	a	1,56	±	1,23	a
<b>KtAEPF, 30 % KT</b>												
5. dan	18,41	±	0,84	a	6,35	±	1,66	a	0,61	±	0,31	b
10. dan	14,50	±	0,83	ab	6,15	±	1,19	a	0,63	±	0,21	bc
15. dan	14,58	±	1,25	ab	6,44	±	1,85	a	0,71	±	0,23	bc
20. dan	13,51	±	2,66	ab	10,18	±	1,79	a	0,96	±	0,32	ab
25. dan	10,89	±	2,66	b	8,98	±	1,54	a	1,22	±	0,49	a
30. dan	15,73	±	0,19	ab	8,05	±	0,73	a	1,01	±	0,35	ac

Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra analiziranog uzorka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ )

Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF, 30 % KT – s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze

Ukupna razlika u boji može se klasificirati kao vrlo izražena ( $\Delta E > 3$ ), izražena ( $\Delta E$  od 1,5 do 3) ili slabo izražena ( $\Delta E < 1,5$ ) (Adekunte i sur., 2010). U odnosu na 1. dan skladištenja, izraženija promjena boje kore utvrđena je tijekom skladištenja kruha KtAEPF, 30 % KT ( $\Delta E$  od 10,9 do 18,4 za gornju koru; od 6,1 do 10,2 za donju koru) nego kruha 0-G ( $\Delta E$  od 0,7 do 3,5 za gornju koru; od 1,6 do 4,7 za donju koru), a što je posljedica izraženije promjene  $L^*$  i  $a^*$  vrijednosti kod kruha KtAEPF, 30 % KT. Ukupna promjena boje gornje kore kruha 0-G se povećavala s produljenjem vremena skladištenja, dok kod kruha KtAEPF, 30 % KT nije utvrđen takav trend. Tijekom skladištenja oba analizirana kruha nije utvrđena značajna razlika u ukupnoj promjeni boje donje kore. Što se tiče sredine kruha, tijekom skladištenja došlo je do slabo izražene ukupne promjene boje ( $\Delta E$  od 0,7 do 1,6 za 0-G; od 0,6 do 1,2 za KtAEPF, 30 % KT).

Rezultati određivanja specifičnog volumena i teksture kruha tijekom skladištenja prikazani su na slici 59.



**Slika 59.** Specifični volumen i parametri teksture (tvrdoća, elastičnost, žvkljivost, rezilijskija, kohezivnost) uzoraka kruha tijekom 30 dana skladištenja u modificiranoj atmosferi, pri sobnoj temperaturi. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra analiziranog uzorka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ). Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF, 30 % KT – s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze

Specifični volumen oba analizirana kruha nije se značajno mijenjao tijekom skladištenja, što je u skladu s rezultatima Rinaldi i sur. (2017). Tijekom skladištenja odvija se proces starenja – kruh gubi svježinu, elastičnost te otvrdnjava. Voda migrira iz sredine prema kori i dolazi do njene preraspodjele, odvija se retrogradacija škroba, promjena strukture i interakcija škroba, proteina i drugih makromolekula (Arendt i sur., 2007; Ronda i Roos, 2011; Vlášek i sur., 2013). Budući da ne sadrži gluten te se uobičajeno proizvodi na bazi škroba, proces starenja bezglutenskog kruha započinje prije nego kod glutenskog (Moore i sur., 2004). Udjel vlage ima važnu ulogu u starenju kruha. Što je udjel vlage manji, otvrdnjavanje je brže (Karaoğlu i Kotancilar, 2006). Od parametara teksture analiziranih u ovom istraživanju, tijekom skladištenja došlo je do promjene tvrdoće, elastičnosti i rezilijencije kruha. Do povećanja tvrdoće od 11 % u odnosu na 1. dan skladištenja došlo je jedino kod kruha KtAEPF, 30 % KT 20. dan skladištenja. Njegova tvrdoća 25. i 30. dan njegovog skladištenja se nije značajno razlikovala u odnosu na 1. dan. U 30. danu skladištenja došlo je do smanjenja elastičnosti kruha 0-G (4 %) te smanjenja rezilijencije oba analizirana kruha (11 %). Značajna promjena žvkljivosti i kohezivnosti uzoraka kruha tijekom skladištenja nije utvrđena. Tijekom skladištenja oba analizirana kruha nije utvrđena ni značajna razlika u gubitku mase uslijed skladištenja i pečenja (rezultati nisu prikazani). Rinaldi i sur. (2017) su utvrdili povećanje tvrdoće i žvkljivosti, smanjenje kohezivnosti i rezilijencije tijekom skladištenja bezglutenskog kruha s dodatkom kiselog tijesta, a Fik i sur. (2012) povećanje tvrdoće, smanjenje elastičnosti i kohezivnosti pšeničnog kruha tijekom skladištenja. Usporeno otvrdnjavanje uzoraka kruha analiziranih u ovom istraživanju moguća je posljedica nepromijenjenog udjela vlage tijekom skladištenja kruha. Također, pri dopečenju je moglo doći do otapanja amilopektina kristaliziranog tijekom skladištenja polupečenog kruha što utječe na smanjenje tvrdoće kruha (Leuschner i sur., 1997). Osim toga, prema literaturi, kiselo tijesto također usporava starenje bezglutenskog kruha (Moore i sur., 2007; Novotni i sur., 2012; Rózylo i sur., 2015; Üçok i Hayta, 2015). Pri smanjenom pH povećava se aktivnost prisutnih amilaza i proteaza pri čemu dolazi do razgradnje proteina i škroba te njihovih interakcija, što utječe na retrogradaciju škroba i dovodi do usporenog otvrdnjavanja i starenja kruha (Arendt i sur., 2007; Corsetti i sur., 2008). Dodatak proteaza je također mogao usporiti otvrdnjavanje i povećanje žvkljivosti bezglutenskog kruha (Caballero i sur., 2007; Kawamura-Konishi i sur., 2013). Kawamura-Konishi i sur. (2013) su to pripisali hidrolizi proteina i povećanju njihovog afiniteta za interakcije sa škrobom čime se smanjuju interakcije između molekula škroba koje uzrokuju starenje. S obzirom na dobivene rezultate, može se

zaključiti kako tijekom skladištenja nije utvrđen trend promjene specifičnog volumena, tvrdoće, žvackljivosti i kohezivnosti kruha. U 30. danu skladištenja utvrđena je nepoželjna manja elastičnost sredine kruha 0-G te manja rezilijencija oba analizirana kruha.

Mikrobiološka kvaliteta polupečenog kruha tijekom skladištenja ovisi o dodatku kiselog tijesta, uvjetima pečenja, atmosferi u pakovini i temperaturi skladištenja (Debonne i sur., 2018, 2017). Do mikrobiološkog kvarenja kruha najčešće dolazi radi porasta plijesni (Dal Bello i sur., 2007), a veći udjel vode u bezglutenskom kruhu u odnosu na obični glutenski dodatno povećava podložnost takvom kvarenju (Axel i sur., 2017). Rezultati određivanja mikrobioloških parametara, sastava plinova u pakovini te pH polupečenog kruha prikazani su u tablici 50.

**Tablica 50.** Sastav plinova u pakovini, pH i mikrobiološki parametri polupečenih uzoraka kruha zapakiranih u modificiranoj atmosferi tijekom 30 dana skladištenja pri sobnoj temperaturi

	Udjel O <sub>2</sub> (%)			Udjel CO <sub>2</sub> (%)			pH	Aerobne mezofilne bakterije (log CFU g <sup>-1</sup> )	Aerobne sporogene bakterije (log CFU g <sup>-1</sup> )	Plijesni (log CFU g <sup>-1</sup> )	Vizualni porast plijesni		
<b>0-G</b>													
1. dan	1,7	±	1,1	bc	63,2	±	0,8	a	6,73	2,63	1,59	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
5. dan	2,9	±	0,9	ab	56,8	±	3,1	b	6,98	4,95	0,50	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
10. dan	3,5	±	0,5	a	48,8	±	0,9	c	7,17	7,46	2,03	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
15. dan	1,9	±	0,8	abc	48,3	±	2,3	c	7,09	7,53	2,03	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
20. dan	0,0			c	47,5	±	2,0	c	6,98	8,20	4,07	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
25. dan	0,0			c	45,5	±	2,3	cd	6,97	8,21	3,77	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
30. dan	0,0			c	41,2	±	1,9	d	7,03	7,81	4,17	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
<b>KtAEPF, 30 % KT</b>													
1. dan	1,6	±	1,1	cd	65,3	±	1,8	a	5,72	2,79	1,54	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
5. dan	3,1	±	0,5	bd	58,2	±	1,6	b	5,94	< 300 CFU g <sup>-1</sup>	1,44	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
10. dan	3,9	±	0,5	b	50,7	±	0,6	c	5,99	< 300 CFU g <sup>-1</sup>	1,77	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
15. dan	4,3	±	0,8	b	41,8	±	3,3	d	5,98	< 300 CFU g <sup>-1</sup>	1,35	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
20. dan	6,8	±	0,8	a	37,8	±	2,4	d	5,97	< 300 CFU g <sup>-1</sup>	1,48	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
25. dan	7,0	±	1,0	a	31,6	±	2,2	e	5,99	< 300 CFU g <sup>-1</sup>	1,27	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd
30. dan	7,1	±	0,6	a	24,6	±	3,1	f	5,99	< 300 CFU g <sup>-1</sup>	0,92	< 10 CFU g <sup>-1</sup>	nd

Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti pojedinog parametra analiziranog uzorka (Tukey HSD test,  $p < 0,05$ ); nd – nije detektiran

Oznake uzoraka: 0-G – bez brašna žutog graška i drugih dodataka; KtAEPF, 30 % KT – s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, arginina, enzima proteaza, prolina i fruktoze

Tijekom skladištenja došlo je do smanjenja udjela CO<sub>2</sub> u pakovini na 41,2 % kod kruha 0-G odnosno 24,6 % kod kruha KtAEPF, 30 % KT. Prisutnost O<sub>2</sub> u pakovini u 1. danu skladištenja moguća je posljedica njegove migracije iz sredine kruha (Piergiovanni i Fava, 1997), što je u skladu s rezultatima Novotni i sur. (2017). Tijekom skladištenja došlo je do povećanja udjela O<sub>2</sub> u pakovini kruha KtAEPF, 30 % KT do 7,1 % u 30. danu skladištenja. Nasuprot tome, u pakovini kruha 0-G udjel O<sub>2</sub> povećavao se do 10. dana skladištenja (3,5 %), a zatim se počeo smanjivati te je od 20. dana do kraja skladištenja u pakovini izmjereno 0 % O<sub>2</sub>. Takvo smanjenje udjela O<sub>2</sub> može biti posljedica njegove potrošnje uslijed porasta broja bakterija. Broj aerobnih mezofilnih i sporogenih bakterija povećavao se do 20. dana skladištenja, nakon kojeg nije zabilježeno značajno povećanje njihovog broja, moguće radi nedostatka O<sub>2</sub> potrebnog za rast.

Početni broj kolonija aerobnih mezofilnih i sporogenih bakterija nije se značajno razlikovao između uzoraka kruha 0-G i KtAEPF, 30 % KT. Kao što je već navedeno, broj kolonija aerobnih mezofilnih i sporogenih bakterija u kruhu 0-G povećao se do 20. dana skladištenja za 5,6 log CFU g<sup>-1</sup> odnosno 2,5 log CFU g<sup>-1</sup>, nakon čega je došlo do njegove stagnacije ili blagog smanjenja. Nasuprot tome, kod kruha KtAEPF, 30 % KT došlo je do smanjenja broja aerobnih mezofilnih bakterija ispod granice za kvantitativno izražavanje već u 5. danu skladištenja kruha te blagog smanjenja broja aerobnih sporogenih bakterija za 0,6 log CFU g<sup>-1</sup> do 30. dana skladištenja. Tijekom 30 dana skladištenja vizualnim pregledom nije utvrđen vidljiv porast plijesni kod oba analizirana kruha, dok je broj njihovih poraslih kolonija bio manji od granice za kvantitativno izražavanje.

U istraživanju Voučko (2018) je također utvrđeno kako je tijekom skladištenja kruha u modificiranoj atmosferi (70 % CO<sub>2</sub>, 30 % N<sub>2</sub>) došlo do povećanja udjela O<sub>2</sub> i smanjenja udjela CO<sub>2</sub> u pakovini. Smanjenje udjela CO<sub>2</sub> u pakovini može biti posljedica njegovog otapanja u kruhu (Daniels i sur., 1985) i propusnosti materijala pakovine (Galić i sur., 2009; Upasen i Wattanachai, 2018). Budući da tijekom skladištenja nije došlo do smanjenja pH analiziranih polupečenih uzoraka kruha kao posljedica otapanja CO<sub>2</sub> u kruhu, što je u skladu s rezultatima Fik i sur. (2012), promjena sastava plinova (smanjenje udjela CO<sub>2</sub> i povećanje udjela O<sub>2</sub>) mogla bi se pripisati propusnosti materijala pakovine. Značajna razlika u udjelu CO<sub>2</sub> u pakovini s produljenjem skladištenja različitih uzoraka kruha (od 15. do 30. dana) mogla bi se pripisati njegovom nastanku uslijed metaboličke aktivnosti prisutnih mikroorganizama u kruhu 0-G (Khoshakhlagh i sur., 2014).

Poznato je kako kiselo tijesto pozitivno utječe na mikrobiološku trajnost kruha, a za takav utjecaj odgovorni su metaboliti bakterija mliječne kiseline koji nastaju pri fermentaciji – octena kiselina, fenilmliječna kiselina, hidroksi masne kiseline, peptidi i drugi (Axel i sur., 2017; Debonne i sur., 2018; Gerez i sur., 2009). Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja je dodatak kiselog tijesta svojim antifungalnim djelovanjem produžio trajnost direktno pečenog pšeničnog kruha s dva na pet dana (Gerez i sur., 2009), a bezglutenskog kruha s dva na šest dana (Axel i sur., 2015). Dodatak 10 % kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis* C186 produžio je trajnost kruha skladištenog pri sobnoj temperaturi do šest dana (Quattrini i sur., 2019). Prema dosadašnjim istraživanjima utjecaja kiselog tijesta na trajnost polupečenog kruha pakiranog u modificiranoj atmosferi i skladištenog pri sobnoj temperaturi kiselo tijesto je produžilo trajnost kruha s 25 na 30 dana radi usporavanja rasta plijesni (Novotni i sur., 2017), odnosno produžilo trajnost kruha s osam na 13 dana smanjenjem rasta anaerobnih i sporogenih bakterija, kvasaca, plijesni (Debonne i sur., 2018). Dodatak brašna žutog graška je također mogao utjecati na mikrobiološku kvalitetu kruha. Prema rezultatima Rizzello i sur. (2015) dodatak hidrolizata proteina graška je produžio mikrobiološku trajnost kruha, dok su za antifungalnu aktivnost bili zaslužni nativni proteini i peptidi dobiveni hidrolizom.

Obavezni postupci i kriteriji kontrole mikrobiološke ispravnosti kruha nisu propisani zakonskom regulativom. U Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu navedene su preporučene mikrobiološke analize te pripadajući kriteriji za pekarske proizvode – kruh, grisine, mlince i prepečenice (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011). Pri dopečenju polupečenog kruha dolazi do značajnog smanjenja broja živih mikroorganizama (Karaoglu i sur., 2005), a specifični kriteriji za polupečene pekarske proizvode koji prije konzumacije zahtijevaju dodatnu toplinsku obradu nisu propisani. Budući da su mikrobiološke analize provedene na polupečenom kruhu kao proizvodu koji bi bio stavljen na tržište, pri procjeni mikrobiološke ispravnosti su, osim kriterija za pekarske proizvode, primijenjeni i kriteriji propisani za hladena i zamrznuta tijesta koja također zahtijevaju toplinsku obradu prije konzumacije. Broj poraslih kolonija plijesni je kod oba kruha tijekom svih 30 dana skladištenja bio manji od definiranog kriterija ( $10^4$  CFU  $g^{-1}$ ) za hladena i zamrznuta tijesta. Prema kriterijima za broj aerobnih mezofilnih bakterija u hlađenim i zamrznutim tijestima ( $< 10^6$  CFU  $g^{-1}$ ) te broj aerobnih sporogenih bakterija u pekarskim proizvodima ( $< 10^2$  CFU  $g^{-1}$ ), kruh 0-G bio je mikrobiološki ispravan do 5. dana skladištenja, a kruh KTAEPF 30 % KT tijekom svih 30 dana skladištenja.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom doktorskom radu ispitan je utjecaj dodatka brašna žutog graška, kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima na pH, ukupnu kiselost, udjel kiselina i šećera, profil hlapljivih spojeva arome, udjel slobodnih fenolnih spojeva i antioksidativni kapacitet u fazama pripreme kruha te senzorska svojstva bezglutenskog kruha. Ispitan je utjecaj dodatka 10 %, 20 % i 30 % kiselog tijesta na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva kruha proizvedenog prema optimalnoj recepturi s obzirom na dodatak prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima. Bezglutenskom kruhu s optimalnim udjelom kiselog tijesta ispitana je trajnost skladištenjem polupečenog kruha zapakiranog u modificiranoj atmosferi pri sobnoj temperaturi. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

### **Utjecaj dodatka brašna žutog graška i kiselog tijesta pripremljenog s različitim bakterijama mliječne kiseline**

- S obzirom na profil hlapljivih spojeva arome u fazama pripreme kruha, kiselo tijesto su najviše karakterizirale kiseline; krušno tijesto prije i nakon fermentacije alkoholi, aldehidi, ketoni i esteri; kruh alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri te pirazini, pirol i furani; a koru pirazini, pirol i furani.
- Profil hlapljivih spojeva arome kruha razlikovao se ovisno o dodatku brašna žutog graška, kiselog tijesta i bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje te njihovoj interakciji. Kruh s dodatkom brašna žutog graška karakterizirala je veća koncentracija većine analiziranih spojeva u odnosu na kruh bez njegovog dodatka. Dodatak kiselog tijesta u kruh s brašnom žutog graška utjecao je na povećanje koncentracije većine analiziranih pirazina, 2-acetilpirola i 2-acetilfurana u kori kruha. Kruh s kiselim tijestom pripremljenim s *L. brevis* DSM 20054 karakterizirala je najveća koncentracija većine analiziranih aldehida, ketona, alkohola, pirazina, pirola i furana.
- Koncentracija akroleina u bezglutenskom kruhu s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri* DSM 20016 nije bila veća od privremene prihvatljive koncentracije, no njegova bi konzumacija doprinijela sveukupnoj izloženosti akroleinu.
- Dodatak brašna žutog graška negativno je utjecao na prihvatljivost mirisa sredine i kore kruha djelujući na povećanje intenziteta mirisa sredine i kore po grašku te sredine po kikirikiju. Nadalje, s dodatkom brašna žutog graška utvrđeno i je povećanje intenziteta



nepoželjne arome i naknadne arome graška, arome masnog kruha te manja prihvatljivost arome kruha bez dodanog kiselog tijesta.

- Utvrđena je snažna pozitivna korelacija intenziteta mirisa i/ili arome graška s koncentracijom 1-pentanola, 1-heksanola, (Z)-3-heksenola, 1-heptanola, pentanala, heksanala i 2-heptanona; mirisa po masnom, prženom šećeru, pečenom i izgorenom s koncentracijom analiziranih pirazina, pirola, furana, 2,3-pentadiona i dimetil-disulfida; mirisa svježeg kruha s koncentracijom 2,3-pentadiona, furfurala, 2-furanmetanola i dimetil-disulfida. Utvrđena je i negativna korelacija intenziteta arome kukuruza i/ili žitarica s koncentracijom heksanala, (E)-2-heksanola, 1-heksanola i (Z)-3-heksenola što ukazuje na mogući efekt maskiranja.
- Intenzitet pojedinih atributa mirisa i arome kruha s dodatkom kiselog tijesta značajno se razlikovao ovisno o bakterijama mliječne kiseline primijenjenim za kiseljenje tijesta. Dodatak kiselog tijesta pozitivno je utjecao na prihvatljivost mirisa sredine kruha s brašnom žutog graška djelujući na smanjenje intenziteta mirisa po grašku i sirovom tijestu. Značajan utjecaj dodatka kiselog tijesta na prihvatljivost arome kruha nije utvrđen.
- S obzirom na prihvatljivost mirisa sredine i kore te arome kruha s dodatkom brašna žutog graška, najbolje je ocijenjen kruh s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*.
- Negativan utjecaj dodatka brašna žutog graška na koncentraciju slobodnih ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativni kapacitet može se izbjeći njegovom kombinacijom s kiselim tijestom, budući da je ono u većini slučajeva doprinijelo povećanju koncentracije slobodnih ukupnih fenolnih spojeva i antioksidativnog kapaciteta kruha.

### **Utjecaj dodatka kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima**

- Dodatak prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima utjecao je na profil hlapljivih spojeva arome kruha, pri čemu se razmjer njihovog učinka razlikovao ovisno o pojedinom dodatku, kombinaciji dodataka te njihovoj kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta.
- Uzorke kruha s dodatkom šećera, aminokiselina i/ili enzima u kombinaciji s kiselim tijestom karakterizirala je veća koncentracija većine aldehida, alkohola, kiselina, estera, pirazina, pirola, furana, aromatskih ugljikovodika i fenola, a uzorke kruha bez kiselog tijesta manja koncentracija istih te veća koncentracija (Z)-3-heksenola.

- Uzorke kruha s dodatkom šećera, aminokiselina i/ili enzima, neovisno o dodatku kiselog tijesta, karakterizirala je veća koncentracija 2,3-butandiona i 2,3-pentandiona, a one bez njihovog dodatka veća koncentracija 1-heksanola, 1-heptanola, heksanala i 2-heptanona.
- Najveća koncentracija pirazina, pirola i furana karakterizirala je kruh i koru kruha s dodatkom kiselog tijesta, arginina, enzima, prolina i fruktoze (KtAEPF) te kruh i koru kruha s dodatkom kiselog tijesta i enzima.
- Utvrđena je razlika u utjecaju pojedinih prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima, bez i u kombinaciji s dodatkom kiselog tijesta, na pojedine attribute mirisa i arome kruha.
- Kruh s dodatkom prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima, bez i s dodatkom kiselog tijesta, karakterizirao je veći intenzitet mirisa kore po prženom šećeru i izgorenom, dok su uzorke kruha bez dodataka i s dodatkom samo kiselog tijesta više karakterizirali miris i aroma graška, prašnjava i zagušljiva aroma, miris sredine po kvascu, sirovom tijestu, kikirikiju, pečenom te miris kore po kukuruзу.
- Većina prekursora hlapljivih spojeva arome, enzima, kiselog tijesta i njihovih kombinacija pozitivno je utjecala na prihvatljivost mirisa sredine i arome kruha, dok njihov utjecaj na prihvatljivost mirisa kore kruha nije utvrđen. S obzirom na prihvatljivost mirisa sredine i kore te arome kruha, kruh KtAEPF se pokazao najboljim.

### **Optimizacija udjela dodanog kiselog tijesta**

- Različiti udjel dodanog kiselog tijesta nije značajno utjecao na instrumentalno određene parametre boje kore i sredine, specifičnog volumena, teksture sredine te senzorsku prihvatljivost mirisa sredine i kore kruha. No utvrđeno je povećanje prihvatljivosti arome kruha s povećanjem udjela dodanog kiselog tijesta, a što je moguća posljedica utvrđenog smanjenja intenziteta nepoželjne arome graška i povećanja intenziteta poželjne arome žitarica.
- S obzirom na sveukupnu senzorsku prihvatljivost i preferenciju, optimalnim se pokazao dodatak 30 % kiselog tijesta u kruh KtAEPF.

### **Prehrambena vrijednost i trajnost kruha**

- Bezglutenskom kruhu s dodatkom brašna žutog graška, 30 % kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i enzima (KtAEPF, 30 %) povećana je prehrambena vrijednost (udjel vlakana, proteina i pepela) u odnosu na kruh bez navedenih dodataka.

- Pri skladištenju je došlo do izražene promjene boje gornje kore dopečenog kruha, smanjenjem intenziteta crvene boje i povećanjem svjetline. U 30. danu skladištenja došlo je do smanjenja elastičnosti kruha bez dodataka i smanjenja rezilijencije oba kruha (bez i s dodacima). Polupečenom kruhu KtAEPF, 30 % produljena je mikrobiološka trajnost na 30 dana, u usporedbi s pet dana trajnosti kruha 0-G.

Iz svega navedenog može se zaključiti kako kombinacija brašna žutog graška, kiselog tijesta, prekursora hlapljivih spojeva arome i proteaza doprinosi značajnom povećanju kvalitete bezglutenskog kruha djelovanjem na poboljšanje profila hlapljivih spojeva arome i senzorskih svojstava, povećanje prehrambene vrijednosti te produljenje trajnosti. Najboljim se pokazao kruh s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. brevis*, proteaza, arginina, prolina i fruktoze. Navedeni kruh karakterizirala je značajno poboljšana prihvatljivost mirisa sredine i arome kruha koja se nije značajno razlikovala od prihvatljivosti uobičajenog pšeničnog bijelog kruha, kao i poželjna smanjena tvrdoća i žvackljivost te tamnija boja kore u odnosu na kruh bez navedenih dodataka. Prema tome, navedena receptura može se primijeniti za proizvodnju bezglutenskog kruha povećane kvalitete. S obzirom na to da su senzorska svojstva kruha rezultat interakcije primijenjenih sirovina i uvjeta proizvodnje, u budućim istraživanjima potrebno je ispitati utjecaj primjene drugih sirovina, potencijalnih poboljšivača i uvjeta proizvodnje na kvalitetu konačnog proizvoda.

## 6. LITERATURA

AACC 08-01, Ash – basic method.

AACC 10-05.01, Guidelines for measurement of volume by rapeseed displacement.

AACC 30-25.01, Crude fat in wheat, corn, and soy flour, feeds, and mixed feeds.

AACC 44-15A, Moisture – air-oven methods.

AACC 46-12.01, Crude protein – Kjeldahl method, boric acid modification.

AACC 62-05, Preparation of sample: Bread.

Abdel-Aal, E.S.M. (2009) Functionality of Starches and Hydrocolloids in Gluten-Free Foods. U: Gluten-Free Food Science and Technology. Wiley-Blackwell, str. 200–224.

Abraham, K., Andres, S., Palavinskas, R., Berg, K., Appel, K.E., Lampen, A. (2011) Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 1277–1290.

Achouri, A., Boye, J.I., Zamani, Y. (2006) Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chem.* **99**, 759–766.

Adams, A., Bouckaert, C., Van Lancker, F., De Meulenaer, B., De Kimpe, N. (2011a) Amino acid catalysis of 2-alkylfuran formation from lipid oxidation-derived  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 11058–11062.

Adams, A., Kitryte, V., Venskutonis, R., De Kimpe, N. (2011b) Model studies on the pattern of volatiles generated in mixtures of amino acids, lipid-oxidation-derived aldehydes, and glucose. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1449–1456.

Adebiyi, A.P., Aluko, R.E. (2011) Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chem.* **128**, 902–908.

Adekunte, A.O., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Scannell, A.G.M., O'Donnell, C.P. (2010) Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chem.* **122**, 500–507.

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

Aguilar, N., Albanell, E., Miñarro, B., Gallardo, J., Capellas, M. (2015) Influence of final baking technologies in partially baked frozen gluten-free bread quality. *J. Food Sci.* **80**, 619–626.

Ait Aneur, L., Mathieu, O., Lalanne, V., Trystram, G., Birlouez-Aragon, I. (2007) Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. *Food Chem.* **101**, 1407–1416.

Alencar, N.M.M., de Morais, E.C., Steel, C.J., Bolini, H.M.A. (2017) Sensory characterisation of gluten-free bread with addition of quinoa, amaranth flour and sweeteners as an alternative for coeliac patients. *Int. J. Food Sci. Technol.* **52**, 872–879.

Alencar, N.M.M., Steel, C.J., Alvim, I.D., de Morais, E.C., Andre Bolini, H.M. (2015) Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free breads: Temporal profile and instrumental analysis. *LWT - Food Sci. Technol.* **62**, 1011–1018.

- Almeida, E.L., Steel, C.J., Chang, Y.K. (2016) Par-baked bread technology: formulation and process studies to improve quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 70–81.
- Aluko, R.E., Mofolasayo, O.A., Watts, B.M. (2009) Emulsifying and foaming properties of commercial yellow pea (*Pisum sativum* L.) seed flours. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 9793–9800.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2009) Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **60**, 240–257.
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A.L., O'Mahony, J.A. (2017) Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *J. Food Compos. Anal.* **59**, 18–26.
- Amorati, R., Valgimigli, L. (2015) Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic. Res.* **49**, 633–649.
- Angioloni, A., Collar, C. (2012) High legume-wheat matrices: An alternative to promote bread nutritional value meeting dough viscoelastic restrictions. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 273–284.
- Antognoni, F., Mandrioli, R., Potente, G., Taneyo Saa, D.L., Gianotti, A. (2019) Changes in carotenoids, phenolic acids and antioxidant capacity in bread wheat doughs fermented with different lactic acid bacteria strains. *Food Chem.* **292**, 211–216.
- Anton, A.A., Artfield, S.D. (2008) Hydrocolloids in gluten-free breads: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **59**, 11–23.
- AOAC 2011.25, Insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods.
- AOAC Peer Verified Methods Advisory Committee (1998) AOAC peer verified methods program, manual on policies and procedures. AOAC International, Gaithersburg.
- Aremu, M., Ibrahim, H., Ekanem, B. (2016) Effect of processing on in-vitro protein digestibility and anti-nutritional properties of three underutilized legumes grown in Nigeria. *Br. Biotechnol. J.* **14**, 1–10.
- Arendt, E., Dal Bello, F., ured. (2008) *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. Elsevier.
- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., Dal Bello, F. (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol.* **24**, 165–174.
- ATSDR (2007) Toxicological Profile for Acrolein. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service; Agency for Toxic Substances and Disease Registry Atlanta.
- Augusto, F., Luiz Pires Valente, A. (2002) Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **21**, 428–438.
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016) Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *Int. J. Food Microbiol.* **239**, 86–94.
- Axel, C., Röcker, B., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., Arendt, E.K. (2015) Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiol.* **47**, 36–44.

- Axel, C., Zannini, E., Arendt, E.K. (2017) Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 3528–3542.
- Azarnia, S., Boye, J.I., Warkentin, T., Malcolmson, L., Sabik, H., Bellido, A.S. (2011) Volatile flavour profile changes in selected field pea cultivars as affected by crop year and processing. *Food Chem.* **124**, 326–335.
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S. (2011) Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 1–26.
- Bartosz, G., Kołakowska, A. (2010) Lipid Oxidation in Food Systems. U: Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipids (Sikorski, Z.Z.E., Kolakowska, A., ured.). Taylor & Francis, str. 163–184.
- Batra, V., Ghosh, M., Ganguli, A. (2019) A simple fermentative process for ensuring safety and nutrition of legume and legume wheat based sourdoughs. *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods* **11**, 639–645.
- Bauer, R., Cowan, D.A., Crouch, A. (2010a) Acrolein in wine: Importance of 3-hydroxypropionaldehyde and derivatives in production and detection. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3243–3250.
- Bauer, R., Du Toit, M., Kossmann, J. (2010b) Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* **137**, 28–31.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009) Food Chemistry, 4th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K.K., Karlović, D. (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res. Int.* **42**, 707–716.
- Bender, D., Fraberger, V., Szepasvári, P., D’Amico, S., Tömösközi, S., Cavazzi, G., Jäger, H., Domig, K.J., Schoenlechner, R. (2018a) Effects of selected lactobacilli on the functional properties and stability of gluten-free sourdough bread. *Eur. Food Res. Technol.* **244**, 1037–1046.
- Bender, D., Gratz, M., Vogt, S., Fauster, T., Wicki, B., Pichler, S., Kinner, M., Jäger, H., Schoenlechner, R. (2019) Ohmic heating – a novel approach for gluten-free bread baking. *Food Bioprocess Technol.* **12**, 1603–1613.
- Bender, D., Regner, M., D’Amico, S., Jäger, H., Tömösközi, S., Schoenlechner, R. (2018b) Effect of differently extracted arabinoxylan on gluten-free sourdough-bread properties. *J. Food Qual.* **2018**.
- Bender, D., Schönlechner, R. (2020) Innovative approaches towards improved gluten-free bread properties. *J. Cereal Sci.* **91**, 102904.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76.
- Berry, D.R., Watson, D.C. (1987) Yeast biotechnology. U: Yeast biotechnology (Berry, D.R., Russell, I., Stewart, G.G., ured.). Springer, str. 345–368.

- Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Musci, M. (2007) Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness. *J. Sep. Sci.* **30**, 563–572.
- Birch, A.N., Petersen, M.A., Arneborg, N., Hansen, Å.S. (2013a) Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. *Food Res. Int.* **52**, 160–166.
- Birch, A.N., Petersen, M.A., Hansen, Å.S. (2014) Aroma of wheat bread crumb. *Cereal Chem.* **91**, 105–114.
- Birch, A.N., Petersen, M.A., Hansen, Å.S. (2013b) The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *LWT - Food Sci. Technol.* **50**, 480–488.
- Boeswetter, A.R., Scherf, K.A., Schieberle, P., Koehler, P. (2019) Identification of the key aroma compounds in gluten-free rice bread. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 2963–2972.
- Bouasla, A., Wójtowicz, A., Zidoune, M.N., Olech, M., Nowak, R., Mitrus, M., Oniszczyk, A. (2016) Gluten-free precooked rice-yellow pea pasta: effect of extrusion-cooking conditions on phenolic acids composition, selected properties and microstructure. *J. Food Sci.* **81**, 1070–1079.
- Boukid, F., Zannini, E., Carini, E., Vittadini, E. (2019) Pulses for bread fortification: A necessity or a choice? *Trends Food Sci. Technol.* **88**, 416–428.
- Bourré, L., McMillin, K., Borsuk, Y., Boyd, L., Lagassé, S., Sopiwnyk, E., Jones, S., Dyck, A., Malcolmson, L. (2019) Effect of adding fermented split yellow pea flour as a partial replacement of wheat flour in bread. *Legum. Sci.* **1**, 1–11.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A. (2010) Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* **43**, 414–431.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25–30.
- Bredie, W.L.P., Boesveld, M., Martens, M., Dybdal, L. (2006) Modification of bread crust flavour with enzymes and flavour precursors. *Dev. Food Sci.* **43**, 225–228.
- Brummer, Y., Kaviani, M., Tosh, S.M. (2015) Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Res. Int.* **67**, 117–125.
- Burešová, I., Tokár, M., Mareček, J., Hřivna, L., Faměra, O., Šottníková, V. (2017) The comparison of the effect of added amaranth, buckwheat, chickpea, corn, millet and quinoa flour on rice dough rheological characteristics, textural and sensory quality of bread. *J. Cereal Sci.* **75**, 158–164.
- Caballero, P.A., Gómez, M., Rosell, C.M. (2007) Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *J. Food Eng.* **81**, 42–53.
- Cai, J., Liu, B., Su, Q. (2001) Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components. *J. Chromatogr. A* **930**, 1–7.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D. (2010) Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res. Int.* **43**, 461–482.
- Cappa, C., Barbosa-Cánovas, G. V., Lucisano, M., Mariotti, M. (2016a) Effect of high pressure processing on the baking aptitude of corn starch and rice flour. *LWT - Food Sci. Technol.* **73**, 20–27.

- Cappa, C., Lucisano, M., Raineri, A., Fongaro, L., Foschino, R., Mariotti, M. (2016b) Gluten-free bread: influence of sourdough and compressed yeast on proofing and baking properties. *Foods* **5**, 69.
- Capriles, V.D., Arêas, J.A.G. (2014) Novel approaches in gluten-free breadmaking: Interface between food science, nutrition, and health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 871–890.
- Capriles, V.D., Arêas, J.A.G. (2013) Effects of prebiotic inulin-type fructans on structure, quality, sensory acceptance and glycemic response of gluten-free breads. *Food Funct.* **4**, 104–110.
- Capriles, V.D., Dos Santos, F.G., Arêas, J.A.G. (2016) Gluten-free breadmaking: Improving nutritional and bioactive compounds. *J. Cereal Sci.* **67**, 83–91.
- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Ait-Ameur, L., Fogliano, V. (2008) Characterization of the Maillard reaction in bread crisps. *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 311–319.
- Champ, M.M.-J. (2002) Non-nutrient bioactive substances of pulses. *Br. J. Nutr.* **88**, 307–319.
- Chan, E., Masatcioglu, T.M., Koksel, F. (2019) Effects of different blowing agents on physical properties of extruded puffed snacks made from yellow pea and red lentil flours. *J. Food Process Eng.* **42**, 1–8.
- Chaudhary, A., Marinangeli, C.P.F., Tremorin, D., Mathys, A. (2018) Nutritional combined greenhouse gas life cycle analysis for incorporating canadian yellow pea into cereal-based food products. *Nutrients* **10**, 490.
- Chiavaro, E., Vittadini, E., Musci, M., Bianchi, F., Curti, E. (2008) Shelf-life stability of artisanally and industrially produced durum wheat sourdough bread („Altamura bread“). *LWT - Food Sci. Technol.* **41**, 58–70.
- Cho, I.H., Peterson, D.G. (2010) Chemistry of bread aroma: A review. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 575–582.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Gobbetti, M. (2010) Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *Int. J. Food Microbiol.* **137**, 236–245.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., Gobbetti, M. (2012) Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1087–1096.
- Coda, R., Varis, J., Verni, M., Rizzello, C.G., Katina, K. (2017) Improvement of the protein quality of wheat bread through faba bean sourdough addition. *LWT - Food Sci. Technol.* **82**, 296–302.
- Corsetti, A. (2013) Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. U: Handbook on Sourdough Biotechnology. Springer, str. 85–103.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., Rossi, J. (2008) Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *J. Food Sci.* **63**, 347–351.
- Corsetti, A., Settanni, L. (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* **40**, 539–558.
- Cunha, L.M., Fonseca, S.C., Lima, R.C., Loureiro, J., Pinto, A.S., Vaz Patto, M.C., Brites, C. (2019) Consumer-driven improvement of maize bread formulations with legume fortification. *Foods* **8**, 235.



- Curiel, J.A., Coda, R., Centomani, I., Summo, C., Gobbetti, M., Rizzello, C.G. (2015) Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **196**, 51–61.
- Czerny, M., Christlbauer, Martin, Christlbauer, Monika, Fischer, A., Granvogl, M., Hammer, M., Hartl, C., Hernandez, N.M., Schieberle, P. (2008) Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 265–273.
- Czerny, M., Schieberle, P. (2002) Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white wheat flour - Identification and quantitative changes during sourdough fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6835–6840.
- Dabija, A., Codinã, G.G., Fradinho, P. (2017) Effect of yellow pea flour addition on wheat flour dough and bread quality. *Rom. Biotechnol. Lett.* **22**, 12888–12897.
- Dahl, W.J., ured. (2019) Health Benefits of Pulses. Springer.
- Dal Bello, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Ström, K., Sjögren, J., van Sinderen, D., Schnürer, J., Arendt, E.K. (2007) Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* **45**, 309–318.
- Dalgetty, D.D., Baik, B.K. (2003) Isolation and characterization of cotyledon fibers from peas, lentils, and chickpeas. *Cereal Chem.* **80**, 310–315.
- Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M.S., Rossi, J. (1996) The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. *LWT - Food Sci. Technol.* **29**, 63–70.
- Daniels, J.A., Krishnamurthi, R., Rizvi, S.S.H. (1985) A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *J. Food Prot.* **48**, 532–537.
- De Vuyst, L., Neysens, P. (2005) The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 43–56.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Leroy, F. (2017) Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **100**, 49–160.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S. (2009) Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiol.* **26**, 666–675.
- Debonne, E., Van Bockstaele, F., Philips, E., De Leyn, I., Eeckhout, M. (2017) Impact of par-baking and storage conditions on the quality of par-baked and fully baked bread. *LWT - Food Sci. Technol.* **78**, 16–22.
- Debonne, E., Van Bockstaele, F., Van Driessche, M., De Leyn, I., Eeckhout, M., Devlieghere, F. (2018) Impact of par-baking and packaging on the microbial quality of par-baked wheat and sourdough bread. *Food Control* **91**, 12–19.
- Delcros, J.F., Rakotozafy, L., Boussard, A., Davidou, S., Porte, C., Potus, J., Nicolas, J. (1998) Effect of mixing conditions on the behavior of lipoxygenase, peroxidase, and catalase in wheat flour doughs. *Cereal Chem.* **75**, 85–93.
- Demirkesen, I., Mert, B., Sumnu, G., Sahin, S. (2010) Rheological properties of gluten-free bread formulations. *J. Food Eng.* **96**, 295–303.

- Di Cagno, R., De Angelis, M., Corsetti, A., Lavermicocca, P., Arnault, P., Tossut, P., Gallo, G., Gobbetti, M. (2003) Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: Effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiol.* **20**, 67–75.
- Di Cagno, R., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Cassone, A., Giuliani, G., Benedusi, A., Limitone, A., Surico, R.F., Gobbetti, M. (2008) Use of selected sourdough strains of *Lactobacillus* for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread. *J. Food Prot.* **71**, 1491–1495.
- Do Nascimento, A.B., Fiates, G.M.R., Dos Anjos, A., Teixeira, E. (2014) Gluten-free is not enough-perception and suggestions of celiac consumers. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **65**, 394–398.
- Domoney, C., Firmin, J.L., Sidebottom, C., Ealing, P.M., Slabas, A., Casey, R. (1990) Lipoxygenase heterogeneity in *Pisum sativum*. *Planta* **181**, 35–43.
- Drakula, S., Novotni, D., Mustač, N.Č., Voučko, B., Krpan, M., Hruškar, M., Čurić, D. (2019) A Simple HS-SPME/GC-MS Method for Determination of Acrolein from Sourdough to Bread. *Food Anal. Methods* **12**, 2582–2590.
- Eggleston, G., Omoaka, P.E., Ihedioha, D.O. (1992) Development and evaluation of products from cassava flour as new alternatives to wheaten breads. *J. Sci. Food Agric.* **59**, 377–385.
- Elfström, P., Sundström, J., Ludvigsson, J.F. (2014) Systematic review with meta-analysis: Associations between coeliac disease and type 1 diabetes. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **40**, 1123–1132.
- Engels, C., Schwab, C., Zhang, J., Stevens, M.J.A., Bieri, C., Ebert, M.O., McNeill, K., Sturla, S.J., Lacroix, C. (2016) Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Sci. Rep.* **6**, 1–13.
- Erbersdobler, H.F., Barth, C.A., Jahreis, G. (2017) Legumes in human nutrition: Nutrient content and protein quality of pulses. *Ernährungs-Umschau* **64**, 140–144.
- Fahmi, R., Ryland, D., Sopiwnyk, E., Aliani, M. (2019) Sensory and physical characteristics of pan bread fortified with thermally treated split yellow pea (*Pisum sativum* L.) flour. *J. Food Sci.* **84**, 3735–3745.
- Fan, P.H., Zang, M.T., Xing, J. (2015) Oligosaccharides composition in eight food legumes species as detected by high-resolution mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 2228–2236.
- FAO (2017) FAO/INFOODS Database for Pulses on Dry Matter Basis Version 1.0 - PulsesDM1.0. FAO, Rome.
- FAO (2016) Pulses: nutritious seeds for a sustainable future. FAO, Rome.
- FAO (1970) Amino-acid content of foods and biological data on proteins.
- Faroon, O., Roney, N., Taylor, J., Ashizawa, A., Lumpkin, M., Plewak, D. (2008) Acrolein health effects. *Toxicol. Ind. Health* **24**, 447–490.
- Ficco, D.B.M., Muccilli, S., Padalino, L., Giannone, V., Lecce, L., Giovanniello, V., Del Nobile, M.A., De Vita, P., Spina, A. (2018) Durum wheat breads ‘high in fibre’ and with reduced in vitro glycaemic response obtained by partial semolina replacement with minor cereals and pulses. *J. Food Sci. Technol.* **55**, 4458–4467.

- Fik, M., Surówka, K., Maciejaszek, I., Macura, M., Michalczyk, M. (2012) Quality and shelf life of calcium-enriched wholemeal bread stored in a modified atmosphere. *J. Cereal Sci.* **56**, 418–424.
- Flander, L., Suortti, T., Katina, K., Poutanen, K. (2011) Effects of wheat sourdough process on the quality of mixed oat-wheat bread. *LWT - Food Sci. Technol.* **44**, 656–664.
- Foschia, M., Horstmann, S.W., Arendt, E.K., Zannini, E. (2017) Legumes as functional ingredients in gluten-free bakery and pasta products. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **8**, 75–96.
- Frankel, E.N. (2005) Lipid oxidation, 2nd ed. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Galić, K., Čurić, D., Gabrić, D. (2009) Shelf life of packaged bakery goods- A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 405–426.
- Gallagher, E., Gormley, T.R., Arendt, E.K. (2004) Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 143–152.
- Gallagher, E., Kunkel, A., Gormley, T.R., Arendt, E.K. (2003) The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *Eur. Food Res. Technol.* **218**, 44–48.
- Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M.G., Arendt, E.K. (2012) Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 105–112.
- Gänzle, M.G. (2015) Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* **2**, 106–117.
- Gänzle, M.G. (2014) Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **37**, 2–10.
- Gänzle, M.G., Loponen, J., Gobbetti, M. (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 513–521.
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F. (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* **24**, 128–138.
- Garcia-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., Ruiz, J. (2004) Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta* **64**, 458–466.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G., Font de Valdez, G. (2009) Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* **20**, 144–148.
- Gheysen, L., Bernaerts, T., Bruneel, C., Goiris, K., Van Durme, J., Van Loey, A., De Cooman, L., Foubert, I. (2018) Impact of processing on n-3 LC-PUFA in model systems enriched with microalgae. *Food Chem.* **268**, 441–450.
- Gobbetti, M. (1998) The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 267-274.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. (1995a) Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in sour-dough using a rheofermentometer. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 625–630.

- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G., Rizzello, C.G. (2019) Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **302**, 103–113.
- Gobbetti, M., Gänzle, M., ured. (2013) Handbook on sourdough biotechnology. Springer US.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., De Angelis, M. (2016) Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *Int. J. Food Microbiol.* **239**, 3–18.
- Gobbetti, M., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., De Angelis, M. (2014) How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiol.* **37**, 30–40.
- Gobbetti, M., Simonetti, M.S., Corsetti, A., Santinelli, F., Rossi, J., Damiani, P. (1995b) Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: Influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiol.* **12**, 497–507.
- Gobbetti, M., Smacchi, E., Corsetti, A. (1996) The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: Purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3220–3226.
- Gomes, R., Meek, M.E., Eggleton, M. (2002) Concise international chemical assessment document 43: Acrolein. World Health Organization, Geneva.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Delgado, D., Garde, S. (2016) Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **232**, 103–110.
- Green, J.M. (1996) Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.* **68**, 305–309.
- Grosch, W., Schieberle, P. (1997) Flavor of cereal products - A review. *Cereal Chem.* **74**, 91–97.
- Guerzoni, M.E., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Gianotti, A., Lanciotti, R. (2007) Generation of aroma compounds in sourdough: Effects of stress exposure and lactobacilli-yeasts interactions. *Food Microbiol.* **24**, 139–148.
- Guichard, E. (2002) Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Rev. Int.* **18**, 49–70.
- Gularte, M.A., Gómez, M., Rosell, C.M. (2012) Impact of legume flours on quality and in vitro digestibility of starch and protein from gluten-free cakes. *Food Bioprocess Technol.* **5**, 3142–3150.
- Gutiérrez, L., Batlle, R., Andújar, S., Sánchez, C., Nerín, C. (2011) Evaluation of antimicrobial active packaging to increase shelf life of gluten-free sliced bread. *Packag. Technol. Sci.* **24**, 485–494.
- Hager, A.S., Arendt, E.K. (2013) Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. *Food Hydrocoll.* **32**, 195–203.

- Hager, A.S., Wolter, A., Czerny, Mariko, Bez, J., Zannini, E., Arendt, E.K., Czerny, Michael (2012) Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 333–344.
- Hamada, S., Suzuki, K., Aoki, N., Suzuki, Y. (2013) Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. *J. Cereal Sci.* **57**, 91–97.
- Hammes, W.P., Gänzle, M.G. (1998) Sourdough breads and related products. U: Microbiology of Fermented Foods (Wood, B.J.B., ured.). Springer, str. 199–216.
- Han, H.M., Koh, B.K. (2011) Antioxidant activity of hard wheat flour, dough and bread prepared using various processes with the addition of different phenolic acids. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 604–608.
- Hansen, Å., Hansen, B. (1996) Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Eur. Food Res. Technol.* **202**, 244–249.
- Hansen, Å., Hansen, B. (1994a) Influence of wheat flour type on the production of flavour compounds in wheat sourdoughs. *J. Cereal Sci.* **19**, 185–190.
- Hansen, A., Schieberle, P. (2005) Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: Applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 85–94.
- Hansen, B., Hansen, Å. (1994b) Volatile compounds in wheat sourdoughs produced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **198**, 202–209.
- Hassan, A.A., Mansour, E.H., El-Fath, A., Bedawey, A. El, Zaki, M.S. (2014) Improving dough rheology and cookie quality by protease enzyme. *Am. J. Food Sci. Nutr. Res.* **1**, 1–7.
- Hatta, E., Matsumoto, K., Honda, Y. (2015) Bacillolysin, papain, and subtilisin improve the quality of gluten-free rice bread. *J. Cereal Sci.* **61**, 41–47.
- Heitmann, M., Zannini, E., Axel, C., Arendt, E. (2017) Correlation of flavor profile to sensory analysis of bread produced with different *Saccharomyces cerevisiae* originating from the baking and beverage industry. *Cereal Chem.* **94**, 746–751.
- Hempel, A.W., O’Sullivan, M.G., Papkovsky, D.B., Kerry, J.P. (2013) Use of smart packaging technologies for monitoring and extending the shelf-life quality of modified atmosphere packaged (MAP) bread: Application of intelligent oxygen sensors and active ethanol emitters. *Eur. Food Res. Technol.* **237**, 117–124.
- Heng, L. (2005) Flavour aspects of pea and its protein preparations in relation to novel protein foods. Wageningen University.
- Heng, L., Vincken, J.-P., van Koningsveld, G., Legger, A., Gruppen, H., van Boekel, T., Roozen, J., Voragen, F. (2006) Bitterness of saponins and their content in dry peas. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 1225–1231.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. (2011) Evaluation of heat damage, sugars, amylases and colour in breads from einkorn, durum and bread wheat flours. *J. Cereal Sci.* **54**, 90–97.
- Hillen, C.E. (2016) Sensory and quality attributes of deodorized pea flour used in gluten-free food products. North Dakota State University of Agriculture and Applied Science.
- Hodge, J.E. (1953) Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928–943.

- Hole, A.S., Rudi, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., Sahlstorm, S. (2012) Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 6369–6375.
- Houben, A., Höchstätter, A., Becker, T. (2012) Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: An overview. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 195–208.
- Hummel, W., Schütte, H., Wendel, U., Kula, M.-R. (1990) New NADH-dependent dehydrogenases from *Lactobacillus* strains for synthesis and analysis. *Biocatalysis* **4**, 79–80.
- ICC No. 125, Method of determining the count of aerobic mesophilic bacteria (plate count method).
- ICC No. 139, Determination of fungus germ count (plate count method).
- ICC No. 144, Enumeration of spores of mesophilic bacteria.
- ICH (2005) ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation, Geneva.
- Inglett, G.E., Chen, D., Liu, S.X. (2015) Antioxidant activities of selective gluten free ancient grains. *Food Nutr. Sci.* **6**, 612–621.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H. (2003) Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 490–495.
- IOOC - International Olive Oil Council (2009) COI/T.20/Doc.29 – Determination of biophenols in olive oils by HPLC.
- Irakli, M., Katsantonis, D., Kleisiaris, F. (2015) Evaluation of quality attributes, nutraceutical components and antioxidant potential of wheat bread substituted with rice bran. *J. Cereal Sci.* **65**, 74–80.
- ISO 11132:2012, Sensory analysis – Methodology – Guidelines for monitoring the performance of a quantitative sensory panel.
- ISO 15214:1998, Microbiology of food and animal feedingstuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C.
- ISO 5492:2009, Sensory analysis – Vocabulary.
- ISO 5508:1990, Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids.
- ISO 5509:2000, Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids.
- ISO 6492:1999, Animal feeding stuffs – Determination of fat content.
- ISO 6658:2017, Sensory analysis – Methodology – General guidance.
- ISO 8589:2007, Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms.
- ISO 9297:1989, Water quality – Determination of chloride – Silver nitrate titration with chromate indicator (Mohr's method).
- Jakobsen, H.B., Hansen, M., Christensen, M.R., Brockhoff, P.B., Olsen, C.E. (1998) Aroma volatiles of blanched green peas (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3727–3734.

- Jensen, S., Oestdal, H., Skibsted, L.H., Larsen, E., Thybo, A.K. (2011) Chemical changes in wheat pan bread during storage and how it affects the sensory perception of aroma, flavour, and taste. *J. Cereal Sci.* **53**, 259–268.
- Jeradechachai, T. (2012) Application of response surface methodology in the development of gluten-free bread with yellow pea flour addition. North Dakota State University of Agriculture and Applied Science.
- Kächele, M., Monakhova, Y.B., Kuballa, T., Lachenmeier, D.W. (2014) NMR investigation of acrolein stability in hydroalcoholic solution as a foundation for the valid HS-SPME/GC-MS quantification of the unsaturated aldehyde in beverages. *Anal. Chim. Acta* **820**, 112–118.
- Kamaljit, K., Baljeet, S., Amarjeet, K. (2010) Preparation of bakery products by incorporating pea flour as a functional ingredient. *Am. J. Food Technol.* **5**, 130–135.
- Karaoğlu, M.M., Kotancilar, H.G. (2006) Effect of partial baking, storage and rebaking process on the quality of white pan bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* **41**, 108–114.
- Karaoglu, M.M., Kotancilar, H.G., Gurses, M. (2005) Microbiological characteristics of part-baked white pan bread during storage. *Int. J. Food Prop.* **8**, 355–365.
- Kaseleht, K., Paalme, T., Mihhalevski, A., Sarand, I. (2011) Analysis of volatile compounds produced by different species of lactobacilli in rye sourdough using multiple headspace extraction. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 1940–1946.
- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.H., Autio, K., Flander, L., Poutanen, K. (2005) Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 104–112.
- Katina, K., Heiniö, R.L., Autio, K., Poutanen, K. (2006) Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT - Food Sci. Technol.* **39**, 1189–1202.
- Kawamura-Konishi, Y., Shoda, K., Koga, H., Honda, Y. (2013) Improvement in gluten-free rice bread quality by protease treatment. *J. Cereal Sci.* **58**, 45–50.
- Keen, A.R., Walker, N.J., Peberdy, M.F. (1974) The formation of 2-butanone and 2-butanol in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **41**, 249–257.
- Kemp, S.E., Hort, J., Hollowood, T., ured. (2018) Descriptive analysis in sensory evaluation. John Wiley & Sons.
- Khoshakhlagh, K., Hamdami, N., Shahedi, M., Le-Bail, A. (2014) Quality and microbial characteristics of part-baked Sangak bread packaged in modified atmosphere during storage. *J. Cereal Sci.* **60**, 42–47.
- Kieffer, R., Rashed, M.M., Belitz, H.D. (1990) Modification of the functional properties of wheat flour by proteolytic enzymes. Part 1. Activity against substrates in solution and rheological effects. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **191**, 104–109.
- King, A.J., Readman, J.W., Zhou, J.L. (2003) The application of Solid-Phase Micro-Extraction (SPME) to the analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Environ. Geochem. Health* **25**, 69–75.
- Kirchhoff, E., Schieberle, P. (2002) Quantitation of odor-active compounds in rye flour and rye sourdough using stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5378–5385.

- Kobayashi, A., Kubota, K., Joki, Y., Wada, E., Wakabayashi, M. (1994) (Z)-3-Hexenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside in fresh tea leaves as a precursor of green odor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 592–593.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J., Magala, M. (2013) Effect of lentil and bean flours on rheological and baking properties of wheat dough. *Chem. Pap.* **67**, 398–407.
- Korakli, M., Rossmann, A., Gänzle, M.G., Vogel, R.F. (2001) Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5194–5200.
- Krogerus, K., Gibson, B.R. (2013) 125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *J. Inst. Brew.* **119**, 86–97.
- Langa, S., Landete, J.M., Martín-Cabrejas, I., Rodríguez, E., Arqués, J.L., Medina, M. (2013) In situ reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. *Food Control* **33**, 200–206.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C.G. (2007) Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *J. Food Eng.* **79**, 1033–1047.
- Lefebvre, D., Gabriel, V., Vayssier, Y., Fontagné-Faucher, C. (2002) Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process. *LWT - Food Sci. Technol.* **35**, 407–414.
- Leuschner, R.G.K., O’Callaghan, M.J.A., Arendt, E.K. (1997) Optimization of baking parameters of part-baked and rebaked Irish brown soda bread by evaluation of some quality characteristics. *Int. J. Food Sci. Technol.* **32**, 487–493.
- Li, L., Harflett, C., Beale, M.H., Ward, J.L. (2009) Phenolic acids. U: Healthgrain methods: Analysis of bioactive components in small grain cereals (Shewry, P.R., Ward, J.L., ured.). AACC International, str. 41–52.
- Licandro, H., Ho, P.H., Nguyen, T.K.C., Petchkongkaew, A., Nguyen, H. Van, Chu-Ky, S., Nguyen, T.V.A., Lorn, D., Waché, Y. (2020) How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products? *Food Control* **110**, 106957.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D., Pretorius, I.S. (2006) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* **23**, 641–659.
- Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K.E.A., Makharia, G.K., Mearin, M.L., Murray, J.A., Verdu, E.F., Kaukinen, K. (2019) Coeliac disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 1-18.
- Liu, K., Li, Y., Chen, F., Yong, F. (2017) Lipid oxidation of brown rice stored at different temperatures. *Int. J. Food Sci. Technol.* **52**, 188–195.
- Liu, T., Li, Y., Sadiq, F.A., Yang, H., Gu, J., Yuan, L., Lee, Y.K., He, G. (2018) Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread. *Food Chem.* **242**, 404–411.
- Maeda, T., Kikuma, S., Araki, T., Ikeda, G., Takeya, K., Sagara, Y. (2009) The effects of mixing stage and fermentation time on the quantity of flavor compounds and sensory intensity of flavor in white bread. *Food Sci. Technol. Res.* **15**, 117–126.



- Maire, M., Rega, B., Cuvelier, M.E., Soto, P., Giampaoli, P. (2013) Lipid oxidation in baked products: Impact of formula and process on the generation of volatile compounds. *Food Chem.* **141**, 3510–3518.
- Malcolmson, L., Frohlich, P., Boux, G., Bellido, A.S., Boye, J., Warkentin, T.D. (2014) Aroma and flavour properties of Saskatchewan grown field peas (*Pisum sativum* L.). *Can. J. Plant Sci.* **94**, 1419–1426.
- Malekian, F., Rao, R.M., Prinyawiwatkul, W., Marshall, W.E., Windhauser, M., Ahmedna, M. (2000) Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage, LSU Agricultural Experiment Station Reports.
- Man, S., Paucean, A., Muste, S., Pop, A. (2015) Effect of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour addition on physicochemical properties of wheat bread. *Bull. UASVM Food Sci. Technol.* **72**, 41–49.
- Marinangeli, C.P.F., Kassis, A.N., Jones, P.J.H. (2009) Glycemic responses and sensory characteristics of whole yellow pea flour added to novel functional foods. *J. Food Sci.* **74**, 385–389.
- Martínez-Anaya, M.A. (1996) Enzymes and bread flavor. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2469–2480.
- Mastromatteo, M., Danza, A., Lecce, L., Spinelli, S., Lampignano, V., Laverse, J., Conte, A., Del Nobile, M.A. (2015) Nutritional and physicochemical characteristics of wholemeal bread enriched with pea flour. *Int. J. Food Sci. Technol.* **50**, 92–102.
- Masure, H.G., Fierens, E., Delcour, J.A. (2016) Current and forward looking experimental approaches in gluten-free bread making research. *J. Cereal Sci.* **67**, 92–111.
- Matos, M.E., Rosell, C.M. (2015) Understanding gluten-free dough for reaching breads with physical quality and nutritional balance. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 653–661.
- Matos, M.E., Sanz, T., Rosell, C.M. (2014) Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins. *Food Hydrocoll.* **35**, 150–158.
- Meignen, B., Onno, B., Gélinas, P., Infantes, M., Guilois, S., Cahagnier, B. (2001) Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiol.* **18**, 239–245.
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ruzzi, M. (2017) Current and forward-looking approaches to technological and nutritional improvements of gluten-free bread with legume flours: a critical review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 1101–1122.
- Merkle, S., Kleeberg, K., Fritsche, J. (2015) Recent developments and applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in food and environmental analysis—a review. *Chromatography* **2**, 293–381.
- Millar, K.A., Barry-Ryan, C., Burke, R., Hussey, K., McCarthy, S., Gallagher, E. (2017) Effect of pulse flours on the physicochemical characteristics and sensory acceptance of baked crackers. *Int. J. Food Sci. Technol.* **52**, 1155–1163.
- Millar, K.A., Gallagher, E., Burke, R., McCarthy, S., Barry-Ryan, C. (2019) Proximate composition and anti-nutritional factors of fava-bean (*Vicia faba*), green-pea and yellow-pea (*Pisum sativum*) flour. *J. Food Compos. Anal.* **82**, 103233.

- Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B., Capellas, M. (2012) Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. *J. Cereal Sci.* **56**, 476–481.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011) Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu.
- Moghe, A., Ghare, S., Lamoreau, B., Mohammad, M., Barve, S., McClain, C., Joshi-Barve, S. (2015) Molecular mechanisms of acrolein toxicity: Relevance to human disease. *Toxicol. Sci.* **143**, 242–255.
- Mohammed, I., Ahmed, A.R., Senge, B. (2014) Effects of chickpea flour on wheat pasting properties and bread making quality. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1902–1910.
- Mondor, M., Guévremont, E., Villeneuve, S. (2014) Processing, characterization and bread-making potential of malted yellow peas. *Food Biosci.* **7**, 11–18.
- Moore, M.M., Dal Bello, F., Arendt, E.K. (2008) Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 1309–1316.
- Moore, M.M., Juga, B., Schober, T.J., Arendt, E.K. (2007) Effect of lactic acid bacteria on properties of gluten-free sourdoughs, batters, and quality and ultrastructure of gluten-free bread. *Cereal Chem.* **84**, 357–364.
- Moore, M.M., Schober, T.J., Dockery, P., Arendt, E.K. (2004) Textural comparisons of gluten-free and wheat-based doughs, batters, and breads. *Cereal Chem.* **81**, 567–575.
- Morales, F.J., Açar, Ö.Ç., Serpen, A., Arribas-Lorenzo, G., Gökmen, V. (2007) Degradation of free tryptophan in a cookie model system and its application in commercial samples. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6793–6797.
- Moroni, A. V., Dal Bello, F., Arendt, E.K. (2009) Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiol.* **26**, 676–684.
- Moroni, A. V., Zannini, E., Sensidoni, G., Arendt, E.K. (2012) Exploitation of buckwheat sourdough for the production of wheat bread. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 659–668.
- Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **419**, 448–449.
- Murat, C., Bard, M.H., Dhalleine, C., Cayot, N. (2013) Characterisation of odour active compounds along extraction process from pea flour to pea protein extract. *Food Res. Int.* **53**, 31–41.
- Murray, K.E., Shipton, J., Whitfield, F.B., Last, J.H. (1976) The volatiles of off-flavoured unblanched green peas (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food Agric.* **27**, 1093–1107.
- NATA (2018) General Accreditation Guidance-Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. National Association of Testing Authorities Australia.
- Nionelli, L., Curri, N., Curiel, J.A., Di Cagno, R., Pontonio, E., Cavoski, I., Gobbetti, M., Rizzello, C.G. (2014) Exploitation of Albanian wheat cultivars: Characterization of the flours and lactic acid bacteria microbiota, and selection of starters for sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **44**, 96–107.
- NN 8/2013, Pravilnik o informiranju potrošača o hrani.
- NN 81/2016, Pravilnik o žitaricama i proizvodima od žitarica.
- NN 84/2010, Pravilnik o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama.

- Nor Qhairul Izzreen, M.N., Petersen, M.A., Hansen, A.S. (2016) Volatile compounds in crumb of whole-meal wheat bread fermented with different yeast levels and fermentation temperatures. *Cereal Chem.* **93**, 209–216.
- Novotni, D., Čukelj, N., Smerdel, B., Bituh, M., Dujmić, F., Čurić, D. (2012) Glycemic index and firming kinetics of partially baked frozen gluten-free bread with sourdough. *J. Cereal Sci.* **55**, 120–125.
- Novotni, D., Vrana Špoljarić, I., Drakula, S., Čukelj, N., Voučko, B., Ščetar, M., Galić, K., Čurić, D. (2017) Influence of barley sourdough and vacuum cooling on shelf life quality of partially baked bread. *Food Technol. Biotechnol.* **55**, 464–474.
- Nunes, M.H.B., Ryan, L.A.M., Arendt, E.K. (2009) Effect of low lactose dairy powder addition on the properties of gluten-free batters and bread quality. *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 31–41.
- Olapade, A.A., Oluwole, O.B. (2013) Bread making potential of composite flour of wheat-acha (*Digitaria exilis* staph) enriched with cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) flour. *Niger. Food J.* **31**, 6–12.
- Olojede, A.O., Sanni, A.I., Banwo, K. (2020) Effect of legume addition on the physiochemical and sensorial attributes of sorghum-based sourdough bread. *LWT - Food Sci. Technol.* **118**, 108769.
- Onyango, C., Bley, T., Raddatz, H., Henle, T. (2004) Flavour compounds in backslop fermented uji (an East African sour porridge). *Eur. Food Res. Technol.* **218**, 579–583.
- Onyango, C., Unbehend, G., Lindhauer, M.G. (2009) Effect of cellulose-derivatives and emulsifiers on creep-recovery and crumb properties of gluten-free bread prepared from sorghum and gelatinised cassava starch. *Food Res. Int.* **42**, 949–955.
- Pacyński, M., Wojtasiak, R.Z., Mildner-Szkudlarz, S. (2015) Improving the aroma of gluten-free bread. *LWT - Food Sci. Technol.* **63**, 706–713.
- Padhi, E.M.T., Liu, R., Hernandez, M., Tsao, R., Ramdath, D.D. (2017) Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulses and their contribution to antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **38**, 602–611.
- Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (2005) Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochem.* **40**, 2813–2819.
- Paraskevopoulou, A., Chrysanthou, A., Koutidou, M. (2012) Characterisation of volatile compounds of lupin protein isolate-enriched wheat flour bread. *Food Res. Int.* **48**, 568–577.
- Park, J.B., Lim, S.H., Sim, H.S., Park, J.H., Kwon, H.J., Nam, H.S., Kim, M.D., Baek, H.H., Ha, S.J. (2017) Changes in antioxidant activities and volatile compounds of mixed berry juice through fermentation by lactic acid bacteria. *Food Sci. Biotechnol.* **26**, 441–446.
- Parker, J.K. (2015) Introduction to aroma compounds in foods. U: Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages (Parker, J.K., Elmore, S., Methven, L., ured.). Woodhead Publishing, str. 3–30.
- Parker, J.K., Hassell, G.M.E., Mottram, D.S., Guy, R.C.E. (2000) Sensory and instrumental analyses of volatiles generated during the extrusion cooking of oat flours. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3497–3506.

- Pathare, P.B., Opara, U.L., Al-Said, F.A.J. (2013) Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 36–60.
- Pawliszyn, J. (2012) Handbook of solid phase microextraction. Elsevier.
- Pawliszyn, J. (2002) Solid phase microextraction. U: A century of separation science (Issaq, H.J., ured.). Marcel Dekker, str. 399–420.
- Periago, M.J., Vidal, M.L., Ros, G., Rincón, F., Martínez, C., López, G., Rodrigo, J., Martínez, I. (1998) Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.* **63**, 71–78.
- Pétel, C., Onno, B., Prost, C. (2017) Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **59**, 105–123.
- Piazza, L., Masi, P. (1995) Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chem.* **72**, 320–325.
- Pico, J., Antolín, B., Román, L., Bernal, J., Gómez, M. (2019a) Selection of the most suitable mixture of flours and starches for the improvement of gluten-free breads through their volatile profiles. *Eur. Food Res. Technol.* **245**, 1755–1766.
- Pico, J., Antolín, B., Román, L., Gómez, M., Bernal, J. (2018a) Analysis of volatile compounds in gluten-free bread crusts with an optimised and validated SPME-GC/QTOF methodology. *Food Res. Int.* **106**, 686–695.
- Pico, J., Bernal, J., Gómez, M. (2015) Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review. *Food Res. Int.* **75**, 200–215.
- Pico, J., Hansen, Å.S., Petersen, M.A. (2017a) Comparison of the volatile profiles of the crumb of gluten-free breads by DHE-GC/MS. *J. Cereal Sci.* **76**, 280–288.
- Pico, J., Khomenko, I., Capozzi, V., Navarini, L., Bernal, J., Gómez, M., Biasioli, F. (2018b) Analysis of volatile organic compounds in crumb and crust of different baked and toasted gluten-free breads by direct PTR- ToF-MS and fast-GC-PTR-ToF-MS. *J. Mass Spectrom.* **53**, 893–902.
- Pico, J., Martínez, M.M., Bernal, J., Gómez, M. (2017b) Evolution of volatile compounds in gluten-free bread: From dough to crumb. *Food Chem.* **227**, 179–186.
- Pico, J., Reguilón, M.P., Bernal, J., Gómez, M. (2019b) Effect of rice, pea, egg white and whey proteins on crust quality of rice flour-corn starch based gluten-free breads. *J. Cereal Sci.* **86**, 92–101.
- Piecyk, M., Wołosiak, R., Druzynska, B., Worobiej, E. (2012) Chemical composition and starch digestibility in flours from Polish processed legume seeds. *Food Chem.* **135**, 1057–1064.
- Piergiovanni, L., Fava, P. (1997) Minimizing the residual oxygen in modified atmosphere packaging of bakery products. *Food Addit. Contam.* **14**, 765–773.
- Piluzza, G., Bullitta, S. (2011) Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm. Biol.* **49**, 240–247.
- Plessas, S., Alexopoulos, A., Bekatorou, A., Mantzourani, I., Koutinas, A.A., Bezirtzoglou, E. (2011) Examination of freshness degradation of sourdough bread made with kefir through monitoring the aroma volatile composition during storage. *Food Chem.* **124**, 627–633.

- Plessas, S., Fisher, A., Koureta, K., Psarianos, C., Nigam, P., Koutinas, A.A. (2008) Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. *Food Chem.* **106**, 985–990.
- Poinot, P., Arvisenet, G., Grua-Priol, J., Fillonneau, C., Le-Bail, A., Prost, C. (2010) Influence of inulin on bread: Kinetics and physico-chemical indicators of the formation of volatile compounds during baking. *Food Chem.* **119**, 1474–1484.
- Poinot, P., Arvisenet, G., Grua-Priol, J., Fillonneau, C., Mezaize, S., De Lamballerie, M., Le-Bail, A., Prost, C. (2009) Advances in the understanding of the chemical reactions responsible for bread flavour quality. *Czech J. Food Sci.* **27**, 54–57.
- Poinot, P., Grua-Priol, J., Arvisenet, G., Rannou, C., Semenou, M., Bail, A. Le, Prost, C. (2007) Optimisation of HS-SPME to study representativeness of partially baked bread odorant extracts. *Food Res. Int.* **40**, 1170–1184.
- Poutanen, K., Flander, L., Katina, K. (2009) Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiol.* **26**, 693–699.
- Pozo-Bayón, M.A., Guichard, E., Cayot, N. (2006) Flavor control in baked cereal products. *Food Rev. Int.* **22**, 335–379.
- Previtali, M.A., Mastromatteo, M., De Vita, P., Ficco, D.B.M., Conte, A., Del Nobile, M.A. (2014) Effect of the lentil flour and hydrocolloids on baking characteristics of wholemeal durum wheat bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**, 2382–2390.
- Provedbena uredba Komisije (EU) br. 828/2014 od 30. srpnja 2014. o zahtjevima za informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani.
- Purlis, E. (2010) Browning development in bakery products - A review. *J. Food Eng.* **99**, 239–249.
- Quattrini, M., Liang, N., Fortina, M.G., Xiang, S., Curtis, J.M., Gänzle, M. (2019) Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *Int. J. Food Microbiol.* **302**, 8–14.
- Quintas, M., Guimarães, C., Baylina, J., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M. (2007) Multiresponse modelling of the caramelisation reaction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **8**, 306–315.
- Raffo, A., Carcea, M., Castagna, C., Magri, A. (2015) Improvement of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry method for the analysis of wheat bread volatile compounds. *J. Chromatogr. A* **1406**, 266–278.
- Ratnayake, W.S., Hoover, R., Warkentin, T. (2002) Pea starch: Composition, structure and properties – A review. *Starch/Staerke* **54**, 217–234.
- Ravyts, F., De Vuyst, L. (2011) Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. *Food Microbiol.* **28**, 1129–1139.
- Rehman, S., Paterson, A., Piggott, J.R. (2006) Flavour in sourdough breads: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 557–566.
- Renzetti, S., Arendt, E.K. (2009a) Effects of oxidase and protease treatments on the breadmaking functionality of a range of gluten-free flours. *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 307–317.
- Renzetti, S., Arendt, E.K. (2009b) Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *J. Cereal Sci.* **50**, 22–28.

- 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. *J. Cereal Sci.* **48**, 33–45.
- Renzetti, S., Rosell, C.M. (2016) Role of enzymes in improving the functionality of proteins in non-wheat dough systems. *J. Cereal Sci.* **67**, 35–45.
- Rinaldi, M., Paciulli, M., Caligiani, A., Scazzina, F., Chiavaro, E. (2017) Sourdough fermentation and chestnut flour in gluten-free bread: A shelf-life evaluation. *Food Chem.* **224**, 144–152.
- Ripari, V., Cecchi, T., Berardi, E. (2016) Microbiological characterisation and volatiles profile of model, ex-novo, and traditional Italian white wheat sourdoughs. *Food Chem.* **205**, 297–307.
- Rizzello, C.G., Calasso, M., Campanella, D., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2014a) Use of sourdough fermentation and mixture of wheat, chickpea, lentil and bean flours for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread. *Int. J. Food Microbiol.* **180**, 78–87.
- Rizzello, C.G., Curiel, J.A., Nionelli, L., Vincentini, O., Di Cagno, R., Silano, M., Gobbetti, M., Coda, R. (2014). Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiol.* **37**, 59–68.
- Rizzello, C.G., Lavecchia, A., Gramaglia, V., Gobbetti, M. (2015) Long-term fungal inhibition by *Pisum sativum* flour hydrolysate during storage of wheat flour bread. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4195–4206.
- Rizzello, C.G., Lorusso, A., Russo, V., Pinto, D., Marzani, B., Gobbetti, M. (2017) Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **241**, 252–261.
- Rodríguez-Sandoval, E., Fernández-Quintero, A., Sandoval-Aldana, A., Cuvelier, G. (2008) Effect of processing conditions on the texture of reconstituted cassava dough. *Brazilian J. Chem. Eng.* **25**, 713–722.
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., de Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R. (2009) Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **132**, 79–90.
- Roland, W.S.U., Pouvreau, L., Curran, J., Van De Velde, F., De Kok, P.M.T. (2017) Flavor aspects of pulse ingredients. *Cereal Chem.* **94**, 58–65.
- Romano, R., Brockhoff, P.B., Hersleth, M., Tomic, O., Næs, T. (2008) Correcting for different use of the scale and the need for further analysis of individual differences in sensory analysis. *Food Qual. Prefer.* **19**, 197–209.
- Ronda, F., Roos, Y.H. (2011) Staling of fresh and frozen gluten-free bread. *J. Cereal Sci.* **53**, 340–346.
- Rosell, C.M., Gómez, M. (2014) Rice. U: Bakery products science and technology. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, str. 89–106.
- Rózyło, R., Rudy, S., Krzykowski, A., Dziki, D., Gawlik-Dziki, U., Rózyło, K., Skonecki, S. (2015) Effect of adding fresh and freeze-dried buckwheat sourdough on gluten-free bread quality. *Int. J. Food Sci. Technol.* **50**, 313–322.

- Rühmkorf, C., Jungkunz, S., Wagner, M., Vogel, R.F. (2012) Optimization of homoexopolysaccharide formation by lactobacilli in gluten-free sourdoughs. *Food Microbiol.* **32**, 286–294.
- Ruiz, J.A., Quilez, J., Mestres, M., Guasch, J. (2003) Solid-phase microextraction method for headspace analysis of volatile compounds in bread crumb. *Cereal Chem.* **80**, 255–259.
- Sadowska, J., Błaszczak, W., Fornal, J., Vidai-Valverde, C., Frias, J. (2003) Changes of wheat dough and bread quality and structure as a result of germinated pea flour addition. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 46–50.
- Sapone, A., Bai, J.C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D.S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., Fasano, A. (2012) Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* **10**, 1–12.
- Schieberle, P., Grosch, W. (1991) Potent odorants of the wheat bread crumb Differences to the crust and effect of a longer dough fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **192**, 130–135.
- Schieberle, P., Grosch, W. (1987) Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **185**, 111–113.
- Schindler, S., Zelena, K., Krings, U., Bez, J., Eisner, P., Berger, R.G. (2012) Improvement of the aroma of pea (*Pisum sativum*) protein extracts by lactic acid fermentation. *Food Biotechnol.* **26**, 58–74.
- Schmidt, M., Lynch, K.M., Zannini, E., Arendt, E.K. (2018) Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. *Food Control* **88**, 139–148.
- Schober, T.J., Messerschmidt, M., Bean, S.R., Park, S.H., Arendt, E.K. (2005) Gluten-free bread from sorghum: Quality differences among hybrids. *Cereal Chem.* **82**, 394–404.
- Schütz, H., Radler, F. (1984) Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 169–178.
- Seitz, L.M., Chung, O.K., Rengarajan, R. (1998) Volatiles in selected commercial breads. *Cereal Chem.* **75**, 847–853.
- Sensory Evaluation Division (1975) Institute of Food Technologists. Chicago.
- Settanni, L., Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Corona, O., Miceli, A., Moschetti, G. (2013) An integrated technological approach to the selection of lactic acid bacteria of flour origin for sourdough production. *Food Res. Int.* **54**, 1569–1578.
- Shen, Y., Chen, G., Li, Y. (2018) Bread characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products of white pan bread containing various sugars. *LWT - Food Sci. Technol.* **95**, 308–315.
- Shen, Y., Tebben, L., Chen, G., Li, Y. (2019) Effect of amino acids on Maillard reaction product formation and total antioxidant capacity in white pan bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* **54**, 1372–1380.
- Shevkani, K., Singh, N. (2014) Influence of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates on the characteristics of starch-based gluten-free muffins. *Int. J. Food Sci. Technol.* **49**, 2237–2244.

- Simons, C.W., Hall, C. (2018) Consumer acceptability of gluten-free cookies containing raw cooked and germinated pinto bean flours. *Food Sci. Nutr.* **6**, 77–84.
- Singh, P., Arora, A., Strand, T.A., Leffler, D.A., Catassi, C., Green, P.H., Kelly, C.P., Ahuja, V., Makharia, G.K. (2018) Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 823–836.
- Smerdel, B., Pollak, L., Novotni, D., Čukelj, N., Benković, M., Lušić, D., Čurić, D. (2012) Improvement of gluten-free bread quality using transglutaminase, various extruded flours and protein isolates. *J. Food Nutr. Res.* **51**, 242–253.
- Smith, P.R., Johansson, J. (2005) Influences of the Proportion of Solid Fat in a Shortening on Loaf Volume and Staling of Bread. *J. Food Process. Preserv.* **28**, 359–367.
- Spicher, G. (1983) Baked Goods. U: Biotechnology (Rehm, J.H., Reed, G., ured.). Wiley-VCH, Weinheim, str. 1–80.
- Stantiall, S.E., Serventi, L. (2018) Nutritional and sensory challenges of gluten-free bakery products: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **69**, 427–436.
- Starowicz, M., Zieliński, H. (2019) How Maillard reaction influences sensorial properties (color, flavor and texture) of food products? *Food Rev. Int.* **35**, 707–725.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B. (2011) Effect of inoculated lactic acid fermentation on antinutritional and antiradical properties of grass pea (*Lathyrus sativus* 'Krab') flour. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **61**, 245–249.
- Sterr, Y., Weiss, A., Schmidt, H. (2009) Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 75–82.
- Sun, D.W., Zheng, L. (2006) Vacuum cooling technology for the agri-food industry: Past, present and future. *J. Food Eng.* **77**, 203–214.
- Svensson, L. (2012) Design and performance of small scale sensory consumer tests. The Faculty of Natural Resources and Agricultural Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Taylor, J.R.N., Awika, J.M., ured. (2017) *Gluten-Free Ancient Grains*. Elsevier.
- Texture Profile Analysis (2020) <https://texturetechnologies.com/resources/texture-profile-analysis#tpa-measurements> (pristupljeno 2.18.20).
- TGSC (2020) <http://www.thegoodscentscompany.com/> (pristupljeno 1.1.20).
- Thiele, C., Gänzle, M.G., Vogel, R.F. (2002) Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chem.* **79**, 45–51.
- Toews, R., Wang, N. (2013) Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food Res. Int.* **52**, 445–451.
- Torrieri, E., Pepe, O., Ventorino, V., Masi, P., Cavella, S. (2014) Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT - Food Sci. Technol.* **56**, 508–516.
- Trinidad, T.P., Mallillin, A.C., Loyola, A.S., Sagum, R.S., Encabo, R.R. (2010) The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *Br. J. Nutr.* **103**, 569–574.



- Üçok, G., Hayta, M. (2015) Effect of sourdough addition on rice based gluten-free formulation: Rheological properties of dough and bread quality. *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods* **7**, 643–649.
- Upasen, S., Wattanachai, P. (2018) Packaging to prolong shelf life of preservative-free white bread. *Heliyon* **4**, e00802.
- Vallons, K.J.R., Ryan, L.A.M., Arendt, E.K. (2011) Promoting structure formation by high pressure in gluten-free flours. *LWT - Food Sci. Technol.* **44**, 1672–1680.
- Van Beek, S., Priest, F.G. (2000) Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5322–5328.
- Van Kerrebroeck, S., Comasio, A., Harth, H., De Vuyst, L. (2018) Impact of starter culture, ingredients, and flour type on sourdough bread volatiles as monitored by selected ion flow tube-mass spectrometry. *Food Res. Int.* **106**, 254–262.
- Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., Moschetti, G., Settanni, L. (2015) Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **51**, 57–68.
- Vermeulen, N., Czerny, M., Gänzle, M.G., Schieberle, P., Vogel, R.F. (2007) Reduction of (E)-2-nonenal and (E,E)-2,4-decadienal during sourdough fermentation. *J. Cereal Sci.* **45**, 78–87.
- Verni, M., Verardo, V., Rizzello, C.G. (2019) How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. *Foods* **8**, 1–21.
- Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Serrazanetti, D., Gianotti, A., Vallicelli, M., Guerzoni, M.E. (2008) Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli. *Food Chem.* **108**, 1217–1225.
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M., Polzonetti, V. (2016) Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin. Nutr.* **35**, 1236–1241.
- Vlášek, V., Langová, J., Štencl, J. (2013) Effect of modified atmosphere packaging on stability of three kinds of bread. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* **61**, 1881–1887.
- Vollenweider, S., Evers, S., Zurbriggen, K., Lacroix, C. (2010) Unraveling the hydroxypropionaldehyde (HPA) system: An active antimicrobial agent against human pathogens. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10315–10322.
- Vollenweider, S., Lacroix, C. (2004) 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 16–27.
- Voučko, B. (2018) Application of food industry by-products and innovative technologies in development of bakery products for celiac and diabetes patients. Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb.
- Wang, K., Lu, F., Li, Z., Zhao, L., Han, C. (2017) Recent developments in gluten-free bread baking approaches: A review. *Food Sci. Technol.* **37**, 1–9.
- Wang, Z.H., Dou, J., Macura, D., Durance, T.D., Nakai, S. (1997) Solid phase extraction for GC analysis of beany flavours in soymilk. *Food Res. Int.* **30**, 503–511.

- Warkentin, T.D., Smýkal, P., Coyne, C.J., Weeden, N., Domoney, C., Bing, D.-J., Leonforte, A., Xuxiao, Z., Dixit, G.P., Boros, L., McPhee, K.E., McGee, R.J., Burstin, J., Ellis, T.H.N. (2015) Pea. U: Grain legumes (De Ron, A.M., ured.). Springer, New York, str. 37–83.
- Witczak, M., Ziobro, R., Juszczak, L., Korus, J. (2016) Starch and starch derivatives in gluten-free systems - A review. *J. Cereal Sci.* **67**, 46–57.
- Wolter, A., Hager, A.S., Zannini, E., Czerny, M., Arendt, E.K. (2014) Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads. *Int. J. Food Microbiol.* **172**, 83–91.
- Wu, J., Xie, W., Pawliszyn, J. (2000) Automated in-tube solid phase microextraction coupled with HPLC-ES-MS for the determination of catechins and caffeine in tea. *Analyst* **125**, 2216–2222.
- Xu, M., Jin, Z., Lan, Y., Rao, J., Chen, B. (2019) HS-SPME-GC-MS/olfactometry combined with chemometrics to assess the impact of germination on flavor attributes of chickpea, lentil, and yellow pea flours. *Food Chem.* **280**, 83–95.
- Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M., Shibamoto, T. (2003) Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3999–4003.
- Yu, L., Perret, J., Davy, B., Wilson, J., Melby, C.L. (2002) Antioxidant properties of cereal products. *J. Food Sci.* **67**, 2600–2603.
- Zannini, E., Jones, J.M., Renzetti, S., Arendt, E.K. (2012) Functional replacements for gluten. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **3**, 227–245.
- Ziobro, R., Juszczak, L., Witczak, M., Korus, J. (2016) Non-gluten proteins as structure forming agents in gluten free bread. *J. Food Sci. Technol.* **53**, 571–580.
- Ziobro, R., Korus, J., Juszczak, L., Witczak, T. (2013a) Influence of inulin on physical characteristics and staling rate of gluten-free bread. *J. Food Eng.* **116**, 21–27.
- Ziobro, R., Witczak, T., Juszczak, L., Korus, J. (2013b) Supplementation of gluten-free bread with non-gluten proteins. Effect on dough rheological properties and bread characteristic. *Food Hydrocoll.* **32**, 213–220.

## 7. PRILOZI

### Prilog 1. Test za deskriptivnu analizu mirisa sredine i kore kruha

#### Deskriptivna senzorska analiza mirisa kruha

Na skali **intenziteta** od 0 do 10 (**0 – nije detektirano, 10 – visoki intenzitet**) ocijenite intenzitet atributa mirisa uzoraka. Ocjena može biti bilo koji broj od 0 do 10 (npr. 4,3 ili 9,7).

Atribut mirisa	Sredina kruha				Kora kruha			
	250	196	573	241	582	691	375	142
Po grašku								
Po kvascu								
Po kuhanoj riži								
Po kukuruzu								
Po sirovom tijestu								
Po masnom								
Po kikirikiju								
Po prženom šećeru								
Po svježem kruhu								
Po kokicama								
Po pečenom								
Po izgorenom								

### Prilog 2. Test za hedonističku analizu mirisa sredine i kore kruha

#### Hedonistička senzorska analiza mirisa kruha

Na ljestvici od 1 do 9 ocijenite **svidanje sveukupnog mirisa** pojedinog uzorka, pri čemu je značenje ocjena:

- 1 – izrazito mi se ne sviđa,
- 2 – veoma mi se ne sviđa,
- 3 – umjereno mi se ne sviđa,
- 4 – neznatno mi se ne sviđa,
- 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa,
- 6 – neznatno mi se sviđa,
- 7 – umjereno mi se sviđa,
- 8 – veoma mi se sviđa,
- 9 – izrazito mi se sviđa.

Uzorak	Sredina kruha				Kora kruha			
	250	196	573	241	582	691	375	142
Ocjena svidanja								

### Prilog 3. Test za deskriptivnu analizu arome kruha

#### Deskriptivna senzorska analiza arome kruha

Na skali **intenziteta** od 0 do 10 (**0 – nije detektirano**, **10 – visoki intenzitet**) ocijenite intenzitet atributa okusa i arome uzoraka. Ocjena može biti bilo koji broj od 0 do 10 (npr. 4,3 ili 9,7).

Atributi		285	196	573	241
Okus	Slatko				
	Slano				
	Kiselost				
	Gorko				
Aroma	Sveukupno kisela				
	Mliječna				
	Tijesto				
	Kvasac				
	Riža				
	Kukuruz				
	Žitarice				
	Graškasta				
	Orašasta				
	Prašnjava, zagušljiva				
	Kokice				
	Pečeno				
	Masno				
	Užeglo				
Svježi kruh					
Naknadno	Naknadni gorki okus				
	Naknadna aroma graška				

### Prilog 4. Test za hedonističku analizu arome kruha

#### Hedonistička senzorska analiza arome kruha

Na ljestvici od 1 do 9 ocijenite **svidanje sveukupne arome** svakog uzorka, pri čemu je:

- 1 – izrazito mi se ne sviđa
- 2 – veoma mi se ne sviđa
- 3 – umjereno mi se ne sviđa
- 4 – neznatno mi se ne sviđa
- 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa
- 6 – neznatno mi se sviđa
- 7 – umjereno mi se sviđa
- 8 – veoma mi se sviđa
- 9 – izrazito mi se sviđa

285	196	573	241

**Prilog 5.** Test za deskriptivnu analizu izgleda i teksture kruha

**Deskriptivna senzorska analiza izgleda i teksture kruha**

Odredite u svim uzorcima **intenzitet pojedinog senzorskog atributa** na skali **od 0 do 10**, gdje je:

**0** – potpuno neizraženo

**5** – srednje izraženo

**10** – naročito visoko izraženo

Svojstvo		285	196	573	241
<b>Izgled</b>	<b>Boja kore</b>				
	<b>Boja sredine</b>				
	<b>Poroznost sredine</b>				
<b>Tekstura</b>	<b>Mrvljivost</b> na dodir, količina mrvica nakon prelaska prstom tri puta u istom smjeru po površini sredine				
	<b>Vlažnost</b> pri žvakanju				
	<b>Tvrdoća</b> sila potrebna za zagriz kroz sredinu s prednjim zubima				
	<b>Žvakljivost</b> sila potrebna za pripremu zalogaja za gutanje				
	<b>Ljepljivost</b> sila potrebna za uklanjanje s nepca, zubiju i jezika				

## Prilog 6. Test za hedonističku analizu sveukupnog doživljaja kruha

### Hedonistička senzorska analiza sveukupnog doživljaja kruha

Na ljestvici od 1 do 9 ocijenite uzorak s obzirom na sveukupni doživljaj, pri čemu je značenje ocjena:

- 1 – izrazito mi se ne sviđa,
- 2 – veoma mi se ne sviđa,
- 3 – umjereno mi se ne sviđa,
- 4 – neznatno mi se ne sviđa,
- 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa,
- 6 – neznatno mi se sviđa,
- 7 – umjereno mi se sviđa,
- 8 – veoma mi se sviđa,
- 9 – izrazito mi se sviđa.

Uzorak	285	196	573	241
Ocjena svidanja				

## Prilog 7. Test nizanja kruha po preferenciji

### Test nizanja po preferenciji

Poredajte uzorke od onog kojeg sveobuhvatno najviše preferirate do najmanje poželjnog:

- 1 – najviše preferiram
  - 4 – najmanje preferiram
- 285 \_\_\_\_\_
- 196 \_\_\_\_\_
- 573 \_\_\_\_\_
- 241 \_\_\_\_\_

## Životopis

Saša Drakula rođena je 5. srpnja 1988. godine u Vukovaru. Osnovu školu i opću gimnaziju završila je u Zagrebu. Preddiplomski studij Nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila je 2010. godine. Diplomirala je 2013. godine na istom fakultetu, studij Upravljanje sigurnošću hrane. Tijekom studija nagrađena je Rektorovom nagradom (akad. god. 2011./2012.), Nagradom dekana za najbolji ukupni prosjek ostvaren na preddiplomskom studiju Nutricionizam i Poveljom dekana za ostvarene rezultate u svojoj generaciji na 3. godini preddiplomskog studija Nutricionizam (akad. god. 2009./2010.). Od 2015. godine zaposlena je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu kao stručni suradnik u sustavu znanosti i visokog obrazovanja, a od 2017. godine kao asistent u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji. Akad. god. 2014./2015. je upisala doktorski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam, smjer Prehrambena tehnologija. Sudjelovala je u istraživačkim projektima Primjena vakuumske hladnje u proizvodnji hrane produljene trajnosti i svježine (IP 09.01/279) i Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-06-2016-3789) Hrvatske zaklade za znanost te projektu Unapređivanje studijskih programa u biotehničkom području prema načelima HKO-a financiranom od strane Europske unije. Sudjeluje u izvođenju nastave na osam predmeta na preddiplomskim i diplomskim studijima Fakulteta te kao pomoć pri izradi završnih i diplomskih radova. Koautor je sedam A1 radova, dva A2 rada i tri A3 rada, knjige „100 (i pokoja više) crtica iz znanosti o prehrani“ te je sudjelovala na 11 međunarodnih znanstvenih skupova.

### Popis objavljenih radova

#### Znanstveni radovi iz skupine A1

1. Čukelj Mustać, N., Novotni, D., Habuš, M., **Drakula, S.**, Nanjara, L., Voučko, B., Benković, M., Ćurić, D. (2020) Storage stability, micronisation, and application of nutrient-dense fraction of proso millet bran in gluten-free bread. *J. Cereal Sci.* **91**.
2. Balbino, S., Dorić, M., Vidaković, S., Kraljić, K., Škevin, D., **Drakula, S.**, Voučko, B., Čukelj, N., Obranović, M., Ćurić, D. (2019) Application of cryogenic grinding pretreatment to enhance extractability of bioactive molecules from pumpkin seed cake. *J. Food Process Eng.* **42**, 1–13.

3. **Drakula, S.**, Novotni, D., Čukelj Mustač, N., Voučko, B., Krpan, M., Hruškar, M., Čurić, D. (2019) A Simple HS-SPME/GC-MS Method for Determination of Acrolein from Sourdough to Bread. *Food Anal. Methods* **12**, 2582–2590.
4. Čukelj Mustač, N., Voučko, B., Novotni, D., **Drakula, S.**, Gudelj, A., Dujmić, F., Čurić, D. (2019) Optimization of high intensity ultrasound treatment of proso millet bran to improve physical and nutritional quality. *Food Technol. Biotechnol.* **57**, 183–190.
5. Novotni, D., Vrana Špoljarić, I., **Drakula, S.**, Čukelj, N., Voučko, B., Ščetar, M., Galić, K., Čurić, D. (2017) Influence of barley sourdough and vacuum cooling on shelf life quality of partially baked bread. *Food Technol. Biotechnol.* **55**, 464–474.
6. Čukelj, N., Novotni, D., Sarajlija, H., **Drakula, S.**, Voučko, B., Čurić, D. (2017) Flaxseed and multigrain mixtures in the development of functional biscuits. *LWT - Food Sci. Technol.* **86**, 85–92.
7. Čukelj, N., Putnik, P., Novotni, D., **Ajredini, S.**, Voučko, B., Čurić, D. (2016) Market potential of lignans and omega-3 functional cookies. *Br. Food J.* **118**, 2420–2433.

#### **Znanstveni radovi iz skupine A2**

1. Novotni, D., Čukelj, N., Šicel, T., **Drakula, S.**, Vrana Špoljarić, I., Voučko, B., Čurić, D. (2017) Frozen stored barley sourdough: stability and application to wheat bread. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **9**, 173–181.
2. Čukelj, N., **Ajredini, S.**, Krpan, M., Novotni, D., Voučko, B., Vrana Špoljarić, I., Hruškar, M., Čurić, D. (2015) Bioactives in organic and conventional milled cereal products from Croatian market. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **10**, 23–30.

#### **Znanstveni radovi iz skupine A3**

1. Krpan, M., Mačešić, K., **Ajredini, S.**, Hruškar, M., Marušić Radovčić, N., Janči, T. (2016) Assessment of added water in seafood products on Croatian market. *Proceedings of 46<sup>th</sup> WEFTA CONFERENCE „From Local Fish to Global DISH“* (Vidaček, S., ured.), Split, Hrvatska, str. 15-18.
2. **Ajredini, S.**, Novotni, D., Čukelj, N., Krpan, M., Hruškar, M., Čurić, D. (2015) Resistance of sourdough starter cultures to freezing. *Proceedings of 8<sup>th</sup> International*



*Congress Flour-Bread '15, 10<sup>th</sup> Croatian Congress of Cereal Technologists Brašno-Kruh '15* (Koceva Komlenić, D., ured.), Opatija, Hrvatska, str. 11-20.

3. Vrana Špoljarić, I., Maričić, N., Novotni, D., **Ajredini, S.**, Voučko, B., Ćurić, D. (2015) Characteristics of barley sourdough during frozen storage. *Proceedings of 8<sup>th</sup> International Congress Flour-Bread '15, 10<sup>th</sup> Croatian Congress of Cereal Technologists Brašno-Kruh '15* (Koceva Komlenić, D., ured.), Opatija, Hrvatska, str. 21-32.