

# Proces spontane fermentacije kiselog tijesta od ječmenog i zobenog brašna

---

**Novački, Magdalena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:070138>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Magdalena Novački**  
58220219

**PROCES SPONTANE FERMENTACIJE KISELOG TIJESTA OD JEČMENO I  
ZOBENOG BRAŠNA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog projekta:** ovaj rad izrađen je u okviru projekta „FLAT BREAD MINE“, PRIMA programa (No 2031). (This project is part of the PRIMA programme, which is an Art. 185 initiative supported and funded under Horizon 2020, the European Union's Framework Programme for Research and Innovation)

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

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### Proces spontane fermentacije kiselog tijesta od ječmenog i zobenog brašna Magdalena Novački, 58220219

#### Sažetak:

Cilj ovog rada je bio utvrditi može li spontanom fermentacijom zobenog ili ječmenog brašna nastati dovoljan broj i povoljan omjer bakterija mliječne kiseline (BMK) i kvasaca za primjenu kiselog tijesta tipa I u pekarstvu. Tijekom pet dana pripreme matičnog kiselog tijesta praćen je broj živih stanica ukupnih bakterija, BMK i kvasaca, u zreлом kiselom tijestu je izmjerena ukupna kiselost titracijom (TTA) te je određen volumen ugljičnog dioksida u krušnom tijestu s dodatkom kiselog tijesta (30 % i 50 %) ili pekarskog kvasca pomoću fermentografa. U ječmenom kiselom tijestu (pH 3,67) omjer BMK i kvasaca je bio  $10^7:10^7$ , a TTA 8,95 mL 0,1 M NaOH. U zobenom kiselom tijestu postignut je povoljan broj BMK i kvasaca  $10^8:10^6$ , pH 4,2 i TTA 7,25 mL 0,1 M NaOH. Volumen nastalog  $\text{CO}_2$  u krušnom tijestu bez dodataka pekarskog kvasca je bio od 25 do 65  $\text{cm}^3$ . Može se zaključiti kako je spontano fermentirano zobeno kiselo tijesto prikladno za pekarske proizvode, ali uz dodatak pekarskog kvasca.

**Ključne riječi:** broj živih stanica, ječmeno brašno, kiselo tijesto tip I, spontana fermentacija, zobeno brašno

**Rad sadrži:** 26 stranica, 2 slike, 8 tablica, 20 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

**Pomoć pri izradi:** univ. bacc. ing. Lidija Drobac, mag. ing. Tomislava Grgić

**Datum obrane:** 16.07.2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering  
Laboratory for Chemistry and Technology of Cereals

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

**The process of spontaneous sourdough fermentation of barley and oat flour**

**Magdalena Novački, 58220219**

### **Abstract:**

The aim of this study was to determine whether spontaneous fermentation of oat or barley flour can produce a sufficient number and favourable ratio of lactic acid bacteria (LAB) and yeast for successful application of sourdough type I in baking. During the five-day preparation of the mother sourdough, the number of viable total bacterial cells, LAB, and yeasts were monitored, the total titratable acidity (TTA) was measured in the mature sourdough, and the volume of carbon dioxide produced in the bread dough with the addition of sourdough (30% and 50%) or baker's yeast was determined using a fermentograph. In the barley sourdough (pH 3.67), the ratio of LAB to yeast was  $10^7:10^7$ , and the TTA was 8.95 mL of 0.1 M NaOH. In the oat sourdough, a favourable number of LAB to yeast,  $10^8:10^6$ , pH 4.2, and TTA 7.25 mL of 0.1 M NaOH were achieved. The volume of CO<sub>2</sub> produced in the bread dough without the addition of baker's yeast ranged from 25 to 65 cm<sup>3</sup>. It can be concluded that spontaneously fermented oat sourdough is suitable for bakery products, but with the addition of baker's yeast.

**Keywords:** colony forming units, barley flour, oat flour, sourdough type I, spontaneous fermentation

**Thesis contains:** 26 pages, 2 figures, 8 tables, 20 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Dubravka Novotni, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Lidija Drobac univ.bacc.ing., Tomislava Grgić, M.Sc.

**Thesis defended:** July 16, 2024

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. JEČMENO I ZOBENO BRAŠNO .....	2
2.1.1. SVOJSTVA KVALITETE BRAŠNA .....	2
2.2. KISELO TIJESTO .....	3
2.2.1. TEHNOLOŠKI PROCESI U PRIPREMI KISELOG TIJESTA .....	5
2.2.2. PRINOS TIJESTA .....	6
2.3. STARTER KULTURA .....	6
2.4. PROCES SPONTANE FERMENTACIJE .....	9
2.4.1. VRIJEME I TEMPERATURA FERMENTACIJE .....	10
2.4.2. SKLADIŠTENJE KISELOG TIJESTA .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
3.1. MATERIJALI .....	12
3.1.1. SIROVINE I KEMIKALIJE: .....	12
3.1.2. APARATURA I PRIBOR: .....	12
3.2. METODE .....	13
3.2.1. PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA .....	13
3.2.2. PRIPREMA MATIČNOG KISELOG TIJESTA .....	14
3.2.3. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA MIKROORGANIZAMA U KISELOM TIJESTU .....	15
3.2.4. PRIPREMA KISELOG TIJESTA .....	15
3.2.5. UKUPNA KISELOST TITRACIJOM .....	16
3.2.6. PRIPREMA KRUŠNOG TIJESTA I ODREĐIVANJE PRODUKCIJE UGLJIČNOG DIOKSIDA .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
4.1. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA U KISELOM TIJESTU .....	18
4.2. SVOJSTVA ZRELOG KISELOG TIJESTA .....	20
4.3. VOLUMEN UGLJIČNOG DIOKSIDA U KRUŠNOM TIJESTU .....	21

<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>23</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>24</b>

## 1. UVOD

Ječmeno i zobeno brašno sve više se koriste u pekarskoj proizvodnji zbog veće potražnje za zdravijim i senzorski privlačnijim proizvodima. Proizvodi od ječmenog i zobenog brašna prepoznati su po značajnoj količini vlakana, proteina i minerala (Grgić i sur., 2024). No, nedostatak glutenske mreže u tim brašnima negativno utječe na volumen i senzorska svojstva kruha i pekarskih proizvoda.

Fermentacija je proces koji se koristi već dug niz godina u svrhu očuvanja hrane i poboljšanje njezinih senzorskih svojstava (Garcia-Bejar i sur., 2023). U pekarstvu, kisela tijesta se tradicionalno koriste u proizvodnji kruha. Kruh proizveden uz dodatak kiselog tijesta ima specifičan kiseli okus i aromu te mu je produžena trajnost i svježina. Kisela tijesta mogu biti spontano fermentirana od brašna, vode i prirodno prisutnih mikroorganizama, odnosno bakterija mliječne kiseline i kvasaca (Novotni i sur., 2020). Ovakvu vrstu tijesta potrebno je redovito i konstantno osvježavati dodatkom svježeg brašna i vode.

Cilj ovog rada je bio ispitati mogućnost spontane fermentacije ječmenog i zobenog brašna sa svrhom produkcije bakterija mliječne kiseline i kvasaca u dovoljnom broju i u odgovarajućem omjeru, odnosno, ispitati sposobnost dizanja krušnog tijesta pomoću pripremljenog kiselog tijesta.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. JEČMENO I ZOBENO BRAŠNO

Ječmeno i zobeno brašno ubrajamo pod cjelovita brašna (Jokinen i sur., 2022), jer se proizvode mljevenjem cjelovitih zrna. Karakterizira ih kemijski sastav bogat vlaknima, proteinima, vitaminima i mineralnim tvarima (Grgić i sur., 2024). Također, sadrže beta-glukan koji pomaže u regulaciji razine šećera u krvi i smanjuje kolesterol (Zannini i sur., 2009). Najpopularniji proizvodi od zobi su zobene pahuljice, granola i zdrave grickalice te se koristi kao sastojak za pekarske proizvode poput keksa i kruha (Jokinen i sur., 2022). Vrsta žitarice koja se koristi u proizvodnji brašna utječe na razvoj i aktivnost bakterija i kvasca tijekom fermentacije tijesta.

#### 2.1.1. Svojstva kvalitete brašna

Jedan od važnijih parametara kvalitete brašna koji ujedno utječu na fermentaciju kiselog tijesta i govori nam o nutritivnoj vrijednosti brašna je sadržaj pepela. Ono se odnosi na količinu mineralnih tvari koje zaostanu nakon što se organski materijal spali te ovisi o stupnju izmeljavanja zrna (Novotni i sur., 2020). Ječmeno i zobeno brašno imaju vrlo sličan sadržaj pepela, iako ječam u prosjeku ima nešto više pepela (između 1,5 % i 2,5 % u odnosu na zob od 1,56 % do 2,3 %) što ga čini bogatijim mineralnim tvarima. Najveća je razlika sastava mineralnih tvari između brašna u količini magnezija i željeza te nešto manja u količini cinka i bakra (Grgić i sur., 2024; Vlak, 2019). Sadržaj pepela također je povezan s kapacitetom puferiranja, odnosno s postizanjem kiselosti zrelog kiselog tijesta (Novotni i sur., 2020).

Kapacitet puferiranja se odnosi na sposobnost tvari da održava stabilnu pH vrijednost usprkos dodavanju kiseline ili lužine tj. tijekom fermentacije (Anonymous 1, 2024), dok je ukupna kiselost titracijom (TTA) mjera ukupne količine kiselina koje su prisutne u brašnu ili tijestu (Anonymous 3, 2024). Što je veći kapacitet puferiranja bolje se održava stabilan pH, čak kad se poveća TTA, što rezultira optimalnom aktivnošću mikroorganizama. Također, sadržaj pepela u brašnima pozitivno utječe na kiselost kiselog tijesta te proizvodnju ugljičnog dioksida (Novotni i sur., 2020). Ječmeno i zobeno brašno također karakterizira visok stupanj izmeljavanja što znači da brašno sadrži veći udio cijelog zrna, uključujući mekinje i klice (Anonymous 2, 2024). Osim minerala, brašna s višim stupnjem izmeljavanja sadrže veći udio drugih vrsta mikronutrijenata koji utječu na rast laktobacila i kvasaca. Ječmeno i zobeno brašno bogato je vlaknima i proteinima, ali zbog nedostatka glutena potrebno je prilagoditi recepturu u izradi pekarskih proizvoda miješanjem s pšeničnim brašnom.



## 2.2. KISELO TIJESTO

Kiselo tijesto (poznato kao i eng. *Sourdough*) je fermentirana mješavina brašna od žitarica, većinski pšeničnog ili raženog, i vode te se ponekad dodaju drugi sastojci poput soli, saharoze ili brašna od drugih žitarica ili pseudožitarica (Novotni i sur., 2020). Kiselo tijesto se koristi kod tradicionalnog načina pripreme kruha koji koristi prirodne fermentacijske procese, odnosno spontanu fermentaciju te u industrijskoj proizvodnji kruha (kao prirodni poboljšivač) zajedno s pekarskim kvascem za dizanje. Spontana se fermentacija kiselog tijesta tipa I postiže zahvaljujući prirodno prisutnim mikroorganizmima u brašnu, od kojih su najvažniji kvasci i bakterije mliječne kiseline tj. laktobacili, a postoje i drugi tipovi kiselog tijesta koji se proizvode dodatkom definirane starter kulture. Proizvodnja kiselog tijesta u pekarstvu donosi brojne prednosti (tablica 1) koje se odnose na probavljivost, okus, nutritivna svojstva, te tehnološka svojstva gotovog proizvoda (Novotni i sur., 2020).

Kiselo tijesto zahtijeva duže vrijeme pripreme, ali rezultira bogatijim i složenijim okusom pekarskog proizvoda u odnosu na proizvod dobiven samo pomoću pekarskog kvasca kao jedinog sredstva dizanja. Za izradu kiselog tijesta najbolje je koristiti brašno od cjelovitog zrna iz više razloga. Jedan od razloga je što takvo brašno sadrži više vlakana, vitamina i mineralnih tvari jer se proizvodi od svih dijelova zrna (Garcia-Bejar i sur., 2023). Također, cjelovito brašno sadrži više mikroorganizama (prirodno prisutnih kvasaca i laktobacila) koje se nalaze na površini zrna, koji budu uklonjene u procesu rafinacije (Mrvica, 2019).

**Tablica 1.** Prednosti korištenja kiselog tijesta u pekarstvu (Mykhonik i sur., 2023; Mrvčić i sur., 2011)

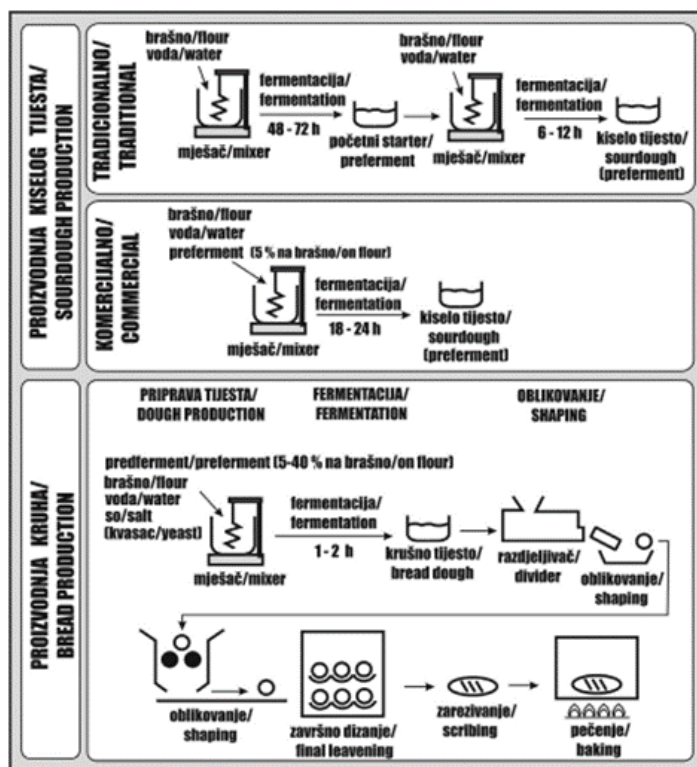
<b>Prednosti korištenja</b>	<b>Objašnjenje</b>
Svojstva konzerviranja	Kiselost tijesta proizvodi octenu kiselinu koja prirodno sprječava rast plijesni, čime se produžava trajnost kruha
Povećana probavljivost	Dugotrajna fermentacija razgrađuje proteine (gluten), što olakšava probavu
Jača okusno-aromatična svojstva gotovog proizvoda	Kiseljenjem tijesta proizvode se mliječna i octena kiselina te drugi metaboliti (alkoholi, aldehidi, esteri) koji pridonose specifičnom okusu i aromi
Povećana bioraspoloživost mineralnih tvari i vitamina	Fermentacija smanjuje količinu fitata koji vežu mineralne tvari i otežavaju njihovu apsorpciju
Održiva proizvodnja	Smanjuje se potreba za komercijalnim kvascem i kemijskim aditivima
Smanjen glikemijski indeks	Kiseljenje tijesta smanjuje glikemijski indeks kruha, što znači da njegova konzumacija manje utječe na porast razine šećera u krvi nakon obroka
Smanjena koncentracija pesticida i mikotoksina	Mikroorganizmi prisutni u kiselom tijestu razgrađuju neke vrste pesticida i mikotoksina u brašnu

Cjelovito brašno sadrži i više enzima u usporedbi s rafiniranim brašnom. Enzimi igraju ključnu ulogu u procesu fermentacije, strukturi tijesta i konačnoj kvaliteti pečenih proizvoda (Alder, 2021). Amilolitički enzimi su prirodno prisutni u klici i mekinjama, pa je iz tog razloga njihova aktivnost veća u cjelovitom brašnu. Razgrađuju škrob na jednostavnije šećere (dekstrin i maltoza) koje kvasci koriste kao hranu tijekom fermentacije. Veća dostupnost šećera povećava aktivnost kvasaca što dovodi do boljeg dizanja tijesta. No, tu se javlja i problem, ako se previše škroba razgradi nastaje ljepljivo tijesto koje je teško obradivo te je zato vrlo važno održavati optimalnu aktivnost enzima. Uz amilolitičke, cjelovito brašno sadrži i proteolitičke i lipolitičke enzime. Oni služe za razgradnju proteina (na manje peptide i aminokiseline) te masti i lipide (oslobađanje slobodnih masnih kiselina). Neki od enzima pomažu u tvorbi glutenske mreže koja služi za zadržavanje plinova, poboljšavaju teksturu gotovog proizvoda te utječu na okus pečenog proizvoda.

### 2.2.1. Tehnološki procesi u pripremi kiselog tijesta

Ukupna kiselost titracijom i pH vrijednost su glavna tehnološka svojstva zrelog kiselog tijesta. Uobičajeno, dobro razvijeno kiselo tijesto postaje kiselo s pH vrijednostima oko 3,5 do 4,0, dok broj bakterija doseže do  $10^9$  i kvasaca od  $10^6$  do  $10^8$  po gramu tijesta (Novotni i sur., 2020). Postoje tri tipa kiselog tijesta koji se razlikuju po metodama fermentacije i održavanja aktivnog kiselog tijesta. Tip I odnosi se na tradicionalnu metodu fermentacije gdje se koriste prirodno prisutni mikroorganizmi i proces fermentacije spontano započinje dodatkom prethodno fermentiranog kiselog tijesta, bez dodataka pekarskih kvasaca i aditiva, dok pod tip II se ubrajaju industrijska kisela tijesta koja uključuje kontroliranu fermentaciju uz dodatak pekarskih kvasaca ili startera. Tip III opisuje kisela tijesta koja se konzerviraju sušenjem zbog očuvanja kvalitete tijesta (Šicel, 2016).

Postoje različiti načini pripreme kiselog tijesta, može se proizvoditi tako da se ručno miješa u plastičnim posudama ili korištenjem fermentora što je automatiziran proces. Kod upotrebe fermentora, prinos tijesta mora minimalno iznositi 200 (Mrvčić i sur., 2011). Proces proizvodnje kiselog tijesta i kruha od kiselog tijesta prikazan je na slici 1. Korištenjem viših temperatura te većeg prinosa tijesta stvara se snažan i aromatičan okus, ne previše kiseli, zbog pogodnosti tih uvjeta za nastajanje mliječne kiseline. Međutim, niža temperatura i manji prinos rezultira povećanim stvaranjem octene kiseline te bljutavim i previše kiselim okusom. Stoga je vrlo važno optimiranje parametara kako bi se osigurala najkvalitetnija proizvodnja kiselog tijesta s visokom aktivnošću što garantira proizvodnju kruha s poboljšanim organoleptičkim, mikrobiološkim i tehnološkim svojstvima.



**Slika 1.** Opća shema proizvodnje kiselog tijesta i kruha uz dodatak kiselog tijesta (Mrvčić i sur., 2011)

### 2.2.2. Prinos tijesta

Prinos tijesta se odnosi na količinu kiselog tijesta pripremljenu od određene količine brašna, a može se definirati kao maseni omjer između tijesta i brašna pomnožen s 100 (Novotni i sur., 2020). Prema prinosu tijesta postoje dvije vrste, mekano kiselu tijesto s visokim prinosom tijesta te čvrsto kiselu tijesto s malim prinosom.

Mekana tijesta u kombinaciji s dugim vremenskim periodom fermentacije stvaraju pogodnije uvjete za rast bakterija mliječne kiseline nego za kvasce, za njihov rast pogoduje niža aktivnost vode u čvrstim tijestima. Iz tog razloga proizvodnja mliječne kiseline, u odnosu na octenu, je dosta veća, što izravno utječe na okus kruha i kiselog tijesta. Također, kako je mliječna kiselina jača od octene, utječe na povećanje kiselosti, odnosno na smanjenje pH vrijednosti. Neka istraživanja pokazala su kako na učinak prinosa tijesta mogu utjecati i drugi čimbenici, na primjer vrsta brašna (Novotni i sur., 2020).

### 2.3. STARTER KULTURA

Naziv starter kulture podrazumijeva mikrobnii pripravak s velikim brojem stanica barem jedne vrste mikroorganizma. Starter se pomiješa s nekom sirovinom u cilju proizvodnje fermentirane

hrane ubrzanim i kontroliranim fermentacijskim procesom (Petrovicky, 2016). Korištenjem starter kultura sprječava se kvarenje hrane, odnosno dolazi do inhibicije patogenih mikroorganizama i produljenja roka trajanja. Povećava se higijenska ispravnost te se poboljšavaju organoleptička svojstva gotovog proizvoda.

Starter u proizvodnji kiselog tijesta definiran je kao osnovna kultura kvasaca i bakterija mliječne kiseline. Ono je glavni sastojak koji se priprema prije samog tijesta. Za pripremu startera potrebno je pomiješati jednake količine brašna i vode u posudu koja dozvoljava dotok zraka i ostavi na toplom mjestu. Zatim ga je potrebno svakodnevno hraniti sa svježim brašnom i vodom dok se ne razvije kultura mikroorganizama. Nakon 5 do 7 dana starter postaje aktivan, indikatori za to su porast u odnosu na početnu visinu tijesta i blago kiselkasti miris. Jednom kad starter postane aktivan, on se može koristiti u proizvodnji kruha te se može čuvati u hladnjaku na neodređeno vrijeme uz ponovno hranjenje. Kultura koja se ostavlja sa strane za izradu konačnog tijesta za kruh poznata je kao matično tijesto, kisel ferment, matična spužva ili sjemensko tijesto (Novotni i sur., 2020). Matično tijesto omogućuje kontrolu nad mikroorganizmima i njihovom aktivnošću što ujedno stvara povoljne tehnološke učinke fermentacije na kvalitetu kruha (Novotni i sur., 2020).

Mikrobiološki sastav kiselog tijesta čine bakterije mliječne kiseline i kvasci u aktivnom stanju, većinski u omjeru 1:100 gdje su dominantne bakterije mliječne kiseline (Mrvčić i sur., 2011). Bakterije mliječne kiseline ili BMK potječu iz samih žitarica, pekarskog kvasca ili iz industrije. U pekarstvu se koriste homofermentative i heterofermentativne vrste BMK (tablica 2), dok je od više od 20 vrsta kvasaca prisutnih u kiselom tijestu dominantan *Saccharomyces cerevisiae*. Glavna uloga kvasaca u kiselom tijestu je dizanje tijesta, no heterofermentativne BMK također pridonose procesu dizanja, iako je njihova primarna odgovornost provedba procesa zakiseljavanja (Mrvčić i sur., 2011). Uz sve navedeno, laktobacili su odgovorni i za poboljšanje okusa, mirisa i trajnosti pekarskog proizvoda.

**Tablica 2.** Vrste BMK koje se najčešće nalaze u kiselom tijestu (Mrvčić i sur., 2011)

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

Proces zakiseljavanja započinje kad se brašno pomiješa s vodom, tada bakterije mliječne kiseline počinju proizvoditi organske kiseline, najvažnije mliječnu i octenu kiselinu. Stvaranje kiselina smanjuje pH tijesta što je potrebno iz razloga da se inaktiviraju nepoželjni i moguće patogeni mikroorganizmi koji su prisutni u brašnu i na žitaricama, odnosno produljuju rok trajanja kruha i pekarskih proizvoda (Rađenović, 2016).

Početni pH kiselog tijesta proteže se od 3,5 do 4,2, a dodavanjem 20 % takvog tijesta u brašno, na primjer pšenično, pH se smanjuje na oko 4,7 - 5,5 (Mrvčić i sur., 2011). Takva promjena pH utječe na gluten, povećavajući njegovu topivost i bubrenje, što rezultira slabljenjem glutenske mreže. Slabiji gluten bolje veže vodu i CO<sub>2</sub> što dovodi do poboljšanja reoloških svojstava tijesta, koje postaje elastičnije i lakše za obradu. Kako zobeno i ječmeno brašno samo po sebi sadrže manje glutena nego pšenično, ovo dodatno oslabljenje čini tijesto mekšim i elastičnijim. Veća apsorpcija vode čini gotove pekarske proizvode svježima tijekom dužeg perioda. Tijekom fermentacije, pH kontinuirano pada, povećavajući aktivnost enzima žitarica. Proteinaze hidroliziraju gluten, tako smanjujući alergijske reakcije i povećavajući udio slobodnih aminokiselina. Fitaze hidroliziraju fitinsku kiselinu i povećavaju biološku dostupnost minerala i proteina. Kisela sredina inaktivira amilaze, produžujući svježinu proizvoda i smanjujući glikemijski indeks. Fermentacija također povećava polifenole i omogućava proizvodnju kruha s više mekinja (Rađenović, 2016).

## 2.4. PROCES SPONTANE FERMENTACIJE

Fermentacija je jedno od najstarijih procesa konzerviranja hrane te se koristi za poboljšanje nutritivnih i senzorskih svojstava hrane (Garcia-Bejar i sur., 2023). Kao što je već navedeno, kiselo tijesto se može proizvoditi tradicionalno tako da se pomiješa brašno i voda, zatim se smjesa ostavi da spontano fermentira uz pomoć prirodno prisutnih mikroorganizama u brašnu. Takav proces opisuje proizvodnju kiselog tijesta tipa I, dok tip II i III koriste umjesto kiselog tijesta pekarski kvasac, odnosno ne provodi se spontana fermentacija.

Kiselo tijesto pripremljeno spontanom fermentacijom temelji se na procesu osvježavanja (*eng. back-slopping*) (Reidzane i sur., 2021). To je proces svakodnevno dodavanja nove količine svježeg brašna i vode. S povećanjem broja osvježavanja, mikroorganizmi se prilagođavaju i postaju selektivniji ovisno o dostupnim hranjivim tvarima te nastaje konzistentan i stabilan sastav mikroorganizama (Novotni i sur., 2020).

Udjel matičnog tijesta korištenog kao starter kultura obično je od 10 % do 20 %, ovisno o broju živih bakterija mliječne kiseline, kvasaca i koncentraciji etanola (Novotni i sur., 2020). Bakterije mliječne kiseline (BMK) osiguravaju brz razvoj i smanjenje pH, inhibirajući mikroorganizme. Naglo smanjenje pH može usporiti ili smanjiti proizvodnju kiselina. Dulje vrijeme osvježavanja i veći prinos tijesta utječu na sastav mikroorganizama i kemijske značajke, dok rjeđe osvježavanje pogoduje bakterijama mliječne masti koje su sposobne preživjeti u kiselim uvjetima (acidofilne bakterije) (Novotni i sur., 2020).

Tijekom procesa osvježavanja i miješanja tijesta, kisik ulazi u sastav kiselog tijesta koji kasnije koriste enzimi iz brašna te BMK i kvasci. Fakultativno anaerobne bakterije mliječne kiseline koriste kisik za proizvodnju octene kiseline što direktno utječe na okus krajnjeg pekarskog proizvoda (Novotni i sur., 2020). Dostupnost kisika također povećava toleranciju tijesta na miješanje, poboljšava reologiju tijesta i pomaže kod povećanja volumena kruha.

Za dobivanje aktivnog i stabilnog kiselog tijesta tipa I, koristeći brašna od pšenice ili raži, potrebna su najmanje tri koraka osvježenja (Reidzane i sur., 2021). Neki od važnijih parametara u procesu osvježenja mogu se prilagoditi ovisno kakav se proizvod traži, kao što su omjer brašna i vode, temperatura i vrijeme.

#### 2.4.1. Vrijeme i temperatura fermentacije

Vrijeme i temperatura fermentacije kiselog tijesta ključni su parametri jer utječu na sastav mikroorganizama, stopu zakiseljavanja te na reološka svojstva tijesta. Međusobno su u obrnuto proporcionalnom odnosu. Optimalne temperature rasta za laktobacile mogu biti u rasponu od 30 °C do 35 °C ili čak od 37 °C do 40 °C, ovisno o vrsti laktobacila i tipu tijesta, dok kvascima najbolje odgovaraju temperatura oko 28 °C (Novotni i sur., 2020).

Visoke temperature i razine aktivnosti vode, sadržaja pepela i šećera uzrokuju povećanje proizvodnje organskih kiselina, posebno mliječne kiseline. Proizvodnja octene kiseline ovisi o akceptorima elektrona i smanjuje se s porastom temperature. Naime, visoke temperature utječu i na brže odvijanje hidrolize polisaharida i oksidacije lipida.

S druge strane, fermentiranje na nižim temperaturama usporava proces zakiseljavanja pomoću laktobacila što rezultira većim rastom kvasaca i proizvodnjom etanola i CO<sub>2</sub>. Pozitivan učinak niskih temperatura je stvaranje estera.

Za okus kruha pripremljenog od kiselog tijesta najvažnija je kvaliteta brašna te vrijeme fermentacije (Novotni i sur., 2020). Pravilnim održavanjem starter kultura tijekom pažljivo odabranog vremena i na određenoj temperaturi osigurava se optimalna kiselost (pH oko 3,5-4), okus i kvaliteta kruha.

#### 2.4.2. Skladištenje kiselog tijesta

Tip I kisela tijesta moraju se kontinuirano osvježavati na dnevnoj ili tjednoj bazi koristeći matično tijesto od prethodnog dana/tjedna, miješajući ga sa svježim brašnom i vodom kako bi mikroorganizmi ostali aktivni (Novotni i sur., 2020). Stabilizacija kiselih tijesta je važna za održavanje kvalitete tradicionalnih pekarskih proizvoda, uključujući okus, aromu, teksturu, trajnost te sigurnost hrane. Neki pekari izbjegavaju svakodnevno osvježavanje tijesta jer može dovesti do poremećaja u sastavu mikroorganizama te do promjene kvalitete i karakteristika krajnjeg proizvoda (Šicel, 2016). Alternative su čuvanje na nižim temperaturama ili da se tijesto prije skladištenja osuši.

Kiselo tijesto može se čuvati na niskim temperaturama kako bi se usporio rast mikroorganizama. Zrelo tijesto ohlađeno na 4 °C - 5 °C stabilno je 2 do 3 dana, dok na 1 °C - 2 °C može trajati do 10 dana (Novotni i sur., 2020). Neka matična tijesta čuvana na 4 °C - 5 °C ostaju stabilna nekoliko tjedana ili mjeseci, ali čak i kratkotrajno skladištenje zahtijeva osvježenja na sobnoj temperaturi. Dugotrajno skladištenje omogućava se niskim prinosom



tijesta i dodavanjem brašna do 70 % (Novotni i sur., 2020). Zamrzavanje ima vrlo mali utjecaj na BMK, ali smanjuje broj kvasaca (Šicel, 2016). Skladištenje zamrzavanjem ili sušenjem može očuvat kvalitetu tijesta i do 30 dana.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Sirovine i kemikalije:

- Integralno zobeno brašno (Farina Speciale, Hrvatska)
- Integralno ječmeno brašno (poljoprivredni proizvođač Ivan Varga, Hrvatska)
- Pšenično brašno T-550 i 850 (Čakovečki mlinovi d.d., Hrvatska)
- Pepton iz kazeina (Biolife, Italija)
- Kvaščečev ekstrakt (Biolife, Italija)
- Dekstroza (Gram-Mol, Hrvatska)
- Agar-agar (Biolife, Italija)
- De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Millipore, Njemačka)
- Destilirana voda
- Vodovodna voda
- 0,1 % Aktidion (Cycloheximide) (Sigma-Aldrich, Švicarska)
- 96 % Oksitetraciklin (OTC) (Alfa Aesar, Hrvatska)
- 0,1 M NaOH (Kemika, Hrvatska)

##### 3.1.2. Aparatura i pribor:

- Laboratorijska vaga BL 510 (Sartorius, Hrvatska)
- Bakto boce 500 mL
- Bunsenov plamenik
- Električno kuhalo (Corona, EKA-10-LS)
- Epruvete 20 mL
- Autoklav (Sutjeska)
- Magnetska mješalica Worke (IKA, Njemačka)
- Menzura 100 mL
- Pipete (1, 2, 10 mL)
- Petri ploče
- pH metar za tijesto (Testo, Njemačka)

- Staklenka
- Ručni mikser (Gorenje, Slovenija)
- Pipetman (Hirschmann Laborgerate, Njemačka)
- Farinograf (Brabender, Njemačka)
- SJA fermentograf (Aktiebolag SJA, Švedska)
- Mjesilica za tijesto SP-12 (Diosna, Njemačka)
- pH metar 3510 (Jenway, Ujedinjeno Kraljestvo)
- Sterilni štapići za miješanje
- Stakleni štapić
- Metalna žlica
- Lonac
- Vodena kupelj (Memmert, Njemačka)
- Termostat (Memmert; Njemačka)
- Polipropilenski sterilni kontejneri 200 ml
- Bireta
- Vortex (MX-X, DLAB Njemačka)

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Za potrebe određivanja broja živih stanica mikroorganizama najprije su pripremljene tri vrste hranjivih podloga, *plate count agar* (PCA), *de Man-Rogosa-Sharpe agar* (MRS) i *yeast mold* (YM) agar. Dehidrirane je podloge bilo potrebno čuvati na suhom i tamnom mjestu na +15 do +25 °C. Kod zagrijavanja, podloge koje sadrže agar ili želatinu, se moraju zagrijati do vrenja kako bi se potpuno otopili sastojci, a zagrijavanje se provodi u vodenoj kupelji.

PCA (plate count agar) se koristi kao medij za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija u ispitanim uzorcima. U jednu se litru sterilizirane destilirane vode otopi 5,0 g peptona iz kazeina, 2,5 g kvašćevog ekstrakta, 1 g dekstroze i 14 g agar-agra. Sve zajedno se stavi na zagrijavanje na električno kuhalo uz konstantno miješanje. Zagrijava se sve dok ne zabubri, a nakon slijedi sterilizacija podloge. Podloga se prelije u više bakto-boca, čvrsto se zatvore i zajedno s ostalim laboratorijskim priborom (epruvete, menzura) i vodom (destilirana i vodovodna) koje je potrebno sterilizirati postavlja u autoklav na 121 °C 15 minuta. Nakon isteka vremena, podloga se odnese na skladištenje u hladnjak. Neposredno prije uporabe, na primjer kod određivanja broja živih stanica, podlogu je potrebno temperirati na 45 do 55 °C u

vodenoj kupelji.

MRS hranjiva podloga je pogodna za rast bakterija mliječne kiseline, dok je YM pogodna za rast kvasaca i plijesni. Njihov sastav naveden je u tablici 3. Postupak pripreme je jednak kao za PCA podlogu, samo sa drugačijim sastojcima.

**Tablica 3.** Sastav hranjivih podloga

<b>MRS agar</b>	<b>YM agar</b>
Pepton (10,0 g)	Kvašćev ekstrakt (3,0 g)
Mesni ekstrakt (10,0 g)	Sladni ekstrakt (3,0 g)
Kvašćev ekstrakt (5,0 g)	Pepton (5,0 g)
Glukoza (20,0 g)	Dekstroza (10,0 g)
Dikalij-hidrogen fosfat ( $K_2HPO_4$ ) (2,0 g)	Agar agar (20,0 g)
Natrij-acetat (5,0 g)	
Amonij-citrat (2,0 g)	
Magnezij-sulfat ( $MgSO_4$ ) (0,2 g)	
Mangan-sulfat ( $MnSO_4$ ) (0,05 g)	
Agar agar (15,0 g)	
Tween 80 (1 mL)	

### 3.2.2. Priprema matičnog kiselog tijesta

Za pripremu matičnog kiselog tijesta korištene su dvije vrste brašna, zobeno i ječmeno, ali svaka zasebno. Prvo je potrebno pomiješati 100 g brašna i 100 mL sterilne vodovodne vode te 0,5 g soli (za usporavanje kvarenja) u staklenku (cca 700 mL) s poklopcem. Smjesa se promiješa ručnim mikserom do potpune homogenizacije i postavi u termostat na 25 °C, 23 h.

Drugi dan, uzme se 50 g fermentiranog tijesta od prethodnog dana i pomiješa se s 75 g svježeg brašna i 75 mL sterilne vodovodne vode. Ponovno se dobro promiješa s ručnim mikserom, zatvori i stavi u termostat na 25 °C, 23 h. Ovaj postupak ponavlja se kroz 4 dana. Kroz dane, svaka 24 h, mjere se i zapisuju vrijednosti pH pomoću ubodnog pH metra.

### 3.2.3. Određivanje broja živih stanica mikroorganizama u kiselom tijestu

Određivanje broja živih stanica mikroorganizama u kiselom tijestu provelo se po metodama ISO 15214:98 za bakterije mliječne kiseline i ISO 7954:2002 za kvasce.

Prvi dan nakon miješanja, a ostale dane nakon vađenja iz termostata, odvagano je 10 g tijesta i zajedno se s 90 mL sterilne destilirane vode prebačeno u sterilni polipropilenski kontejner. Kako bi se smjesa dobro promiješala, sterilni polipropilenski kontejner se postavlja na magnetsku miješalicu 15 minuta. Ta smjesa se koristi za razrjeđenja kod određivanja broja živih stanica mikroorganizama.

Određivanje živih stanica u kiselom tijestu je potrebno provoditi pri sterilnim uvjetima, uz Bunsenov plamenik, koristeći sterilno posuđe te se za svako razrjeđenje koristi nova nekorištena pipeta. Za dobivanje prvog razrjeđenja  $10^{-1}$ , 1 g uzorka kiselog tijesta otopi se u 10 mL sterilne destilirane vode te se homogenizira na vortex-u. Iz prvog razrjeđenja, 1 mL se prenosi u novu epruvetu s 9 mL sterilne destilirane vode i promiješa na vortex-u. Tako dobivamo drugo razrjeđenje. Iz drugog se razrjeđenja uzima 1 mL i prenosi u novu epruvetu s 9 mL sterilne destilirane vode za treće razrjeđenje i tako se ponavlja postupak dok se ne postigne željeno razrjeđenje.

Potom se od svakog razrjeđenja, ovisno koje se želi analizirati, uzima 1 mL te se stavlja na sterilnu Petri ploču. Zatim se uzorak prelije odgovarajućom hranjivom podlogom. Na Petri ploče s MRS i YM hranjivom podlogom, još se uz uzorak stavi par kapi određenog inhibitora. Aktidion se stavlja na MRS podlogu kao inhibitor rasta kvasaca, a OTC na YM kao inhibitor rasta BMK. Kako bi se postigli anaerobni uvjeti, MRS podloga zahtjeva dvostruki sloj hranjive podloge, prvo je uzorak ravnomjerno prelijevan prvim slojem, a kada se prvi sloj ohladi, doda se još jedan sloj.

Nakon što se ohlade, Petri ploče se postavljaju u termostat na inkubaciju 48 h tako da se podloga nalazi sa gornje strane Petri ploče, zbog kondenzacije. PCA i YM su inkubirane na 30 °C, a MRS na 37 °C. Porasle kolonije kvasca, ukupnih bakterija i laktobacila izbrojane su za uzorke matičnog tijesta od prvog, trećeg i petog dana.

### 3.2.4. Priprema kiselog tijesta

Kako bi se osigurao početan broj laktobacila  $10^7$ , ječmeno kiselo tijesto je pripremljeno od 150 g matičnog kiselog tijesta (startera), 45 g svježeg integralnog ječmenog brašna i 165 mL sterilne vodovodne vode, dok je smjesa zobnog kiselog tijesta pripremljena od 50 g startera,

95 g svježeg integralnog zobenog brašna i 215 mL sterilne vodovodne vode. Obje smjese su promiješane ručnim mikserom oko 5 minuta i stavljene na fermentaciju 24 h na 30 °C u zatvorenoj staklenoj posudi. Vrijednost pH je izmjerena ubodnim pH metrom prije i nakon fermentacije.

### 3.2.5. Ukupna kiselost titracijom

Ukupna kiselost titracijom se određuje tako da 10 g kiselog tijesta otopimo u 90 mL (g) sterilne destilirane vode u sterilnom polipropilenskom kontejneru (Grgić i sur., 2024). Za svako brašno rade se dva mjerenja. Otopine se prvo miješaju na magnetskoj miješalici 10 minuta, a zatim započinje titracija s 0,1 M NaOH do porasta pH do 8,5. Vrijednost pH se prati tako da je sonda pH metra uronjena u otopinu uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici. Ukupna kiselost izražena je kao volumen 0,1 M NaOH koji je potrošen za postizanje pH 8,5, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od dva mjerenja.

### 3.2.6. Priprema krušnog tijesta i određivanje produkcije ugljičnog dioksida

Zbog usporedbe podataka, bilo je potrebno je pripremiti četiri krušna tijesta s 30 ili 50 % ječmenog ili zobenog kiselog tijesta u odnosu na ukupnu masu, odnosno četiri kontrolna krušna tijesta s odgovarajućom količinom ječmenog ili zobenog brašna (18 % odnosno 30 % ukupne mase brašna) uz dodatak pekarskog kvasca (tablica 4) (Grgić i sur., 2024). Brabenderov se farinograf koristi za određivanja količine vode koje treba dodati u zamjes (mjeri otpornost tijesta na miješanje), ovisno radi li se mekše ili čvršće tijesto. U ovom radu pripremljeno je mekše tijesto za pogače, pa je dodana voda potrebna za postizanje konzistencije od 200 BU (Brabender jedinica). Pomiješaju se svi sastojci u posudu pomoću Diosne miješalice tijekom 5 minuta. Zatim se tijesto (otprilike 400 g) postavi u posudu od SJA fermentografa (Aktiebolag SJA, Švedska) na 30 °C na 1 h. SJA fermentograf mjeri i zabilježava količinu proizvedenog CO<sub>2</sub>, koja je povezana s aktivnošću kvasaca. Rezultati su izraženi u cm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub>.

**Tablica 4.** Recepture krušnih tijesta s različitim udjelom ječmenog/zobenog brašna ili kiselog tijesta (KT)

<b>Sastojak (g)</b>	<b>30 % ječmenog KT/brašna</b>	<b>50 % ječmenog KT/brašna</b>	<b>30 % zobenog KT/brašna</b>	<b>50 % zobenog KT/brašna</b>
Pšenično brašno T-850	145,7	123,5	145,3	122,3
Pšenično brašno T-550	25,7	21,8	25,6	21,6
Kiselo tijesto (KT)	115,9 / 0*	194,2 / 0*	117 / 0*	198 / 0*
Zobeno/ječmeno brašno	0 / 38,6*	0 / 64,7*	0 / 39*	0 / 66*
Voda	77,3 / 99,1*	49 / 129,5*	78 / 102,5*	54,6 / 132*
Pekarski kvasac	0 / 0,8*	0 / 0,8*	0 / 0,8*	0 / 0,8*

\*označava kontrolnu probu u koju je dodan pekarski kvasac, a druga je pripremljena s dodatkom KT bez dodatka kvasca

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom su poglavlju prikazani rezultati analize broja živih stanica mikroorganizama tijekom pet dana spontane fermentacije zobenog i ječmenog brašna, ukupne kiselosti određene titracijom zrelog kiselog tijesta, te volumen nastalog ugljičnog dioksida u krušnom tijestu izmjereno pomoću SJA fermentografa.

##### 4.1. Određivanje broja živih stanica u kiselom tijestu

U tablicama 5 i 6 prikazani su brojevi živih stanica ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija, laktobacila i kvasaca kroz 5 dana osvježavanja matičnog tijesta. Tablica 5 prikazuje brojeve mikroorganizama kod korištenja ječmenog brašna, dok tablica 6 kod zobenog brašna.

**Tablica 5.** Broj živih stanica mikroorganizama (CFU g<sup>-1</sup> kiselog tijesta) u matičnom kiselom tijestu od ječmenog brašna

Vrijeme (dan)	BMK	Kvasci	Ukupne bakterije
1.	$6,50 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$1,45 \times 10^6$
2.	$3,69 \times 10^7$	$3,60 \times 10^6$	$3,08 \times 10^7$
3.	$4,60 \times 10^7$	$2,95 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7$

**Tablica 6.** Broj živih stanica mikroorganizama (CFU g<sup>-1</sup> kiselog tijesta) u matičnom kiselom tijestu od zobenog brašna

Vrijeme (dan)	BMK	Kvasci	Ukupne bakterije
1.	$3,50 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$5,45 \times 10^4$
2.	$1,27 \times 10^8$	$6,03 \times 10^4$	$3,17 \times 10^8$
3.	$1,93 \times 10^8$	$6,37 \times 10^5$	$1,61 \times 10^8$

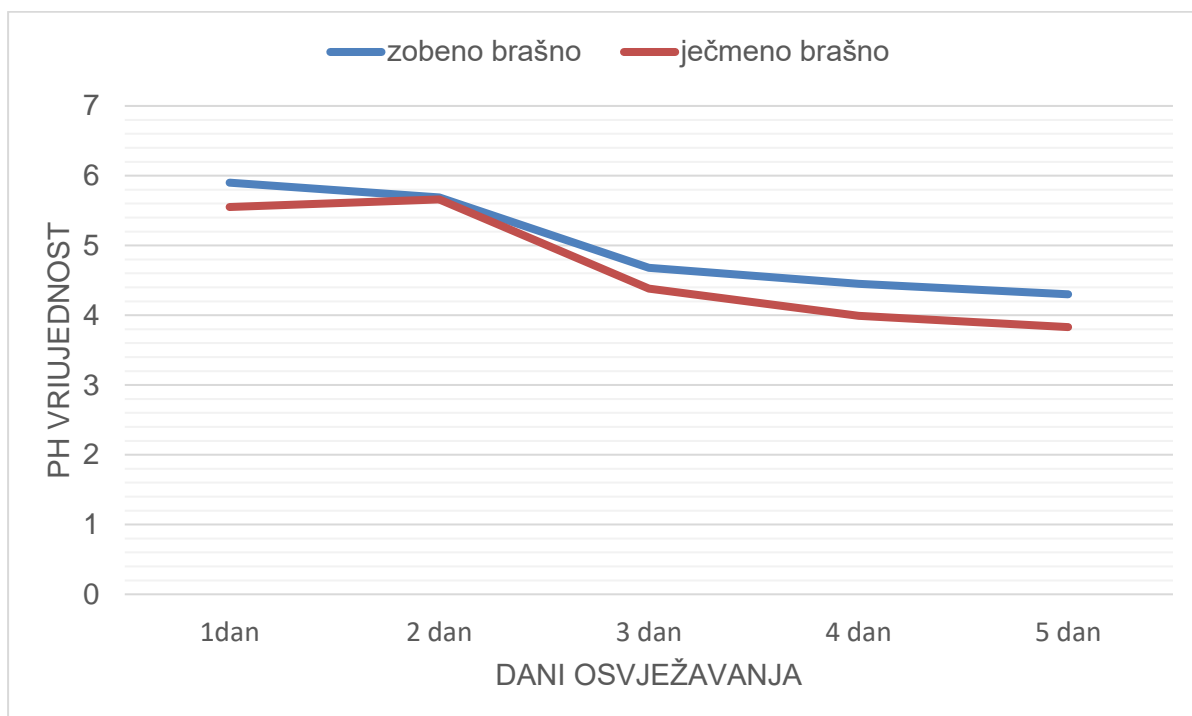
Konačni rezultat broja živih stanica je izračunat kao aritmetička sredina od dva određivanja svih poraslih kolonija na MRS agaru za bakterije te na YM agaru za kvasce, posebno za svaki dan koji je određen. Kao što vidimo iz podataka u tablici 5., broj poraslih kvasaca i laktobacila kiselog tijesta od ječmenog brašna nakon fermentacije gotovo je jednak, za razliku od kiselog tijesta od zobenog brašna gdje je omjer kvasaca i laktobacila 1:100. Taj omjer kod kiselog tijesta od zobenog brašna indicira na dobar mikrobni sastav, odnosno na dobro napravljen starter. Međutim, to nije bio slučaj kod kiselog tijesta od ječmenog brašna, broj kvasca je znatno veći u odnosu sa zobenim brašnom. To se moglo dogoditi iz više razloga, a



najvjerojatnije zbog pogrešnog odabira brašna ili parametara za proces fermentacije (npr. dinamike obnavljanja ili temperature).

Prvog dana može se primijetiti kako brašno ječma ima veći ukupan broj bakterija od brašna zobi. Jedan od razloga je to što je korišteno zobeno brašno industrijske proizvodnje, a ječmeno je proizvod jednog obiteljskog obrta koji ne može osigurati uvijete pripreme i mljevenja kao industrijska proizvodnja. Također, broj ukupnih bakterija prvog dana je mnogo veći od broja laktobacila, dok se nakon petog dana ti brojevi skoro izjednače.

Također, po slici 2 primjećujemo kako je pH vrijednost od matičnog tijesta ječma nešto manja od zobi. Peti dan osvježavanja, starter ječma imalo je pH 3,83, a od zobi 4,3 te su obje vrijednosti očekivane (Mrvčić i sur., 2011). Ta razlika u pH vrijednostima se osjetila i u mirisu KT kako je od ječma kiselo tijesto imalo više kiselkast miris, nalik octu, za razliku od zobenog koji je imao više mliječni miris. Kroz sve dane primjećuje se lagan pad pH, bez naglih skokova.



**Slika 2.** Promjena pH vrijednosti kroz 5 dana osvježavanja matičnog kiselog tijesta

#### 4.2. Svojstva zrelog kiselog tijesta

Nakon fermentacije došlo je do promjene broja živih stanica mikroorganizama ječmenog i zobenog kiselog tijesta (tablica 7). Kod ječmenog se kiselog tijesta dogodio blagi rast broja BMK, a broj kvasaca se smanjio, ali je njihov omjer i dalje ostao nepovoljan. Kod zobenog se kiselog tijesta dogodio blagi porast broja BMK te nešto veći rast broja kvasaca. Postignut omjer BMK i kvasaca kod zobenog kiselog tijesta karakteristika je dobro provedene fermentacije.

Nakon 24 h fermentacije, pH vrijednost KT ječma je 3,67, a od zobi 4,2 (tablica 7), a te vrijednosti su tipične za kisela tijesta. Ako usporedimo ukupnu kiselost i pH vrijednost uzoraka (tablica 7), primjećuje se kako zobeno kiselo tijesto ima veću pH vrijednost i manju ukupnu kiselost od ječmenog kiselog tijesta. Za zobeno je kiselo tijesto potreban manji volumen 0,1 M NaOH da bi se postigla pH vrijednost 8,5 jer ima veći početni pH, a to znači da je ječmeno brašno kiselije od zobenog brašna. Velika kiselost ječmenog brašna ukazuje na snažnu aktivnost BMK, ali i kvasaca, tijekom fermentacije. To bi rezultiralo izraženijim kiselim okusom gotovog proizvoda, što se osjetilo i u octenom mirisu kiselog tijesta.

Vrijednost TTA kiselog tijesta od zobenog brašna ukazuje na dobru fermentaciju i prisutnost dovoljno bakterija mliječne kiseline, a primijećen je i umjeren mliječno kiseli miris.

**Tablica 7.** Svojstva zrelog ječmenog i zobenog kiselog tijesta

Svojstvo	Ječmeno kiselo tijesto	Zobeno kiselo tijesto
BMK (CFU g <sup>-1</sup> kiselog tijesta)	7,34×10 <sup>7</sup>	3,13×10 <sup>8</sup>
Kvasci (CFU g <sup>-1</sup> kiselog tijesta)	1,40×10 <sup>7</sup>	7,53×10 <sup>6</sup>
pH vrijednost	3,67	4,20
TTA (mL 0,1 M NaOH)	8,95 ± 0,07	7,25 ± 0,64

Grgić i sur. (2024) proveli su sličan eksperiment s istim brašnima, ali gdje se koristio komercijalni starter LIVENDO® LV1. Njihovi rezultati, za razliku od naših, nakon 24-satne fermentacije prikazuju pH u vrijednosti 3,83 za ječmeno i 3,95 za zobeno kiselo tijesto. Dobivene su vrijednosti međusobno slične te se nalaze u tipičnom rasponu pH za kisela tijesta. Također, su ispitivali ukupnu kiselost gdje su dobili volumen, za ječmeno kiselo tijesto, od 9,33 mL 0,1 M NaOH, a za zobeno 6,50 mL. Kod tih rezultata primjećujemo sukladnosti u rezultatima, kako kod oba eksperimenta ječmeno kiselo tijesto ima veću ukupnu kiselost od zobenog.

#### 4.3. Volumen ugljičnog dioksida u krušnom tijestu

Tablica 8 pokazuje rezultate SJA fermentografa nakon 1 h, odnosno sadrži podatke o volumenu proizvedenog CO<sub>2</sub> u krušnom tijestu.

**Tablica 8.** Volumen nastalog CO<sub>2</sub> u krušnom tijestu sa različitim udjelom kiselog tijesta bez dodatka pekarskog kvasca u usporedbi s kontrolnim uzorcima s ječmenim ili zobenim brašnom sa dodatkom pekarskog kvasca

Uzorci s različitim udjelom kiselog tijesta / brašna	Volumen CO <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> )	
	S dodatkom kiselog tijesta	S dodatkom pekarskog kvasca
Ječam 30 %	30	325
Ječam 50 %	38	300
Zob 30 %	25	250
Zob 50 %	65	235

Može se primijetiti velika razlika između uzoraka s dodanim pekarskim kvascem i s dodanim kiselim tijestom. Naime, kako je već navedeno kiselo tijesto sadrži prirodne mikroorganizme, ali oni djeluju znatno sporije nego pekarski kvasac. Zato je volumen CO<sub>2</sub> proizveden u tijestu bez dodatka pekarskog kvasca relativno nizak u svim slučajevima te ukazuje na sporiju aktivnost fermentacije i duži vremenski period potreban za postizanje traženog volumena tijesta. Dok su rezultati s dodatkom pekarskog kvasca dosta veći, što pokazuje bržu i intenzivniju fermentaciju. Dodani pekarski kvasca brzo fermentira šećere u tijestu tako proizvodeći CO<sub>2</sub> koji pomaže tijestu da brže raste.

Zobeno kiselo tijesto pokazuje značajno veći utjecaj na proizvodnju CO<sub>2</sub> pri povećanju količine kiselog tijesta u usporedbi s ječmenim kiselim tijestom. To ukazuje na aktivniju fermentaciju zobenog kiselog tijesta i bolji rast volumena tijesta, no i dalje je znatno niža od optimalne količine proizvedenog CO<sub>2</sub> za većinu pekarskih proizvoda. Da bi se postigao optimalan rast tijesta potrebno je kombinirati kiselo tijesta s pekarskim kvascem, da se postigne dovoljna proizvodnja CO<sub>2</sub>.

Stoga se može zaključiti kako većina kvasaca iz uzoraka spontano kiseljenog brašna zobi i ječma ne pripada rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Kako bi poboljšali dizanje tijesta bez dodatka pekarskog kvasca, moguće je i dodati veću količinu kiselog tijesta. Veća količina kiselog tijesta znači više prirodnih kvasaca i laktobacila koja će fermentirati tijesto. No, treba

paziti da se ne doda previše jer će to rezultirati tijestom s kiselim okusom i previše mekanom teksturom.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovo radu ispitana je spontana fermentacija kiselog tijesta od zobenog i ječmenog brašna i može se zaključiti sljedeće:

1. Nakon pet dana spontane fermentacije, matično zobeno kiselo tijesto ima tipične karakteristike kiselog tijesta obzirom na broj živih stanica bakterija mliječne kiseline i kvasaca dok ječmeno kiselo tijesto ima visok broj kvasaca jednak broju bakterija mliječne kiseline
2. Zrelo zobeno kiselo tijesto ima tipičan broj i omjer bakterija mliječne kiseline i kvasaca, pH vrijednost i ukupnu kiselost u odnosu na ječmeno kiselo tijesto koje ima tipičnu pH vrijednost i ukupnu kiselost ali izjednačen broj bakterija mliječne kiseline i kvasaca.
3. Rezultati fermentografa krušnog tijesta s dodatkom 30 ili 50 % kiselog tijesta ukazuju na premali volumen proizvedenog ugljičnog dioksida bez dodatka pekarskog kvasca što ukazuje na potrebu dodatka pekarskog kvasca kako bi se postigao poželjan volumen gotovog proizvoda.

## 6. POPIS LITERATURE

Alder D (2021) Enzymes, wild yeast and bacteria in whole wheat flour – Your sourdough start. <https://yoursourdoughstart.com/enzymes-in-whole-wheat-flour/>. Pristupljeno 02.07.2024.

Anonymous 1 (2024) Buffer Capacity. OSU-The Ohio State University, <https://research.cbc.osu.edu/reel/research-modules/environmental-chemistry/methods/buffer-capacity/>. Pristupljeno 27.06.2024.

Anonymous 2 (2024) Extraction rate. BAKERPedia, <https://bakerpedia.com/processes/extraction-rate/>. Pristupljeno 26.06.2024.

Anonymous 3 (2024) Total Titratable Acidity (TTA). BAKERPedia, <https://bakerpedia.com/processes/titratable-acidity-tta/>. Pristupljeno 27.06.2024.

García-Béjar B, Fernández-Pacheco P, Carreño-Domínguez J, Briones A, Arévalo-Villena M (2023) Identification and biotechnological characterisation of yeast microbiota involved in spontaneous fermented wholegrain sourdoughs. *J Sci Food Agr* **103**, 7683-7693. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12864>

Grgić T, Drakula S, Voučko B, Čukelj Mustač N, Novotni D (2024) Sourdough fermentation of oat and barley flour with bran and its application in flatbread made with no-time and dough retardation methods. *Fermentation* **10**(3), 174. <https://doi.org/10.3390/fermentation10030174>

Mrvica N (2019) Starter i sve što trebate znati o njemu – Bake me. <https://bakeme.com.hr/starter-i-sve-sto-trebate-znati-o-njemu/>. Pristupljeno 20.06.2024.

Mrvčić J, Mikelec K, Stanzer D, Križanović S, Grba S, Bačun-Družina V, Stehlik-Tomas V (2011) Kiselo tijesto – tradicionalna i prirodna metoda za povećanje kvalitete pekarskih proizvoda. *Hr Čas PTBN* **6**(3-4), 89-99.

Mykhonik L, Hetman I, Naumenko O (2023) Efficiency of sourdoughs of spontaneous fermentation from cereal flour in bakery technologies, *Food Res* **11**, 28-34. <https://doi.org/10.31073/foodresources2023-20-03>

Hussain A, Ali S, Hussain A, Hussain Z, Manzoor MF, Hussain A, Ali A, Mahmood T, Sarfraz Abbasi K, Karrar E, Hussain M (2021) Compositional profile of barley landlines grown in different regions of Gilgit-Baltistan. *Food Sci Nutr*, **9**(5), 2605-2611. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8116868/>

Novotni D, Gänzle M, Rocha JM (2020) Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. U: Galanakis CM (ured.) *Trends in wheat and bread making*, 1. izd., Academic Press, Elsevier, str. 129-172.

Petrovicky B (2016) Primjena starter kultura u prehrambenoj industriji (završni rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Rađenović V (2016) Tradicijske metode fermentacije i prirodno kiselo tijesto kao starter za proizvodnju sigurnih i kvalitetnih pekarskih proizvoda produljene trajnosti (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Reidzane S, Kruma Z, Kazantseva J, Traksmaa A, Klava S (2021) Determination of technological parameters and characterization of microbiota of the spontaneous sourdough fermentation of hull-less barley. *Foods* **10**, 2253. <https://doi.org/10.3390/foods10102253>

ISO/R 15214:1998 Horizontal Method for the Numeration of Mesophilic Lactic acid Bacteria—Colony Count.

ISO/R 7954:2002 Guidance for Enumeration of Yeasts and Moulds—Colony Count.

Jokinen I, Sammalisto S, Silventoinen-Veijalainen P, Sontag-Strohm T, Nordlund E, Holopainen-Mantila U (2022) Variation in the physical properties of oat groats, flakes and oat flake flour – Processability of thirty pure cultivar oat batches from Finland. *LWT*, **163**, 113595. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113595>

Šicel T (2016) Primjena smrznutog ječmenog kiselog tijesta u proizvodnji kruha (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Vlak P (2019) Tajnoviti svijet kruha od kiselog tijesta – Vitaminoteka. <https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/tajnoviti-svijet-kruha-od-kiselog-tijesta-14093/>.

Pristupljeno 20.06.2024.

Zannini E, Garofalo C, Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G, Clementi F (2009) Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. *Food Microbiol* **26**, 744-753.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.014>



### Izjava o izvornosti

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

M. Novčić  
Vlastoručni potpis