

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Katja KRIŽMAN

**VPLIV KVASOVK NA SESTAVO SEKUNDARNIH METABOLITOV  
V RŽENIH KISANIH TESTIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF YEASTS ON COMPOSITION OF SECONDARY  
METABOLITES IN RYE SOURDOUGHS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino in Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Andrej Plestenjak in za recenzentko doc. dr. Polona Jamnik.

Mentor: doc. dr. Andrej PLESTENJAK

Recenzentka: doc. dr. Polona JAMNIK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Križman

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 664.65 + 664.662:604.4 (043) = 163.6  
KG pekarstvo / kislata testa / ržena kislata testa / rženi kisli kruhi / fermentacija testa / mlečnokislinske bakterije / kvasovke/hlapne spojine / sekundarni metaboliti / diacetil / aroma kruha  
AV KRIŽMAN, Katja  
SA PLESTENJAK, Andrej (mentor)/JAMNIK, Polona (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2012  
IN VPLIV KVASOVK NA SESTAVO SEKUNDARNIH METABOLITOV V RŽENIH KISANIH TESTIH  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 67 str., 15 pregl., 9 sl., 105 vir.  
IJ SI  
JI sl/en  
AI Namen diplomskega dela je ugotoviti, kako dodatek kvasne suspenzije vpliva na sestavo in količino aromatičnih hlapnih spojin v rženih kisljih testih in ustreznih rženih kisljih kruhkih v primerjavi s tistimi testi, ki jim kvasovk nismo dodali, ter rženimi kruhi (slepi vzorec). Dodajali smo različne količine (0,13 mL in 1,13 mL) suspenzije kvasovk *S. cerevisiae* in nastale hlapne aromatične spojine ovrednotili s pomočjo GC-MS. Kot optimalni dodatek kvasne suspenzije smo določili 0,13 mL, ki vodi do nastanka večje količine nekaterih hlapnih spojin predvsem v skorji rženih kisljih kruhov. Mednje uvrščamo 3-metil butanal, 1-hidroksi-2-propanon, 3-metil-1-butanol, 2,3-butandion, 2-metil-propanal, očetno kislino, metil pirazin, 3-metil furan in etil acetat. Nekatero hlapno aromatično spojino, kot so metil-1-propanol, metil-1-butanol, 2,3-butandion, očetna kislina in 1-heksanol, pa se povečajo v sredici rženih kisljih kruhov. To so produkti kvasovk in MKB. Dodatek različnih količin kvasne suspenzije prav tako vpliva na koncentracijo 2,3-butandiona. Slednji se ob dodatku 0,13 mL kvasovk poviša v sredici in v skorji, ob dodatku 1,13 mL kvasovk pa le v skorji. Ob uporabi 0,13 mL kvasovk smo dobili kar 44 % večji hlebček. V tem primeru se je pospešil tudi nastanek kisljin v kisljih testih, medtem ko se je ob dodatku večje količine (1,13 mL) upočasnilo in s tem zavrl tudi padec vrednosti pH. Enako velja za sredice rženih kisljih kruhov. Vsebnost maltoze, glukoze in fruktoze se je v kisljih testih povečala od dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije. Prav tako je dodatek vplival na vsebnost sladkorjev v rženih kisljih kruhkih, kjer se je spremenila le vsebnost maltoze, ki je padla. Glede na dobljene rezultate smo zaključili, da dodatek 0,13 mL kvasne suspenzije vodi do nastanka rženih kisljih kruhov z najbolj primerno vsebnostjo hlapnih aromatičnih spojin in drugih parametrov, ki pri tem sodelujejo in so pomembni, da končni izdelek potrošnik pozitivno sprejme.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 664.65 + 664.662:604.4 (043) = 163.6  
CX breadmaking / sourdoughs / rye sourdoughs / rye sourdough breads / dough fermentation / lactic acid bacteria / yeasts / volatile compounds / secondary metabolites / diacetyl / bread aroma  
AU KRIŽMAN, Katja  
AA PLESTENJAK, Andrej (supervisor)/JAMNIK, Polona (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2012  
TI INFLUENCE OF YEASTS ON COMPOSITION OF SECONDARY METABOLITES IN RYE SOURDOUGHS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 67 p., 15 tab., 9 fig., 105 ref.  
LA SI  
AL sl/en  
AB The aim of this thesis was to investigate the influence of added yeast suspension on composition and quantity of volatile aromatic compound in rye sourdoughs and correspondent rye sourdough bread in comparison to those where yeast or sour dough were not added. The focus of analysis was on 2,3-butanedione (diacetyl) production. The effect of addition of different quantities (0,13 mL and 1,13 mL) of yeast *S. cerevisiae* on aromatic compound production was evaluated by using GC-MS. Concentration of 0.13 mL was identified as an optimal addition since it leads to the formation of larger quantities of some volatile aromatic compounds especially in rye sourdough crust. Aromatic compounds such as 3-methyl-butanal, 1-hydroxy-2-propanon, 3-methyl-1-butanol, 2,3-butanedione, 2-methyl-propanal, acetic acid, methyl pyrazine, 3-methyl furan and ethyl acetate contribute to the flavour of the latter. The increased content of methyl-1-propanol, methyl-1-butanol, 2,3-butanedione, acetic acid and 1-hexanol in the crumb of rye sourdough bread were observed. Those volatile aromatic compounds are the products of both LAB and yeasts. Addition of different quantities of yeast suspension also affected the quantity of 2,3-butanedione produced. Higher concentrations of the latter were shown both in crumb and crust of rye sourdough bread. On the other hand, the addition of 1,13 mL gave elevated values of this volatile aromatic compound only in crumb. By using 0,13 mL of yeast suspension, we got bread with volume increased by 44%. The formation of acids in sourdough was also accelerated, while the addition of larger quantities (1,13 mL) slowed the formation and hence caused the drop of pH value. The same applies to the crumb of rye sourdough bread. The content of maltose, glucose and fructose increases with the addition of 0,13 mL of yeast suspension. Addition of yeast also has an impact on sugars in rye sourdough bread where changes in maltose content occur. The maltose content decreased. Results showed that the addition of 0,13 mL of yeast suspension led to the formation of sourdough rye bread with the most appropriate content of volatile aromatic compounds as well as the most appropriate values of other parameters involved in the process. This is very important for the positive acceptance of the final product by the consumer.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 RŽENA IN PŠENIČNA MOKA .....	3
2.2 FERMENTACIJA KISLEGA TESTA .....	5
<b>2.2.1 Kislo testo .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2 Mikrobna populacija kislega testa .....</b>	<b>6</b>
2.2.2.1 Interakcije znotraj mikrobnih združb .....	7
2.2.2.1.1 Prevlada laktobacilov .....	9
<b>2.2.3 Fermentacija .....</b>	<b>11</b>
2.2.3.1 Vpliv na fizikalne lastnosti testa .....	11
2.2.3.2 Nastanek kislin z MKB ter njihov vpliv na kvasovke .....	12
<b>2.2.4 Nastanek aromatičnih spojin v kislh rženih kruhih .....</b>	<b>13</b>
2.2.4.1 Nastanek prekurzorjev arome .....	13
2.2.4.2 Nastanek aromatičnih spojin .....	15
2.2.4.2.1 Hlapne spojine .....	16
2.2.4.2.2 Nehlapne spojine .....	18
<b>2.2.5 Aroma kislh rženih kruhov.....</b>	<b>19</b>
2.3 DIACETIL .....	21
<b>2.3.1 Nastanek diacetila z MKB.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2 Tvorba diacetila s kvasovkami .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.3 Vloga diacetila v kruhu .....</b>	<b>23</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>25</b>
3.1 MATERIALI IN NAČRT POSKUSA .....	25
<b>3.1.1 Priprava kislega testa in glavnega zamesa .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.2 Reagenti in raztopine.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3 Aparature in pribor .....</b>	<b>26</b>
3.2 METODE DELA .....	26
<b>3.2.1 Priprava kislega testa .....</b>	<b>26</b>

3.2.1.1	Zatehta .....	26
3.2.1.2	Priprava kvasne suspenzije .....	27
3.2.1.3	Inokulacija mešanice s kvasno suspenzijo .....	28
3.2.1.4	Fermentacija .....	28
<b>3.2.2</b>	<b>Glavni zames .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Vzhajanje (fermentacija 2) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Peka .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Fizikalno-kemijske analize kislega testa in kruha .....</b>	<b>30</b>
3.2.5.1	Merjenje vrednosti pH in titrabilnih kislin .....	30
3.2.5.2	Določanje volumna in mase rženih kislih kruhov .....	31
3.2.5.3	Določanje sladkorjev v kislem testu in sredici .....	32
3.2.5.4	Določanje aromatičnih spojin v kislem testu, skorji in sredici rženega kislega kruha .....	33
3.3	STATISTIČNA ANALIZA .....	35
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>37</b>
4.1	VPLIV DODATKA RAZLIČNE KOLIČINE KVASNE SUSPENZIJE KISLEMU TESTU NA OSNOVNE STATISTIČNE PARAMETRE (pH, TTA, volumen, masa) .....	37
<b>4.1.1</b>	<b>Spremljanje vrednosti pH tekom fermentacije kislega testa .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Rezultati merjenja vrednosti pH in titrabilnih kislin (TTA) končnega kislega testa in sredice rženih kislih kruhov .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Vpliv dodatka kvasovk na volumen in maso rženih kislih kruhov .....</b>	<b>39</b>
4.2	VPLIV DODATKA RAZLIČNIH KOLIČIN KVASNE SUSPENZIJE KISLEMU TESTU NA NA SLADKORJE IN HLAPE AROMATIČNE SPOJINE .....	40
<b>4.2.1</b>	<b>Sladkorji v kislem testu in sredici .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Aromatične spojine v kislem testu, sredici in skorji rženega kruha .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>50</b>
5.1	RAZPRAVA .....	50
5.2	SKLEPI .....	55
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>59</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava sestave rženega in pšeničnega zrna (% suhe snovi) (Liukkonen in sod., 2006) .....	3
Preglednica 2: Aromatične aktivne hlapne spojine ( $FD \leq 4$ ), ki se nahajajo v sveže mleti rženi moki (Kirchhoff in Schieberle, 2002).....	4
Preglednica 3: Koncentracije, prag zaznave v škrobu ter OAV različnih aktivnih spojin vonja v rženi moki (Kirchhoff in Schieberle, 2002; Hansen in Schieberle, 2005).....	5
Preglednica 4: Nekateri aminokislinski prekursorji pri nastanku alkoholov (Martínez-Anaya, 1996; 3: Salim-ur-Rehman in sod., 2006; Grosch in Schieberle, 1997).....	17
Preglednica 5: Koncentracije, prag zaznave in OAV aktivnih hlapnih vonjav v rženem kislem testu (Kirchhoff in Schieberle, 2002).....	20
Preglednica 6: Hlapne spojine identificirane v različnih stopnjah priprave kislih rženih kruhov (1: Kirchhoff in Schieberle, 2002; 2: Hansen in Schieberle, 2005; 3. Grosch in Schieberle, 1997; 4: Kirchhoff in Schieberle, 2001; 5: Cho in Peterson, 2010) .....	21
Preglednica 7: Receptura za izdelavo kislega testa.....	27
Preglednica 8: Receptura za zames rženega kislega kruha .....	29
Preglednica 9: Rezultati merjenja vrednosti pH in titrabilnih kislin do končne točke titracije (6,6) v končnem kislem testu, sredici rženih kislih kruhov in sredici rženih kruhov .....	38
Preglednica 10: Rezultati merjenja porabe NaOH (mL) v kislem testu, sredici rženih kislih kruhov in sredici rženih kruhov.....	39
Preglednica 11: Vpliv uporabe kislega testa ter dodatka različnih količin kvasovk na volumen in maso rženih kislih kruhov v primerjavi z rženimi kruhi .....	40
Preglednica 12: Specifičen volumen rženih kislih kruhov glede na količino dodatne kvasne suspenzije (0,13 in 1,13 m) v primerjavi s tistimi, katerim kvasovk nismo dodali ter rženimi kruhi .....	40
Preglednica 13: Rezultati merjenj vsebnosti različnih sladkorjev (g/100g) v kislem testu in sredici rženega kislega kruha ter rženega kruha.....	41
Preglednica 14: Prikaz izmerjenih koncentracij hlapnih aromatičnih spojin v sredici rženega kruha, rženega kislega kruha brez ter z različnim dodatkom kvasne suspenzije (0,13 mL in 1,13 mL).....	46
Preglednica 15: Prikaz izmerjenih koncentracij hlapnih aromatičnih spojin v skorji rženega kruha, rženega kislega kruha brez ter z različnim dodatkom kvasne suspenzije (0,13 mL in 1,13 mL).....	49

## KAZALO SLIK

Slika 1: Metabolizem sladkorjev in citrata, amino kislin ter ADI pot v heterofermentativnih MKB (De Vuyst in sod., 2009) .....	10
Slika 2: Ehrlichova pot - katabolizem razvejanih AK, aromatičnih AK in AK, ki vsebujejo žveplo, vodi do nastanka kislin in alkoholov (Hazelwood in sod., 2008) .....	16
Slika 3: Shema priprave rženih kislih kruhov .....	25
Slika 4: Postopek ekstrakcije in desorpcije za SPME (Mundrup in Shirey, 2001) .....	33
Slika 5: Vpliv dodatka različnih količin (0,13 mL in 1,13 mL) kvasne suspenzije na spremembo vrednosti pH glede na čas fermentacije [h] .....	37
Slika 6: Primerjava vsebnosti fruktoze, glukoze, maltoze in saharoze v rženih kislih testih brez dodatka ter z dodatkom (0,13 mL ter 1,13 mL) suspenzije kvasovk .....	42
Slika 7: Primerjava vsebnosti fruktoze, glukoze, maltoze in saharoze v sredici rženih kruhov (slepi vzorec) in sredici rženih kislih kruhov brez dodatka ter z dodatkom (0,13 mL ter 1,13 mL) kvasovk .....	43
Slika 8: Primerjava vsebnost aromatičnih hlapnih spojin v rženem kruhu (slepi vzorec), rženem kislem kruhu brez ter z dodatkom kvasovk (0,13 mL in 1,13 mL) .....	44
Slika 9: Primerjava vsebnosti aromatičnih hlapnih spojin v rženem kruhu, rženem kislem kruhu brez ter z dodatkom kvasovk (0,13 mL in 1,13 mL) .....	47



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	pomen
AEDA	analiza razredčenega ekstrakta arome
ADI	arginin dehidrogenazna pot
ADP	adenozin difosfat
AK	aminokislina
ATP	adenozin trifosfat
c	koncentracija
C.	<i>Candida</i>
CO <sub>2</sub>	ogljikov dioksid
CFU	število bakterij, ki so na gojišču še sposobne narediti kolonijo
FD	faktor redčenja okusa
FID	plameniski ionizacijski detektor
FQ	fermentacijski kvocient
GC-MS	plinska kromatografija z masnim detektorjem
HMDS	heksametildisilazan
IS	interni standard
KV	koeficient variabilnosti
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MKB	mlečnokislinske bakterije
NH <sub>3</sub>	amoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	amoniev ion
NH <sub>4</sub> Cl	amoniev klorid
OAV	aktivna vrednost vonja
P	stopnja značilnosti razlike med kislim testom, kjer kvasovke nismo uporabili in kislo testo, kjer smo uporabili različno količino kvasovk
PBS	fosfatni puffer
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SO	standardni odklon
slepi vzorec	mešanica moke in vode, ki je nismo predhodno fermentirali (razmerje je enako kot pri kislem testu); rženi kruh, ki mu nismo dodali kislega testa
SPME	mikrostrakcija na trdni fazi
<i>subsp.</i>	podvrsta
t	primerjava eksperimentalnih razlik dveh setov podatkov ali eksperimentalno povprečje enega seta podatkov s poznano oz.a referenčno vrednostjo
TTA	titrabilne kisline
$\bar{x}$	povprečna vrednost

## 1 UVOD

Kislo testo se za izdelavo kruha uporablja že več kot 5000 let (Hansen in Schieberle, 2005) in je eden od najstarejših biotehnoloških procesov v proizvodnji hrane. Prvotno se je uporabljalo predvsem kot oblika vzhajanja (Brummer in Lorenz, 1991) vse do leta 1846, ko so kot sredstvo za vzhajanje pričeli uporabljati kvasovke vrste *S. cerevisiae* v tako imenovanem Vienna procesu. Kljub temu da se je uporaba kislega testa zmanjšala, se je tradicionalni način fermentacije obdržal v veliko pekarnah vse do 20. stoletja, saj je bil cenejši. Okoli leta 1919 je z razvojem starterja kislega testa slednje postalo dostopno na trgu, zato so ga tedensko dostavljali pekarnam ter tako zagotovili konstantno kakovost in učinkovitost njegove proizvodnje. Starter je imel pozitiven vpliv na kakovost in varnost izdelka, ne pa tudi na čas procesa (Brandt, 2007). V zadnjem stoletju je bila fermentacija kislega testa v veliki meri zamenjana z direktnim zamesom (Decock in Cappelle, 2005), predvsem zaradi dolgotrajnosti njenega procesa.

Zaradi vedno večjega povpraševanja sodobnih potrošnikov po naravnih, okusnih ter aromatičnih kruhah se kislo testo ponovno vrača v uporabo (Arendt in sod., 2007). V mešanici moke in vode, ki določen čas stoji, se namnožijo naravno prisotne kvasovke in bakterije. Tako mešanico dodamo glavnemu zamesu in mu izboljšamo teksturo, rok trajanja ter predvsem aromo pečenih izdelkov. Mikroflora kislega testa prispeva k nastanku CO<sub>2</sub> in posledično k vzhajanju in zakisanju mešanice. Slednje je za rženo moko in njeno uporabo v peki bistveno z vidika delovanja na žitne encime (Brandt, 2007). S pomočjo proteaz tekom procesa fermentacije nastanejo AK, ki služijo kot prekurzorji. Ti se z metabolno aktivnostjo mikroorganizmov pretvorijo v aromatične spojine, ki lahko nastanejo tudi s termičnih reakcijami med peko. Poleg tega na okus in aromo kruhov vplivata tudi mlečna in očetna kislina, ki imata vlogo zaščite pred mikrobiološkim kvarom, kar posledično vpliva na daljši rok trajanja kruha (Thiele in sod., 2002).

Kislo testo s svojo naravnostjo in tradicijo sodi med visoko kakovostne kruhe z izrazitimi organoleptičnimi lastnostmi. Aroma je rezultat interakcij več faktorjev: tipa moke in drugih sestavin oziroma tipa fermentacije z različnimi značilnostmi, ki so pogojene s tem, ali je fermentacija opravljena s kvasovkami (*S. cerevisiae*) ali MKB (Zlateva in Karadzhev, 2008). Z dodatkom kvasovk lahko do določene mere vplivamo na nastanek aromatičnih spojin ter na tak način poskušamo proizvesti bolj aromatične izdelke z večjo vsebnostjo tistih aromatičnih spojin, ki bodo vplivale na večjo sprejemljivost proizvoda pri kupcu. Ena izmed takih spojin je tudi 2,3-butandion (diacetil), ki daje prijetno aromo po maslu. Ostali parametri, ki smo jih prav tako določali, posredno ali neposredno vplivajo na vsebnost aromatičnih spojin v kruhu in tudi na druge attribute, zaradi katerih se kupci odločijo za končni izdelek.

## 1.1 NAMEN NALOGE

Kruh, narejen iz kislega testa, je tradicionalni produkt z velikim potencialom. Zasluga za ponovni uspeh rženih kislih test je v visoko kakovostnih kruhah tako s prehranskega vidika kot tudi zaradi izboljšane teksture, daljšega roka trajanja kot posledice zaščite pred plesnimi in bakterijskim kvarom ter predvsem zaradi izrazitih organoleptičnih lastnosti.

Glavni namen diplomskega dela je razumevanje nastajanja aromatičnih spojin ter njihovega vpliva na aromo v končnem izdelku – kruhu. Primerjali bomo sestavo in vsebnost hlapnih aromatičnih spojin v kislih testih ter skorji in sredici ustreznih rženih kislih kruhov, katerim smo dodajali različne količine (1,13 mL in 0,13 mL) sespenzije kvasovk *S. cerevisiae*, s tistimi, ki jim kvasovk ne bomo dodali, ter s slepim vzorcem (direkten zames). Posebno pozornost smo namenili vsebnosti 2,3-butandiona (diacetila), saj je bila v predhodnjih raziskavah izmerjena povečana vsebnost te hlapne aromatične spojine ob dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije (glede na količino uporabljene moke) (Redek, 2009). Istočasno smo določili še vpliv dodatka kvasovk v kisloto na TTA, na vsebnost sladkorjev v rženih kislih testih in ustreznih rženih kislih kruhah ter na njihov volumen in pH. Ti parametri prav tako pomembno vplivajo na aromo v rženih kislih kruhah ter s tem na sprejetje izdelka pri kupcu.

Za ovrednotenje sestave hlapnih aromatičnih spojin in sladkorjev v kislih testih in rženih kislih kruhah smo uporabili GC-MS, pri čemer smo morali sladkorje predhodno derivatizirati, saj niso hlapni. S pomočjo statistične analize rezultatov meritev smo poskušali ugotoviti optimalno količino dodatka kvasovk v kisloto, ki vpliva na to, kateri mikroorganizmi bodo v kislem testu prevladali in posledično tudi na vsebnost aromatičnih spojin ter kakovost kruha.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da dodatek znanih količin suspenzije kvasovk *S. cerevisiae* vpliva na:

- sestavo in količino hlapnih aromatičnih spojin,
- povečano vsebnost diacetila,
- vsebnost sladkorjev,
- volumen, pH- in TTA-vrednost v rženih kislih testih in ustreznih rženih kislih kruhah, ki bodo pri potrošniku senzorično bolj sprejemljivi.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 RŽENA IN PŠENIČNA MOKA

Kemijska sestava rženega zrna (*Secale cereale* L.) se zelo spreminja v odvisnosti od okolja, v katerem raste, genotipa in njihovih interakcij. Nanjo vplivajo tudi razlike v žetvi in pogojih po njej ter obdelava zrna pred njegovo uporabo. Pomemben dejavnik je tudi sezona, predvsem za nastanek beljakovin in maščob (Heiniö, 2006). Nekateri avtorji menijo, da na aromo zrna bolj kot kultivar vpliva sorta rži (Heiniö in sod., 2008; Heiniö in sod., 2003). Sestava zemlje pa je pomembna predvsem za sestavo AK, lipidov ter sladkorjev v zrnu, ki posredno delujejo na zaznano aromo (Liukkonen in sod., 2006). Torej vsebnost dušika v zemlji vpliva na sestavo AK ter posledično tudi na sestavo beljakovin v zrnu (Heiniö, 2006).

Rženo zrno je po sestavi podobno pšeničnemu (Preglednica 1), le da vsebuje nekoliko manj škroba ter surovih beljakovin, medtem ko je vsebnost prehranskih vlaknin večja. Glavna sestavina slednjih so arabinoksilani,  $\beta$ -glukani, celuloza, lignin ter fruktan. Nahajajo se predvsem v zunanjih plasteh – otrobih, za razliko od pšenice, v manjših količinah pa tudi v endospermu (Liukkonen in sod., 2006). V zunanjih plasteh ter kalčku se nahajajo fitokemikalije (Heiniö in sod., 2008; Penalvo in sod., 2005) v obliki fitoestrogenov, antioksidantov, fitinske kisline, sterolov (Penalvo in sod., 2005), lignanov, tokoferolov (Salmenkallio-Marttila in sod., 2001) in tokotrienolov, fitosterolov, fenolnih spojin ter mineralov in vitaminov (Liukkonen in sod., 2003), ki so poznane po njihovem bioaktivnem delovanju (Katina in sod., 2005; Liukkonen in sod., 2006).

**Preglednica 1: Primerjava sestave rženega in pšeničnega zrna (% suhe snovi) (Liukkonen in sod., 2006)**

SESTAVINA (%)	RŽ	PŠENICA
pepel	2	2
maščoba	2 - 3	3
beljakovine	10 - 15	12 - 14
škrob	55 - 65	67 - 70
prehranske vlaknine	15 - 17	10 - 13
arabinoksilani	8 - 10	6
$\beta$ -glukani	2 - 3	0,8
celuloza	1 - 3	2,5
lignin	1 - 2	0,8
fruktan	4 - 6	1,4 - 2,6

O aromi rži ter ržene moke ni veliko podatkov. Razlog je verjetno v tem, da se naravna zrna ne uporabljajo toliko, ampak je pred njihovo uporabo vedno potrebna obdelava. Aroma neobdelane rži je zelo blaga in mila v primerjavi z aromo obelane (Heiniö in sod., 2008; Heiniö, 2006; Liukkonen in sod., 2006).

Alevronska plast zrna vsebuje veliko encimov vključno s peroksidazami, polifenoloksidazami, ksilazami ter z amilazami. Če se je ta plast med mletjem

poškodovala, pride do nastanka nezaželenih oz. slabih arom, potemnitve pigmentov ter do razgradnje škroba. Fenoloksidaze pretvorijo brezbarvne fenolne spojine v temne polimere, ki lahko povzročijo siv odtenek (Heiniö in sod., 2008). Pomembna je tudi amilazna aktivnost, ki poveča dostopnost topnih ogljikovih hidratov (teh je 0,5 – 1 %) (Linko in sod., 1997), saj je teh v rženi moki malo (Gobbetti, 1998). Proteazna aktivnost v rženi moki je prav tako visoka in v kasnejših procesih predelave prispeva k nastanku peptidov in AK. Slednje, tako kot sladkorji, sodelujejo v metabolnih ter termalnih reakcijah, ki lahko vodijo do nastanka aromatičnih spojin in njihovih prekurzorjev (Cho in Peterson, 2010).

Na zaznavo arome vplivajo predvsem hlapne spojine, med katere spadajo aldehydi, ketoni ter alkoholi. Nehlapne spojine vplivajo na aromo direktno ali pa indirektno v obliki njenih prekurzorjev (Liukkonen in sod., 2006), med katere spadajo AK, maščobe ter fenolne spojine, ki se v procesu izdelave kruha pretvorijo v aktivne aromatične spojine (Heiniö in sod., 2003).

**Preglednica 2: Aromatične aktivne hlapne spojine ( $FD \leq 4$ ), ki se nahajajo v sveže mleti rženi moki (Kirchhoff in Schieberle, 2002)**

	spojina	tip arome	FD faktor
1/2	2- in 3-metilbutanal	slad	4
3	2,3-butanedion	maslo	4
4	heksanal	trava	64
5	oktanal	saden, milnat	8
6	1-okten-3-on	gobe	128
7	(E)-2-oktenal	trava, maščobe	8
8	metional	kuhan krompir	128
9	(Z)-2-nonenal	trava, maščobe	32
10	(E)-2 nonenal	trava, maščobe	128
11	(E,Z)- 2,6-nonadienal	kumarice	16
12	butanojska kislina	sladko	8
13	2- in 3-metilbutanojska kislina	sladko	8
14	(E,E)-2,4-nonadienal	maščobe, vosek	16
15	pentanojska kislina	sladek	8
16	(E,Z)-2,4-dekadienal	trava, maščobe	8
17	(E,E)-2,4-dekadienal	maščobe, vosek	32
18	(E)- $\beta$ -damascenone	kuhana jabolka	4
19	4,5-epoksi-(E)-2-dekanal	metaleni	32
20	4-vinil-2-metilfenol	nageljnovc žbice	4
21	3-hidroksi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon	začinjen /začimbe	64
22	neznan	metaleni	8
23	3-hidroksi-5-etil-4-metil-2(5H)-furanon	pekoč	8
24	neznan	pekoč	16
25	2-fenilmlečna kislina	sladek, med	8
26	vanilin	vanilija	8

Ržena in pšenična moka vsebujeta veliko število aktivnih hlapnih aromatičnih spojin, ki se med obema žitaricama razlikujejo po svoji kvalitativni kot tudi kvantitativni sestavi.

Spojine, kot so 2,3-butanedion, oktanal, (E)-2-oktenal, 4-vinil-2-metoksifenol ter 3-hidroksi-5-etil-4-metil-2(5H)-furanon, so značilne za rženo moko, niso pa bile odkrite v pšenični (Czerny in Schieberle, 2002). Kirchhoff in Schieberle (2002) sta v rženi moki identificirala 26 vonjav, z uporabo tehnike AEDA (analiza razredčenega ekstrakta arome) pa napovedala možnost njihovega prispevka k aromi ržene moke. Prag zaznave spojin sta določila v škrobu, saj predstavlja glavno komponento moke (v rženem zrnju je 55 – 65 % škroba) (Liukkonen in sod., 2006), ter rezultate izrazila s faktorjem redčenja okusa (FD) (Kirchhoff in Schieberle, 2002). Slednji izraža razmerje med koncentracijo vonja v začetnem ekstraktu glede na koncentracijo v najbolj razredčenem, ko še lahko zaznamo vonj s pomočjo GC/olfaktometrije (Grosch, 2001; Zhou in sod., 1999). Heksanal, metional, (E)-2-nonenal, 1-okten-3-on (Hansen in Schieberle, 2005), (E)-2,4-dekadienal, 3-hidroksi-5-etil-4-metil-2(5H)-furanon ter 4,5-epoksi-(E)-2-dekanal so bile spojine z najvišjim FD-faktorjem (Preglednica 2).

Glede na dobljene vrednosti, navedene v preglednici 3, lahko sklepamo, da k aromi ržene moke največ prispevajo metional, (E)-2-nonenal ter heksanal, saj njihove koncentracije presegajo prag zaznave za faktor >100 (Preglednica 2) (Kirchhoff in Schieberle, 2002). Vsebnosti metionala kar 900-krat presega njegov prag zaznave, kar potrjuje njegov vpliv na aromo rži. Prisotne hlapne spojine v moki so kljub temu manj pomembne, vzrok za to je njihov majhen prispevek k aromi kruha (Cho in Peterson, 2010; Martínez-Anaya, 1996).

**Preglednica 3: Koncentracije, prag zaznave v škrobu ter OAV različnih aktivnih spojin vonja v rženi moki (Kirchhoff in Schieberle, 2002; Hansen in Schieberle, 2005).**

spojina	koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ suhe snovi)	prag zaznave ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ v škrobu)	OAV <sup>a</sup>
heksanal	3080	30	103
metional	242	0,27	896
(E)-2-nonenal	98	0,53	185
(E)-2,4-dekadienal	80	2,7	30
3-hidroksi-5-etil-4-metil-2(5H)-furanon	1,8	2,1	<1
4,5-epoksi-(E)-2-dekanal	0,5	0,19	2,6

<sup>a</sup>=OAV izračunamo tako, da delimo koncentracijo aromatične spojine v izdelku s koncentracijo njenega praga zaznave

## 2.2 FERMENTACIJA KISLEGA TESTA

### 2.2.1 Kislo testo

Kislo testo je zelo kompleksen biološki sistem (Gobbetti, 1998), ki je bistven za izdelavo rženih izdelkov (Kozlinski in sod., 2008). To tradicionalno metodo, ki zaradi večtisočletne uporabe velja za varno, se uporablja predvsem za izboljšanje arome, teksture ter roka trajanja kruha. Včasih se je proces priprave kislega testa uporabljal predvsem kot oblika vzhajanja, dokler niso v 19. stoletju vpeljali pekovskih kvasovk (Lönner in sod., 1986). Te so poenostavile proces vzhajanja in omogočile avtomatizacijo v industrijskih pekarnah. Od takrat je bila uporaba kislega testa omejena večinoma na obrtniške pekarnice in izdelavo rženih kruhov (Diowksz in Ambroziak, 2006). Zaradi povpraševanja potrošnikov po

naravni, okusni ter zdravi hrani (Arendt in sod., 2007; Brummer in Lorenz, 1991) se v zadnjih desetletjih uporaba tradicionalnih fermentacijskih tehnik v pekarstvu ponovno upeljuje (Diowksz in Ambroziak, 2006). Danes kislo testo predstavlja tudi alternativo uporabi aditivov (Brand, 2007; Sadeghi, 2008), ker mu daje naraven (Žugić-Petrović in sod., 2009; Sadeghi, 2008) in zdrav videz (Heiniö in sod., 2003).

Kislo testo pripravimo iz mešanice moke in vode, ki je fermentirana s kvasovkami ter MKB (De Vuyst in Vancanneyt, 2007; De Vuyst in sod., 2002). Slednje lahko izvirajo iz naravno kontaminirane moke in ostalih surovin, saj niso podvržene toplotni sterilizaciji (Corsetti in Settanni, 2007), iz okolja pekarnice ali pa iz starter kulture, ki vsebuje eno ali več znanih vrst MKB (De Vuyst in Neysen, 2005). Kislo testo proizvedemo v pekarni ali pa ga dobimo od komercialnih dobaviteljev (De Vuyst in Neysen, 2005; Kline in Sugihara, 1971).

Tradicionalna tehnologija priprave kislega testa temelji na spontanem fermentacijskem procesu, ki je posledica naravno prisotnih mikroorganizmov v moki. Klasična priprava kislega testa je večstopenjski proces (največkrat 3-stopenjski) (De Vuyst in Neysen, 2005; Hammes in Gönzle, 1998), pri katerem mešanico moke in vode pustimo za nekaj ur (ponavadi preko noči) pri sobni temperaturi izpostavljeno atmosferi. Vsako naslednjo stopnjo se pripravi z dodatkom mešanice sveže moke in vode prejšnji stopnji (Brummer in Lorenz, 1991; Linko in sod., 1997; Kariluoto in sod., 2004). Na predstavljen naravni način lahko kislo testo obdržimo metabolno aktivno tudi desetletja (Rosenquist in Hansen, 2000).

Industrijsko proizvedena kislata testa ne temeljijo na fermentaciji z naključno mikrofloro, ampak na uporabi starter kultur (Katina, 2005; Thiele, 2003; Sadeghi, 2008). Te kulture so mešanica sevov izbranih mikroorganizmov ali pa jih pridobimo s ponovno inokulacijo. Ta temelji na nekajdnevnom obnavljanju mešanice moka – voda, pri čemer pride do spontane prevlade tipične mikroflore (Tuukkanen in sod., 2005; Salovaara, 2004). Da dobimo popolno razvit starter oziroma kislo matico, ki nam služi kot inokulum za naslednjo serijo, potrebujemo pri rženih kislanih testih približno štiri do pet dni (Lönner in sod., 1986). Ponovno inokulacijo pogosto uporabljajo pekarnice za vzdrževanje lastne starter kulture (Kariluoto in sod., 2006).

### 2.2.2 Mikrobna populacija kislega testa

Pozitiven vpliv kislega testa je povezan predvsem z mikrobno floro (Paramithiotis in sod., 2007), ki je odvisna tako od endogenih (kemijska in mikrobiološka sestava testa oziroma tip moke) in eksogenih faktorjev (temperatura in čas fermentacije, redoks potencial, donos testa...) ter interakcij med njimi (Valmorri in sod., 2010; De Vuyst in Neysen, 2005; Van der Meulen in sod., 2007). Do danes so izolirali več kot 50 vrst MKB, predvsem rodu *Lactobacillus*, ter okoli 20 različnih vrst kvasovk (Häggman in Salovaara, 2008b).

Kot pri večini fermentirane hrane tudi pri spontanah fermentacijskih procesih kislega testa prevladujejo homofermentativne MKB (De Vuyst in Neysen, 2005; Corsetti in Settanni, 2007; Valmorri in sod., 2010), katerih najpogostejši predstavniki so *Lb. acidophilus*, *Lb. delbruecki* subsp. *delbruecki*, *Lb. amilovorius*, *Lb. casei* ter *Lb. farciminis* (obligatorno

homofermentativni). Pomembne so tudi heterofermentativne MKB, med katere uvrščamo *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. fructivorans*, *Lb. buchneri*, *Lb. viridescens*, (obligatorno heterofermentativni), *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. alimentarius* (fakultativno heterofermentativne), *Lb. panis* in *Lb. pontis*, saj poganjajo fermentacijo s ponovno inokulacijo (back slopping) (Rosenquist in Hansen, 2000; Žugić-Petrović in sod., 2009; De Vuyst in Neysen, 2005; Kozlinski in sod., 2008). Poleg laktobacilov so v veliki meri prisotni tudi pediokoki (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), medtem ko je večje število MKB iz rodov *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* in *Weisella* prisotnih zgolj na začetku fermentacijskega procesa (De Vuyst in Neysen, 2005; Žugić-Petrović in sod., 2009; Savić in sod., 2006). Pri tradicionalno pripravljenem kislem testu prevladujočo vlogo prevzamejo obligatorno heterofermentativni laktobacili (Sadeghi, 2008).

Izolirani laktobacili so lahko obligatorno homofermentativni in fakultativno ali obligatorno heterofermentativni. Homofermentativni rodovi imajo enostaven metabolizem, ki je v 85 % usmerjen v fermentacijo mlečne kisline iz heksoz, pri čemer uporabljajo Embden-Meyerhof-Parnas metabolno (EMP) pot.

Kompleksnejši je metabolizem heterofermentativnih rodov, ki poleg heksoze fermentira tudi pentoze. Fakultativno heterofermentativni laktobacili v prevladujočem deležu fermentirajo pentoze preko EMP poti, medtem ko za heksoze uporabljajo fosfoglukonatno pot, ki vodi do nastanka mlečne ter očetne kisline. Obligatory heterofermentativni rodovi fermentirajo tako heksoze kot tudi pentoze po isti fosfoglukonatni poti. Pri tem iz pentoz proizvajajo mlečno in očetno kislino, pri fermentaciji heksoz pa poleg obeh kislin nastajata še etanol in CO<sub>2</sub> (Stolz, 2003; Diowksz in Ambroziak, 2006; Hansen in Schieberle, 2005).

Laktobacili so odgovorni predvsem za reologijo, aromo, prehranske ter funkcionalne lastnosti izdelkov iz kislega testa, kvasovke pa so zadolžene za vzhajanje le-tega (Sadeghi, 2008). Med kvasovkami prevladujejo sledeče: *S. exiguus*, *S. cerevisiae*, *S. turbidans*, *S. marchalianus*, *T. albida* ter *Saturnispora saitoi* (De Vuyst in Neysen, 2005). Velikokrat omenjeni sta tudi *C. humilis* (fiziološko podobna *C. milleri*) ter *C. krusei* (Kozlinski in sod., 2008; Tuukkanen in sod., 2005; Salim-ur-Rehman in sod., 2006).

#### 2.2.2.1 Interakcije znotraj mikrobnih združb

Trend fermentacije kislega testa je edinstvena simbioza med heterofermentativnimi in homofermentativnimi MKB ter kvasovkami. Antagonistične in sinergistične interakcije med njimi so pomembne za metabolno aktivnost testa (Kozlinski in sod., 2008; Sadeghi, 2008; Sadeghi in sod., 2007) in prispevajo k nastanku aromatičnih spojin pri optimalnem razmerju 100:1 v prid MKB (Hansen in Schieberle, 2005; De Vuyst in Neysen, 2005). Osnovane so na metabolizmu ogljikovih hidratov, aminokislin ter nastanku CO<sub>2</sub> (Sadeghi in sod., 2007).

Predpogoj za obstoj stabilnih združb je netekmovalno okolje za glavni vir ogljika (Paramithiotis in sod., 2007). Takšna je združba maltoza pozitivnih sevov MKB ter maltoza negativnih kvasovk, ki je tipična za kislina testa, v katerih prevladujejo *Lb. sanfranciscensis*. Te hidrolizirajo maltozo (raje kot glukozo) in akumulirajo glukozo v



medij v molarnem razmerju ~ 1:1 (Meroth in sod., 2003; De Vuyst in sod., 2002; Salim-ur-Rehman in sod., 2006; Gobbetti, 1998). Ko je količina maltoze v kislem testu osiromašena, se prične poraba glukoze, predhodno izločene z *Lb. sanfranciscensis* (Paramithiotis in sod., 2007). Glukozo lahko uporabljajo tudi maltoza negativne kvasovke, kot sta *S. exiguus* (raje uporabljajo saharozo in glukozo, (Gobbetti in Corsetti A., 1997)) in *C. humilis*, ali pa ta povzroči represijo z glukozo maltoznega katabolizma v tekmovalcih, ki zato ne morejo uporabljati maltoze (Meroth in sod., 2003; De Vuyst in sod., 2002; Salim-ur-Rehman in sod., 2006; Gobbetti, 1998).

V primeru združbe, v kateri se poleg *Lb. sanfranciscensis* nahaja maltoza pozitivna kvasovka *S. cerevisiae*, pride do zmanjšanja metabolizma in s tem rasti bakterije (Salim-ur-Rehman in sod., 2006; De Vuyst in Neysen, 2005), saj kvasovke hitreje porabljajo maltozo in glukozo (Valmorri in sod., 2008; Martínez-Anaya, 1996). Podobna je tudi združba, v kateri se nahajajo *Lb. plantarum* (maltoza pozitiven) in *S. cerevisiae* ali *S. exiguus*. Tukaj kvasna invertaza hidrolizira saharozo v glukozo in fruktozo, kar poveča metabolizem kvasovk, saj kvasovke lahko hidrolizirajo saharozo približno 200-krat hitreje dobljene monosaharide (Salim-ur-Rehman in sod., 2006).

Tudi razlika v uporabi vseh štirih ogljikovih hidratov (maltoza, saharoza, fruktoza in glukoza) se lahko kaže v netekmovalni združbi različnih vrst MKB. Tak primer je združba med *Lb. sanfranciscensis* in *Lb. plantarum* (De Vuyst in sod., 2009), ki je bila največkrat proučena in opisana pri rženih in pri pšeničnih kislih testih (Valmorri in sod., 2010). Medtem ko *Lb. sanfranciscensis* raje uporablja maltozo in običajno ne more fermentirati fruktoze, pa *Lb. plantarum* raje fermentira glukozo in fruktozo, pri čemer je metabolizem maltoze predmet represije ogljikovega katabolita (carbon catabolite repression) (De Vuyst in sod., 2009). Združbe MKB in kvasovk lahko prispevajo metabolite, ki dajejo okus in aromo fermentirani hrani (Kohajdović in Karovičova, 2007).

Kislo okolje, kot ga ustvarijo MKB, ustreza širjenju nekaterih kvasovk. Njihova prisotnost istočasno zagotavlja ustrezne rastne faktorje, kot so vitamini in topne dušikove spojine, kar stimulira rast MKB (Kohajdović in Karovičova, 2007). Stimulacija rasti *Lb. sanfranciscensis* in *Lb. plantarum* je povezana s povečano dostopnostjo specifičnih AK in peptidov, ki so jih izločile kvasovke, kot sta *S. cerevisiae* in *S. exiguus*. To omogoča pomanjkanje tekmovalnosti za vir dušika, saj v mešanici  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in aminokislin kvasovke raje uporabljajo  $\text{NH}_4^+$ , kot tudi izločanje specifičnih aminokislin in majhnih peptidov s strani kvasovk med njihovo rastjo ali kot posledica pospešene avtolize.

Na tak način je omogočena rast MKB tudi v mediju, v katerem sprva ni bilo osnovnih AK (valin, izolevcin). Ugotovili so, da je stimulativen rastni faktor *Lb. sanfranciscensis* majhen peptid (aspartat-cistein-glutamat-glicin-lizin), ki ga vsebuje tako ekstrakt sveže pripravljenih kvasovk kot tudi komercialne kvasovke (Gobbetti in Corsetti, 1997; Gobbetti, 1998). Bakterije raje prevzemajo peptidno vezane AK kot pa proste. To je koristno, saj direkten transport peptidov v celico pred hidrolizo zmanjša metabolno energijo, ki bi jo potrebovali za prevzem AK (Gobbetti, 1998).

Čeprav je fermentacija s kvasovko *S. cerevisiae* povezana z zmanjšanjem AK v kislih testih, lahko osvoboditev specifičnih peptidov in/ali AK zagotavlja tekmovalno prednost in

prispeva k stabilnosti MKB v kislem testu (Gobbetti in Corsetti, 1997; Gobbetti, 1998). Pozitiven vpliv na kvasovke ima *Lb. sanfranciscensis*, kar lahko opazimo pri združbi s *S. cerevisiae* in tudi s *S. exiguus*, kjer skupna rast poveča nastanek CO<sub>2</sub> (Gobbetti in Corsetti, 1997). Do tega pride, ker heterofermentativne MKB povečajo metabolično aktivnost kvasovk, ki nato proizvedejo več CO<sub>2</sub> (Sadeghi in sod., 2007). *Lb. sanfranciscensi*, na primer, kaže na nastanek večjih koncentracij alifatičnih, dikarboksilnih ter hidroksi aminoskupin, katerih večina ima stimulatorni vpliv na bakterijsko rast (Gobbetti in Corsetti, 1997).

#### 2.2.2.1.1 Prevlada laktobacilov

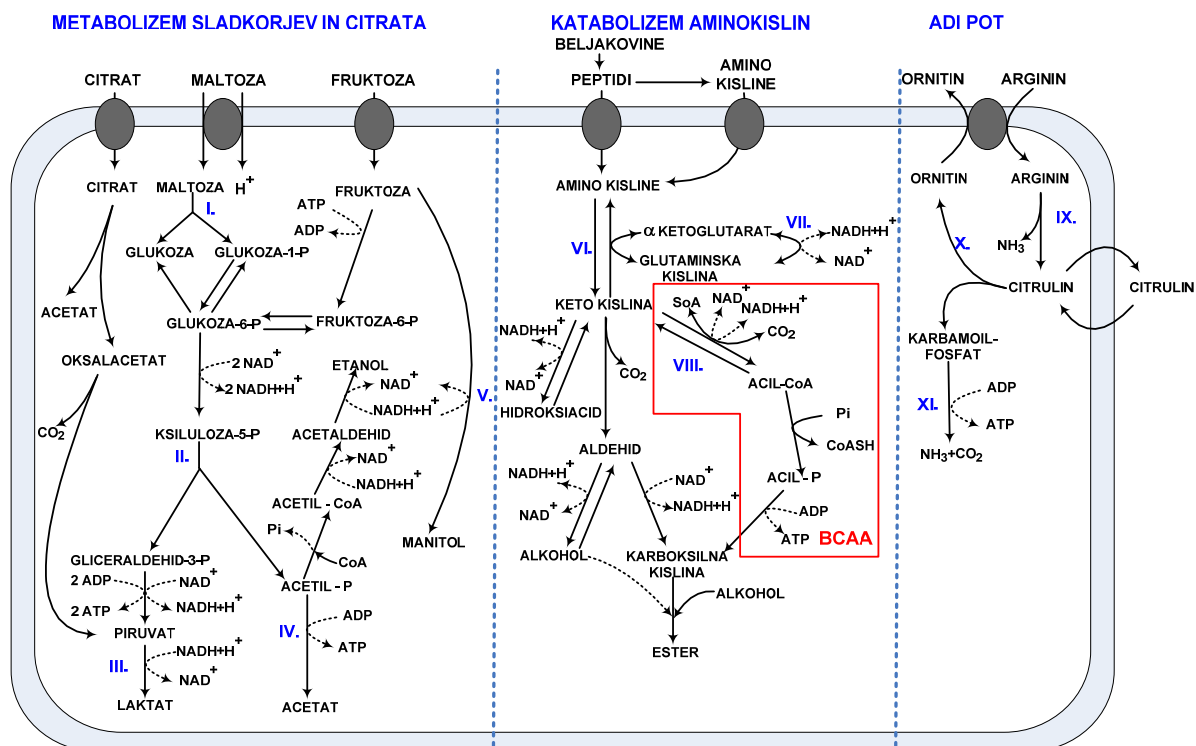
MKB niso prevladovale v kislem testu že od samega začetka, ampak so sprva predstavljale le eno tretjino celotne bakterijske populacije (Kohajdović in Karovičova., 2007; Savić in sod., 2006).

Ena izmed karakteristik, ki kaže na prilagodljivost MKB v okolju, je visoko prilagojen metabolizem na glavni vir energije v testu, to sta maltoza in fruktoza. Preferenčna uporaba maltoze poteka z ustreznimi kataboličnimi potmi, ki vključujejo maltozo/H<sup>+</sup> simport ter aktivnost maltoza fosforilaze (De Vuyst in sod., 2009). Ta encim omogoči razcep največjega vira energije v moki – maltoze na glukozo in glukozo-1-fosfat (ne da bi pri tem porabili ATP), kar MKB daje dodatno energijsko prednost. Nefosforilirana glukosa se nato izloči, s čimer prepreči znotrajcelično akumulacijo. Na ta način lahko povzroči represijo z glukozo v drugih mikroorganizmih, prisotnih v ekosistemu kislega testa, ter tako prepreči tekmovanje za maltozo. Glukozo-1-fosfat se z encimom fosfoglukomutaza pretvori v glukozo-6-fosfat, ki nato vstopi v fosfoglukonatno pot oziroma pentozafosfatno pot (dobimo laktat, očetno kislino in CO<sub>2</sub>) (Weckx in sod., 2010; De Vuyst in sod., 2009; De Vuyst in sod., 2002).

Tak način fermentacije ogljikovih hidratov je značilen za *Lb. Sanfranciscensis*, *Lb. brevis*, *Lb. reuteri*, *Lb. pontis* ter *Lb. fermentum*, ki lahko kot alternativni/zunanji akceptor elektrona uporabljajo tudi fruktozo (razen *Lb. brevis*). Direktna pretvorba fruktoze v manitol (sladek okus) z manitol-dehidrogenazo omogoči nastanek ATP in nastanek večjih količin očetne kisline iz acetil-fosfata, kar pozitivno vpliva na aromo (De Vuyst in sod., 2009; Gobbetti, 1998). Enako tekmovalno prednost dajejo tudi uporaba citrata, kratkoverižnih aldehydov, oksidirane glutationa ter kisika (De Vuyst in sod., 2009; Gobbetti, 1998). Slednjega lahko uporablja le *Lb. sanfranciscensis*, medtem ko aerobni pogoji rast *Lb. reuteri*, *Lb. pontis* in *Lb. fermentum* inhibirajo (Gänzle in sod., 2007). Kofermentacija omogoča mikroorganizmom uporabo substratov, ki so drugače nefermentabilni (Gobbetti, 1998). Nastanek dodatnega ATP pri teh poteh poveča tekmovalnost heterofermentativnih MKB (De Vuyst in sod., 2009; Weckx in sod., 2010).

Zelo razširjena je tudi arginindehidrogenazna pot (ADI pot). Ta vključuje pretvorbo aminokisline arginin v ornitin s sočasno tvorbo ATP in NH<sub>3</sub>, kar daje sevu energijsko prednost ter ga varuje pred kisliniskim stresom (Weckx in sod., 2010). Na ta način si konkurenčno prednost povečajo *Lb. pontis*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* ter *Lb. frumet* (De Vuyst in sod., 2009). *Lb. plantarum* ima v fermentacijo ogljikovih hidratov vključenih

veliko transportnih encimov, kar razloži njegovo prevlado v mnogih fermentacijskih sistemih (Müller in sod., 2001).



Slika 1: Metabolizem sladkorjev in citrata, amino kislin ter ADI pot v heterofermentativnih MKB (De Vuyst in sod., 2009)

Poleg visoko adaptiranega metabolizma ogljikovih hidratov k prevladi laktobacilov prispevajo tudi mehanizem odziva na stres, visoka osmolarnost/dehidracija, oksidacija ter stradanje (De Vuyst in Neysen, 2005). Omembe vredna sta še nastanek manitola in ornitina ter regulacija redoks ravnotežja, ki lahko prav tako povečata tekmovalnost MKB med fermentacijo (Weckx in sod., 2010). Rastne potrebe nekaterih MKB z vidika temperature in pH medija ustrezajo tistim, ki jih srečamo pri fermentaciji kislega testa.

K prevladi pripomore tudi tvorba protimikrobnih snovi, tako organskih kislin (laktat, acetat in ostale) kot tudi beljakovinskih spojin (na primer bakteriocinov), ki njihovo tekmovalnost izboljšajo, poleg tega pa lahko prispevajo k stabilnemu učinku (persistence) med fermentacijo kislega testa (De Vuyst in Neysen, 2005). Čeprav je v kislem testu več mlečne kot očetne kisline in čeprav je mlečna kislina močnejša, ima očetna kislina večji protimikrobni vpliv. Vzrok temu je njena nedisocirana oblika, medtem ko se mlečna kislina nahaja predvsem v disocirani obliki (Lönner in Preve-Akesson, 1988). Nastanek bakteriocinov so opazili pri *Lb. reuteri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. plantarum*, *Lb. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei* in nekaterih sevih rodu *Lb. sanfranciscensis*, ki so jih izolirali iz kislih test. Poleg omenjenih protimikrobni učinek kažeta tudi diacetil in vodikov peroksid, ki ju prav tako proizvajajo MKB (Rosenquist in Hansen, 2000). Vse to je vzrok, da vrednost MKB narase na  $10^2 - 10^3$  CFU/g v moki ter na  $10^7 - 10^8$  CFU/g v zrelih kislih testih (Žugić-Petrović in sod., 2009).

### 2.2.3 Fermentacija

Pri fermentaciji kislega testa MKB ustvarijo optimalen pH za aktivnost endogenih faktorjev, ki izboljšajo lastnosti testa ter teksturne spremembe, prispevajo neposredno k vonju in okusu kruha, povečajo razkroj fitatov, volumen ter prebavljivost kruha, upočasnijo retrogradacijo škroba, učvrstitev kruha ter proces staranja, varujejo pred plesnimi in bakterijskim kvarom ter verjetno povečajo toleranco človeka na gluten. Poleg tega fermentacija izboljša tudi prehransko vrednost in funkcionalne lastnosti žitnih proizvodov tako, da stabilizira ali poveča nivo različnih bioaktivnih spojin ter zmanjša škrobno (izdelki z nizkim glikemičnim indeksom) in poveča mineralno dostopnost (Sadeghi in sod., 2007).

Njena glavna naloga pri pšeničnih kislih testih je pretvorba dostopnih sladkorjev v ogljikov dioksid ter encimska hidroliza, s katero se omehča gluten in spremeni karakteristike testa tako, da testo zadrži več plina (Yang, 2006).

Čeprav se največja količina aromatičnih spojin tvori med peko, je fermentacija kislega testa nujna za doseg sprejemljive arome, saj so kemijsko zakisani kruhi padli pri ocenjevanju senzorične kvalitete (Damiani in sod., 1996).

#### 2.2.3.1 Vpliv na fizikalne lastnosti testa

Uporaba pekovskih kvasovk ni izločila uporabe kislega testa pri peki rženih kruhov, saj je znižanje pH slednjega bistveno za zagotovitev ustreznih pecilnih lastnosti. V procesu nastajanja teksture imajo beljakovine v rženih testih manjšo vlogo kot pa pri pšeničnih, ker visoka vsebnost pentozanov preprečuje tvorbo glutenske mreže. Funkcijo vezave vode in zadrževanja plinov, ki jo pri pšenici opravlja gluten, tukaj prevzamejo pentozani. Njihova topnost in nabrekanje se povečata pri nizki vrednosti pH, ki je za kislota testa karakteristična.

Poleg primarnega vpliva nizkega pH na značilnosti kislega testa sekundaren vpliv zakisanja vključuje spremembe v aktivnosti žitnih ter bakterijskih encimov. Kisli pogoji delno inaktivirajo encimsko aktivnost moke, predvsem amilaz. To je pomembno, saj škrob v rži želatinizira pri relativno nizki temperaturi 53 – 64 °C (pri pšenici 63 – 79 °C) (Stolz, 2003), kar sovpada s temperaturnim območjem maksimalne aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Če je ržena moka slabe kvalitete, potem je amilazna aktivnost tako visoka, da lahko sredica postane popolnoma hidrolizirana. Prekomerna količina  $\alpha$ -amilaze pa ne proizvede samo lepljive sredice, ampak pri višji vsebnosti zmanjša volumen kruha.

Zakisanje prav tako deluje pozitivno na strukturo škrobnih zrn, kar vodi do povečane sposobnosti za vezavo vode. Zakisanje rženih kislih test izboljša njihove fizikalne lastnosti tako, da jih naredi bolj elastične ter daje značilno kislo noto rženim kruhom (Arendt in sod., 2007; Brandt in sod., 2004).

### 2.2.3.2 Nastanek kislin z MKB ter njihov vpliv na kvasovke

K fermentaciji kislega testa prispevata tako alkoholna fermentacija z endogenimi kvasovkami kot tudi mlečno-kislinska fermentacija s spremljajočimi MKB. Nastali metaboliti so značilni za kislo testo ter prispevajo k strukturi, senzoričnim in prehranskim lastnostim (Häggman in Salovaara, 2008a; Häggman in Salovaara, 2008b).

Topni oz. fermentabilni ogljikovi hidrati so v rženi in v pšenični moki prisotni v majhnih količinah. Njihova koncentracija se spreminja s tipom moke, z nivojem amilazne aktivnosti v moki in glede na to, kako mikroorganizmi delujejo na poškodovana škrobna zrna ter glede na njihovo porabo s strani mikroorganizmov (Corsetti in Settanni, 2007; Gobbetti, 1998). Pri fermentaciji pšenične moke pride velikokrat do izrabe topnih ogljikovih hidratov. Ta situacija je manj izrazita pri rženi fermentaciji, saj večja encimska aktivnost moke poveča dostopnost topnih ogljikovih hidratov (Salim-ur-Rehman in sod., 2006). Na uporabo topnih ogljikovih hidratov z MKB ter posledično na donos energije, mlečne in očetne kisline zelo vplivajo tudi kvasovke in uporabljena vrsta sladkorja (Gobbetti, 1998).

Surovine se zakisajo z nastankom mlečne in očetne kisline, ki dosežeta nivo 100 – 200 mmol/L in 40 – 60 mmol/L. Koncentracija mlečne kisline, nastale v kislem testu, je določena z njeno puferno kapaciteto, medtem ko se vsebnost očetne kisline spreminja z dostopnostjo substratov. Laktobacili substrate uporabljajo kot akceptorje elektronov (De Vuyst in Neysen, 2005). Z laktat dehidrogenazo lahko iz piruvata proizvajajo laktat, ki je glavni produkt homolaktične fermentacije, medtem ko pri heterolaktični fermentaciji nastanejo poleg laktata še očetna in mravljična kislina, etanol ter ogljikov dioksid (Valmorri in sod., 2008).

Heterofermentativne MKB, kot je *Lb. sanfranciscensis*, lahko tolerirajo do 250 mmol mlečne in očetne kisline na liter rženega ali pšeničnega testa, poleg tega nedisocirana kislina ne vpliva na njihovo rast. V nasprotju pa je rast kvasovk, kot sta *Candida humilis* in *S. exiguus*, močno inhibirana ob prisotnosti očetne kisline ter v manjši meri tudi mlečne kisline (De Vuyst in Neysen, 2005). Vzrok za to lahko pripišemo veliki vsebnosti nedisocirane očetne kisline predvsem v zrelih testih, ki lahko prehaja v kvasno celico in tako zavira delovanje kvasovk z zakisanjem njihove citoplazme. Posledica takšnega fiziološkega stresa je zatrt metabolna aktivnost v celici (Häggman in Salovaara, 2008b).

Za razliko od zgoraj omenjenih kvasovk je *C. milleri* adaptirana na pH-območje 3,5 – 6,0 in ima dobro odpornost na kisline (Häggman in Salovaara, 2008b). Ugotovili so tudi, da je *Lb. plantarum* pri pH 3,6 sposoben uporabljati glukozo, fermentacija pa je še vedno mogoča tudi pri pH 3,0 (Michalska in sod., 2002).

Poleg visoke tolerance ima *Lb. sanfranciscensis* veliko sposobnost zakisanja (Kozlinski in sod., 2008) ter lahko proizvede več kislin kot *Lb. plantarum* (Michalska in sod., 2002). To je dokazal Sadeghi in sod. (2007), saj je imelo kislo testo, fermentirano z *Lb. sanfranciscensis*, višji pH (Sadeghi in sod., 2007).

MKB se razmnožujejo ter proizvajajo mlečno in očetno kislino počasneje v mešanicah kot pa v monokulturi (Salim-ur-Rehman in sod., 2006). Optimalen nastanek kislin je bil

pripisan združbi *S. cerevisiae* in *Lb. sanfranciscensis* ali *Lb. plantarum*, medtem ko ekstrakt kvasovk ni dal enakega učinka. Ugotovili so tudi, da *Torulopsis holmi* izboljša zakisanje v sodelovanju z *Lb. sanfranciscensis* (Gobbetti, 1998; Valmorri in sod., 2008).

Kisik ali akceptor elektronov (na primer fruktoza) povečata proizvodnjo očetne kisline na račun etanola v heterolaktičnih sevih, kot so *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. brevis*, *Lb. bucheneri* in *Lb. fermenti*. Omejena količina glukoze ali rast celic na maltozi povzroči premik metabolne poti iz homolaktične v heterolaktično fermentacijo, kar vodi tudi do sprememb v sestavi stranskih hlapnih produktov (Martínez-Anaya, 1996; Martínez-Anaya, 2003).

Pri rženih kislih testih je kislo testo tista sestavina, ki se običajno uporablja za zakisanje s pomočjo MKB. V pekarnah proces poteka pri temperaturah 25 – 32 °C ter času 8 – 24 ur, kar predstavlja optimalne pogoje za doseganje potrebnega nivoja kislosti (Häggman in Salovaara, 2008a; Häggman in Salovaara, 2008b; Valmorri in sod., 2010). Različni avtorji navajajo, da je pH rženih kislih test med 3,5 in 3,9, medtem ko je bila vrednost pH spontanih rženih kislih test 4,1 (Michalska in sod., 2002).

Kvasovke prispevajo k vzhajanju testa z nastankom ogljikovega dioksida ter posledično volumna (Valmorri in sod., 2010). Fermentacija je bolj intenzivna pri nizkih temperaturah, ker imajo kvasovke optimalno rast pri nižjih temperaturah kot pa laktobacili. Poleg tega nizka temperatura med fermentacijo pozitivno vpliva na nastanek očetne kisline, kar lahko zavira rast kvasovk (Häggman in Salovaara, 2008b; Häggman in Salovaara, 2008a). Endogene kvasovke, prisotne v kislem testu, so dobro prilagojene na kislo okolje ter prispevajo k vzhajanju. Häggman in Salovaara sta raziskovala vpliv fermentacije na nastanek ogljikovega dioksida s *C. milleri* v združbi z *Lb. acidophilus* ali *Lb. brevis*. Ugotovila sta, da pri nizkih temperaturah med fermentacijo nastane več plina. Vzrok za to sta pripisala počasnejšemu zakisanju, saj so kvasovke krajši čas izpostavljene visoki kislosti ter nedisociranim kislinam. Da bi kompenzirali počasno produkcijo kislin, je potrebno fermentacijo podaljšati (Häggman in Salovaara, 2008b). *C. milleri* (ali *S. exiguus*) ima večjo sposobnost vzhajanja kot pa *S. cerevisiae*, saj je dobro odporna na kislo okolje in predvsem na nivo očetne kisline, medtem ko je *S. cerevisiae* občutljivejša (Gobbetti in sod., 2005).

Na razvoj kislosti vplivajo vsebnost pepela v moki, konsistenca testa, temperatura in čas fermentacije, kjer ima slednji največji vpliv (Katina in sod., 2004; Martínez-Anaya, 1996). Povečano produkcijo kislin lahko zaznamo pri višji temperaturi fermentacije, večji vsebnosti vode kislega testa in uporabi polnozrnate moke (Sadeghi in sod., 2007).

## **2.2.4 Nastanek aromatičnih spojin v kislih rženih kruhih**

### **2.2.4.1 Nastanek prekurzorjev arome**

Razgradnja beljakovin med fermentacijo kislega testa je eden ključnih pojavov, ki vplivajo na kvaliteto kruha (Gänzle in sod., 2008). Le v nekaj urah pride do razgradnje največjih rženih skladiščnih beljakovin – v alkoholu topnih sekalinov, pri čemer dobimo v vodi topne produkte hidrolize (Tuukkanen in sod., 2005; Gänzle in sod., 2008).

Proteolitične encime (proteaze) delimo v eksopolipeptidaze oz. peptidaze (aminopeptidaze, karboksipeptidaze ...), ki hidrolizirajo v bližini koncev peptidne verige, ter endopeptidaze oz. proteinaze (serinska, cisteinska, asparaginska, metalna), ki lahko hidrolizirajo celotno peptidno verigo. Največja proteinazna skupina v rži so asparaginske proteinaze, ki imajo sicer manjšo aktivnost, medtem ko so serinske proteinaze najaktivnejše (Tuukkanen in sod., 2005).

Proteoliza, ki se razvije med fermentacijo, poveča nastanek AK. Ta aktivnost je odvisna od moke ter endogene in eksogene mikroflore, ki se spreminja s sevom in ne z vrsto MO (Martínez-Anaya, 1996). Avtorji so neenotni, ko razpravljajo o tem, katere proteinaze so gonilna sila proteolize. Čeprav so sprva večji pomen pripisovali spontani mikroflori, predvsem MKB (Gobbetti in Corsetti, 1997; De Vuyst in sod., 2009; Gobbetti in sod., 1996), zadnje ugotovitve kažejo na večji pomen endogenih amilaz v žitu (Weckx in sod., 2010). Te učinkovito razgrajujejo sekuline pod kislimi pogoji v testu ter kažejo največjo aktivnost pri vrednosti pH pod 4,0. Ob tem pa razgradnja beljakovin ni bila opažena pri pH 6,1 (Tuukkanen in sod., 2005).

Sodelovanje MKB pri proteolizi je omejena predvsem pri rženi moki, za katero je značilna velika proteinazna aktivnost (Martínez-Anaya, 1996). To obrazloži tudi prisotnost večje količine AK v rženi moki v primerjavi s pšenično (Weckx in sod., 2010). Poleg tipa moke na nivo AK vplivajo tudi pH testa, konsistenca testa, čas in predvsem temperatura med fermentacijo ter poraba AK s fermentativnimi mikroorganizmi (Arendt in sod., 2007; Martínez-Anaya, 1996).

Opazno je povečanje AK ob fermentaciji kislega testa z MKB v nasprotju s fermentacijo s samimi kvasovkami, ko se njihova količina zmanjša (Lopponen, 2006). Kombinacija kvasovk in MKB pa vpliva na nastanek vmesne vrednosti skupnih AK (Stolz, 2003).

Na začetku fermentacije, ko so kvasovke v lag fazi rasti, je zaradi neprimerne pH njihova proteolitična aktivnost nizka, kar povzroči veliko potrebo po dušiku. Lag faza je pri MKB daljša – v prvih 4-ih urah razvijajo predvsem svojo metabolno aktivnost. Zato kopičenje AK opazimo šele po daljši fermentaciji (Martínez-Anaya, 2003; Katina in sod., 2004).

Proste AK so rastni faktorji za fermentativne mikroorganizme. Glutaminska kislina, izolevcin in valin so bistveni za rast *Lb. brevis* ssp. *Linderi* ali *Lb. plantarum*, medtem ko imajo arginin, metionin in levcin nanje le stimulativen učinek. Za rast kvasovk *S. cerevisiae* ali *S. exiguus* so pomembne skoraj vse AK z izjemo lizina, cisteina in histidina (Martínez-Anaya, 2003).

Proteaze laktobacilov so zelo aktivne in dajejo veliko več amino dušika, kot pa ga same porabijo. Poleg tega kvasovke izločajo nekatere AK (Maloney in Fox, 2003) predvsem zaradi spremembe v permeabilnosti membrane ali kot posledica pospešene avtolize, povzročene z osmotskim pritiskom med medijem in kvasno celico. Biomasa *S. cerevisiae* največkrat sprosti  $\gamma$ -aminobutirico kislino, prolin, valin, lizin, izolevcin, glicin ter alanin, kar ustreza približno 5 % AK v testu. Tudi biomase *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* ali *E.*

*faecium* izločajo AK predvsem v obliki glicina in alanina, ki dodajajo 1 – 2 % AK k tistim AK, dobljenim z moko. Prispevek kvasovk in MKB k vsebnosti peptidov v testu je večji od njunega prispevka k nastanku AK. Sprostitev AK kot posledica proteolitične aktivnosti kvasovk je zelo redka, je pa pogosta pri MKB in običajno zadošča njihovi potrebi po AK za rast (Martínez-Anaya, 2003; Gobbetti, 1998).

Pomen proteolize je zagotoviti substrate za mikrobo rast in pretvorbo AK v prekursorje aromatičnih spojin ter protimikrobnih metabolitov (Kozlinski in sod., 2008). Glede na tip prekursorja AK, osvobojenih med fermentacijo kislega testa, se lahko tvorijo različne hlapne spojine z MO ali pa med peko, kar vpliva na aromo pečenih izdelkov (Kozlinski in sod., 2008; Arendt in sod., 2007).

#### 2.2.4.2 Nastanek aromatičnih spojin

Kvasovke in MKB v kislem testu proizvedejo veliko število biogenih aromatičnih spojin. Proizvedena količina je odvisna od tega, katera kvasovka ali laktobakterija je prisotna, kar se lahko kaže tudi v šestkratni razliki koncentracije teh spojin, izmerjenih v kislem testu. Ugotovili so, da kar nekaj izmed njih nastane samo v mešani kulturi kvasovk in bakterij. Prav tako pa so opazili, da kvasovke proizvedejo večje količine nekaterih spojin (na primer propionske kisline) v prisotnosti bakterij, kot bi jih v primeru, če te ne bi bile prisotne (Maloney in Fox, 2003).

Rezultati različnih raziskav kažejo, da v kislih testih, fermentiranih zgolj z eno starter kulturo, nastane manj aromatičnih spojin kot v primeru mešanih kultur, vendar te razlike niso tako opazne v končnem proizvodu – kruhu (Meignen in sod., 2001). Prav tako so vsa kislata testa, pričeta s kombinacijo MKB, karakterizirana z uravnoveženim profilom aromatičnih spojin (kot rezultat hetero- in homofermentativnih hlapnih spojin) ter z njihovo zmanjšano maksimalno količino v primerjavi s tistimi, nastalimi ob uporabi MO v monokulturi (Damiani in sod., 1996). Primer združbe *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. plantarum* in *S. cerevisiae* daje uravnoveženo aromo pšeničnim kruhom. Pri tem nastane večji odstotek fermentacijskih produktov kvasovk. Porast arome v mešani kulturi je najverjetneje povezan s proteolitično aktivnostjo MKB (Corsetti in Settanni, 2007).

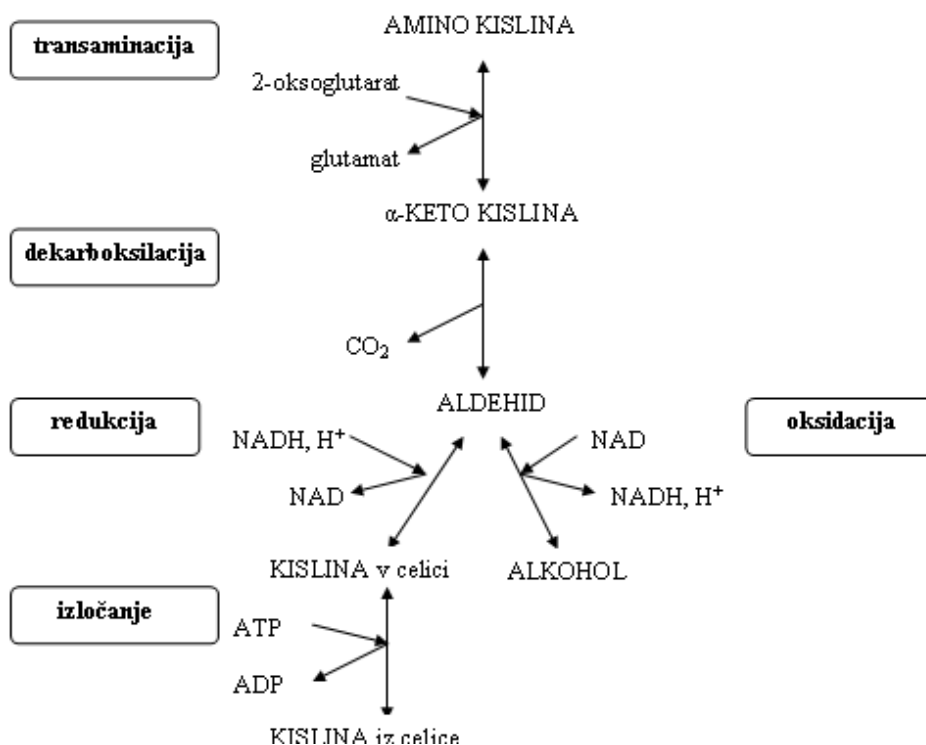
Meignen in sod. (2001) so v raziskavi dokazali, da MKB proizvedejo nižje koncentracije hlapnih spojin kot kvasovke. To so storili tako, da so količino nastalih aromatičnih spojin v kislem testu, narejenem s starterjem *Lb. brevis*, primerjali s tistimi, dobljenimi pri *S. cerevisiae*.

Aromatične spojine, ki nastanejo med fermentacijo kislega testa, lahko razdelimo na nehlapne in hlapne. Nehlapne vključujejo organske kisline, proizvedene s homo- in heterofermentativnimi MKB. Heterofermentativne MKB testo zakisajo in posledično znižajo pH, pomembno pa je tudi njihovo sodelovanje pri aromi testa. Med hlapne aromatične spojine uvrščamo alhokole, aldehide, ketone, estre in žveplo. Te nastanejo z biološkim in biokemičnim delovanjem med fermentacijo ter prispevajo k aromi (Salim-ur-Rehman in sod., 2006).



### 2.2.4.2.1 Hlapne spojine

Na nastanek arome rženih kruhov vplivajo predvsem biokemijske reakcije, kot so oksidacija lipidov, encimske reakcije s kvasovkami in/ali MKB ter toplotne reakcije (Heiniö in sod., 2003). Hlapne spojine se tvorijo iz prekursorjev, ki so prisotni v sestavinah, ali pa nastanejo z encimskimi ter mehanskimi reakcijami. Večina identificiranih spojin se tako razvije iz sladkorjev in AK (Kozlinski in sod., 2008).



Slika 2: Ehrlichova pot - katabolizem razvejanih AK, aromatičnih AK in AK, ki vsebujejo žveplo, vodi do nastanka kislin in alkoholov (Hazelwood in sod., 2008)

Pretvorba AK med fermentacijo kislega testa vključuje nastanek prekursorjev arome in aktivnih aromatičnih spojin preko transaminacijskih in/ali eliminacijskih reakcij (MKB) ter predvsem Ehrlichove poti (kvasovke, Slika 2) (De Vuyst in sod., 2009). Nastanek metabolitov iz AK s pomočjo kvasovk in MKB je odvisen tako od njihove vrste kot tudi seva (Vermeulen, 2007).

Kvasovke proizvedejo višje koncentracije hlapnih spojin kot MKB (Meignen in sod., 2001). Te so rezultat sekundarne fermentacije, ki pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* predstavlja okoli 5 % (Cho in Peterson, 2010). Med nastale aromatične spojine s pomočjo kvasovk najpogosteje uvrščamo izoalkohole, kot sta 2-metil-1-propanol, 2,3-metil-1-butanol ter mnoge druge. Tvorijo se preko Ehrlichove poti s transaminacijo določenih AK (razvejanje AK, aromatične AK ter AK, ki vsebujejo žveplo) v ustrezne α-ketokislina, ki jim sledi dekarboksilacija v aldehide (pretvorba α-ketoglutarata v glutamat) (De Vuyst in sod., 2009). V nadaljevanju se lahko pretvorijo z oksidacijo v kisline ali reducirajo v alkohole, kot je prikazano na Sliki 2 (Hansen in Schieberle, 2005; Martínez-Anaya, 1996). Na ta način nastanejo nekateri alkoholi (Martínez-Anaya, 1996), kot sta 3-metilbutanol (iz

levcina) in 2-feniletanol (iz fenilalanina), ki sta pomembni aromatični spojini sredice kruhov (Preglednica 4) (Grosch in Schieberle, 1997).

**Preglednica 4: Nekateri aminokislinski prekursorji pri nastanku alkoholov (Martínez-Anaya, 1996; 3: Salim-ur-Rehman in sod., 2006; Grosch in Schieberle, 1997)**

skupina AK	aminokislinski prekursorji	alkohol
razvejane aminokisliline	levcin	1-pentanol,2/3-metilbutanol
	valin	2-metil-1-propanol
	izolevcin	2/3-metilbutanal
aromatične aminokisliline	fenilalanin	2-feniletanol
	tirozin	tirozol
	triptofan	triptofol
aminokisliline, ki vsebujejo žveplo	metionin	metantiol

Poleg izoalkoholov in aldehydov je v kislih testih, inokuliranih s kvasovkami (rodovi *Saccharomyces* in *Hansenula genus*), pomemben tudi nastanek etil acetata ter etanola. Slednjega ne proizvajajo oksidativne kvasovke (*C. krusei* in *C. norvegensis*), ki pa lahko povečajo predvsem vsebnost heksanala, oktanala, nonanala in heksana (Damiani in sod., 1996).

Širok spekter hlapnih spojin nastaja tudi z MKB. Homofermentativne bakterije so prepoznavne predvsem po nastanku diacetila in drugih karbonilov (aldehidov in ketonov) (Martínez-Anaya, 1996), medtem ko je značilnost heterofermentativnih MKB velika proizvodnja etil acetata ter določenih alkoholov in aldehidov (Salim-ur-Rehman in sod., 2006; Damiani in sod., 1996).

Znanstveniki so ugotovili, da je vsebnost etil acetata višja v trdih rženih in pšeničnih kislih testih, fermentiranih s heterofermentativnimi MKB, kot pa v trdih rženih in pšeničnih kislih testih, ki so fermentirani s homofermentativnimi MKB. Prav tako se etil acetat v večjih količinah nahaja v tekočih kislih testih, ki so fermentirana s homofermentativnimi MKB, kot pa v trdih kislih testih. Na vsebnost etil acetata vpliva tudi tip moke. Njegova količina naraste v kislih testih, pripravljenih iz moke višjega tipa ter s heterofermentativno kulturo (Hansen in Schieberle, 2005). Enak trend je bil opažen tudi pri nastanku heksil acetata (Corsetti in Settanni, 2007).

Med fermentacijo proteoliza priskrbi substrate za mikrobnó pretvorbo AK v hlapne spojine (kot je 2,3-butandion), ki neposredno vplivajo na arómo sredice kruha, kot tudi prekursorje arom. Iz njih se s toplotnimi reakcijami, sproženimi med peko, tvorijo aromatične spojine, ki dajejo tipično arómo skorji kruha (Kirchhoff in Schieberle, 2001; Corsetti in Settanni, 2007; Cho Hee in Peterson, 2010; Arendt in sod., 2007). Fermentacija kislega testa in peka sta tako glavna vira arome v kruhu, zaradi česar sta oba koraka esencialna (Kozlinski in sod., 2008).

Glede na tip prekursorja AK, nastale med fermentacijo kislega testa, se med termalnimi reakcijami lahko tvorijo različne hlapne kot tudi nehlapne spojine, kar vpliva na arómo pečenih izdelkov (Corsetti in Settanni, 2007; Cho Hee in Peterson, 2010). K njeni tovrbi

prispevajo predvsem neencimske: Maillardova reakcija, karamelizacija ter Streckerjeva razgradnja (Cho Hee in Peterson, 2010).

Karamelizacija sladkorjev na površini kruha daje obarvane spojine, ki imajo kisel ter grenak okus, in karbonilne spojine, kot so aldehidi in ketoni, ki prispevajo k različnim vonjem. Pri aromi sodelujejo tudi z interakcijami med različnimi AK ter sladkorji, ki so značilne za Maillardovo reakcijo, kar vodi do nastanka rjavih pigmentov ter hlapnih spojin (Cho Hee in Peterson, 2010). Streckerjeva razgradnja karbonilnih spojin prav tako poteka med peko. Potrebne spojine, ki so nastale med Maillardovo reakcijo, torej aldehide, ki so rezultat tudi že prej omenjene Ehrlichove poti (Corsetti in Settanni, 2007; Cho Hee in Peterson, 2010; Bianchi in sod., 2008). Ker so kemijske strukture nastalih aldehydov po obeh poteh identične, jih težko kvantitativno ločimo (Hansen in Schieberle, 2005).

Produkti Maillardove reakcije ter Streckerjeve razgradnje vodijo do nastanka pomembnih aromatičnih spojin, ki vključujejo pirazine, pirole in mnoge druge. Nekateri izmed njih imajo značilno aromo po pečenju in pokovki (Cho Hee in Peterson, 2010). Najpomembnejši prekursor za nastanek arome po pečenju je ornitin (Corsetti in Settanni, 2007). Dobimo ga lahko iz kvasne biomase ali pa metabolizma arginina z MKB (primer je *Lb. pontis* in *Lb. sanfranciscensis* preko ADI poti) (Corsetti in Settanni, 2007), iz katerega se med peko tvori 2-acetil-1-pirolin (Gänzle in sod., 2007; Thiele in sod., 2002).

Posledica proteolize, ki nastopi med fermentacijo kislega testa, je za 55 – 90 % (pšenična kislina) povečana količina AK (Katina in sod., 2004), njihova vsebnost med peko zmanjša za 10 – 20 % začetne vrednosti (Arendt in sod., 2007; Gobbetti in sod., 1996). Pomembne AK so predvsem ornitin, levcin in fenilalanin (Arendt in sod., 2007). Njihov dodatek testu ali višja vsebnost zaradi proteolize (Cho Hee in Peterson, 2010) poveča njihovo pretvorbo v aromatične spojine (Corsetti in Settanni, 2007), pri čemer nastane tudi močnejša barva skorje kruha, ne vpliva pa na njegov okus (Cho Hee in Peterson, 2010). Tako levcin, ki reagira s sladkorji, daje aromo svežega kruha, pri reakciji prolina z reducirajočim sladkorjem pa nastane aroma, ki spominja na krekerje (Cho Hee in Peterson, 2010).

#### 2.2.4.2.2 Nehlapne spojine

Fermentacija kislega testa je osnovana na alkoholni in mlečnokislinski fermentaciji, pri čemer nastajata tako mlečna kot tudi očetna kislina s pomočjo MKB (Martínez-Anaya, 1996). Nizka, vendar že pomembna količina kislin je prisotna v moki, ki pa med fermentacijo naraste na več kot 3 g/kg (Hansen in Schieberle, 2005).

Komponente, kot so organske kisline ali etanol, lahko vplivajo na zaznavo drugih aromatičnih spojin (Martínez-Anaya, 1996). Za končno aromo izdelka je zelo pomembno predvsem razmerje med mlečno in očetno kislino (Salim-ur-Rehman in sod., 2006), ki je definirano kot fermentacijski kvocient (FQ) (Corsetti in Settanni, 2007). Ta je eden najpogosteje uporabljenih parametrov za povezavo med zakisanim in aromo. Splošno pravilo pravi, da mora biti nižji od 4, kar pomeni sintezo velikih količin očetne kisline. Zanj skrbi predvsem sevi obligatorno in fakultativno heterofermentativnih MKB

(Kozlinski in sod., 2008). Fakultativno heterofermentativne MKB z redukcijo fruktoze proizvajajo manitol (daje sladek okus) in poleg povečane tvorbe ATP povzročijo še naraščanje količine očetne kisline (De Vuyst, 2002).

Očetna kislina, ki v majhnih količinah deluje kot ojačevalec okusa, vpliva na potrošnikovo dovzetnost za druge aromatične spojine, po drugi strani pa se pri visokih koncentracijah poveča oster okus (Martínez-Anaya, 1996; Savić in sod., 2006). Učinek je odvisen od koncentracije, zato ima sprememba le-te pomembnejši vpliv na aromo, kot pa jo imajo spremembe koncentracije mlečne kisline. Kljub temu senzoričnih razlik v kislosti ne moremo pripisati zgolj očetni kislini, saj so za te spremembe odgovorne tudi druge hlapne spojine in/ali interakcije med obema kislinama (Martínez-Anaya, 1996).

Za ustrezne senzorične lastnosti kislega testa mora biti fermentacijski kvocient (FQ) znotraj območja 2,0 – 2,7. To zmanjšanje FQ lahko povzročita *Lb. sanfranciscensis* ter *Lb. brevis* ter povečanje manitola v združbi s kvasovko, do katerega pride zaradi vzdrževanja redoks ravnotežja (De Vuyst, 2002). Optimalen FQ kislega testa iz polnozrnate moke tako pade v območje 1,5 – 4 (Corsetti in Settanni, 2007). Višja vsebnost kislin v rženem kruhu je povezana tudi z višjo pufrno kapaciteto ržene moke, ki ima visok odstotek pepela (Gobbetti in sod., 1995).

Na nastanek kislin v kislem testu vplivajo: tip moke (vsebnost pepela), temperatura in čas fermentacije, vrste MKB ter dodatek fruktoze (Hansen in Schieberle, 2005; Katina in sod., 2004). Količina mlečne in očetne kisline, nastale med fermentacijo, je višja pri polnozrnati moki. Vsebnost mlečne kisline naraste s temperaturo, medtem ko na nastanek očetne kisline sprememba temperature ne vpliva. Količina očetne kisline naraste z uporabo heterofermentativnih kultur in dodatkom fruktoze kot akceptorja vodika (Hansen in Schieberle, 2005). Postopek sinteze počasneje poteka v mešanih kulturah s kvasovkami kot pa v monokulturah MKB (Salim-ur-Rehman in sod., 2006).

### 2.2.5 Aroma kislih rženih kruhov

Sestavine, uporabljene za izdelavo kislega kruha (predvsem moka), morajo biti podvržene določenim spremembam, zaradi katerih nastanejo značilne arome. Ržena moka že vsebuje manjšo količino hlapnih spojin ter njenih prekurzorjev, ki prestanejo s peko in lahko prispevajo k celotni aromi kruha (Martínez-Anaya, 1996; Hansen in Schieberle, 2005). Končna aroma je rezultat encimskih reakcij, ki potekajo med fermentacijo s kvasovkami in/ali MKB, ki jim sledijo termične reakcije, povzročene med peko (Kirchhoff in Schieberle, 2001).

Čeprav ržena moka sprva ne vsebuje veliko topnih ogljikovih hidratov (Corsetti in Settanni, 2007), se njihova količina med fermentacijo poveča zaradi visoke aktivnosti endogenih rženih žitnih encimov (Horszwald in sod., 2009). Majhni produkti hidrolize rženih beljakovin lahko služijo kot hranila za mikroorganizme, majhni peptidi in AK pa delujejo kot prekurzorji, ki se med fermentacijo ali peko pretvorijo v sestavine arome (Tuukkanen in sod., 2005). Kisla testa, fermentirana z aktivnostjo mikroorganizmov, imajo večjo vsebnost hlapnih spojin kot kemijsko zakisana (Vermeulen, 2007). Pri slednjih

nastanejo večje količine heksanala in etil acetata (Martínez-Anaya, 1996), ki dajejo sredicam kruhov nezaželeno aromo po travi in žitaricah (Kirchhoff in Schieberle, 2002), zaradi česar niso dobro senzorično ocenjeni (Salim-ur-Rehman in sod., 2007).

V kislih testih sta Kirchhoff in Schieberle (2002) odkrila 35 aktivnih spojin arome. Z uporabo tehnike AEDA ter z določitvijo FD v škrobu in vodi sta napovedala možnost njihovega prispevka k aromi. To so spojine s faktorjem FD >100, med katere štejemo 3-metilbutanal, vanilin, 3-metilbutanojsko kislino, metional, (E,E)-2,4-dekadienal, 2,3-butandion ter očetno kislino (Preglednica 5) (Kirchhoff in Schieberle, 2002; Hansen in Schieberle, 2005).

**Preglednica 5: Koncentracije, prag zaznave in OAV aktivnih hlapnih vonjav v rženem kisle testu (Kirchhoff in Schieberle, 2002)**

vrsta hlapne spojine	koncentracija (µg/kg na suho težo)	prag zaznave (µg/kg v škrobu)	OAV <sup>a</sup> (škrob)	prag zaznave (µg/kg v vodi)	OAV <sup>a</sup> (voda)
očetna kislina	3140000	31140	101	22000	143
butanojska kislina	21800	100	218	1000	22
3-metilbutanal	899	32	28	0,4	2248
vanilin	2790	4,6	607	25	112
3-metilbutanojska kislina	2580	6	430	740	3,5
2,3-butandion	744	6,5	114	15	50
(E,E)-2,4-dekadienal	78	2,7	29	0,2	390
Metional	65	0,27	241	1,8	36
(E)-β-damascenone	0,9	0,2	4,5	0,004	225

<sup>a</sup>=OAV izračunamo tako, da delimo koncentracijo aromatične spojine v izdelku s koncentracijo njenega praga zaznave

Predstavljeni podatki nam še ne dajejo natančnih ugotovitev, katere spojine morajo biti prisotne v kislem testu, da bomo dobili kruh z boljšo aromo po peki. Iz njih lahko razberemo le, kateri del aromatičnih spojin izvira iz moke ter kateri se tvori med fermentacijo testa in/ali kasneje med peko (Preglednica 6).

Fermentacija je bistvena predvsem za nastanek arome v sredici kruha, medtem ko peka vpliva na tipično aromo skorje (Corsetti in Settanni, 2007). Kirchhoff in Schieberle (2001) sta z isto metodo kot pri kislih testih določila metilbutanal, (E)-2-nonenal, (E,E)-2,4-dekadienal, heksanal, očetno kislino, fenilacetaldehid, metional, vanilin, 2,3-butandion, 3-hidroksi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon in 2- ter 3-metilbutanojska kislino za glavne aromatične spojine, ki prispevajo k značilni intenzivni aromi sredice rženih kislih kruhov (Kirchhoff in Schieberle, 2001; Salim-ur-Rehman in sod., 2006). Poleg naštetih spojin nekateri avtorji kot pomembne aromatične spojine omenjajo še propanon, benzil alkohol in 2-feniletanol. Med omenjenimi spojinami lahko v sredicah pšeničnih kruhov najdemo 3-metilbutanojsko kislino, (E)-2-nonenal, 2-feniletanol ter 2,3-butandion (Salim-ur-Rehman in sod., 2006). Aroma rži je blaga (Tuukkanen in sod., 2005) in se okrepi med njeno obdelavo (Heiniö in sod., 2003).

Aroma kruha se z ohlajanjem delno izgublja skozi za arome propustno skorjo (Kozlinski in sod., 2008). Med ohlajanjem pride do oksidacijskih reakcij, pri katerih nastanejo hlapne spojine, ki med ohlajanjem izhlapijo (Heiniö in sod., 2003). Pri ponovnem segrevanju se aroma kruha delno obnovi, zaradi česar predpostavljamo, da del aromatičnih spojin ostane v kruhu ujet (Kozlinski in sod., 2008). Do velike izgube arom pride tudi med shranjevanjem zaradi staranja in evaporacijskih sprememb (Plessas in sod., 2008).

**Preglednica 6: Hlapne spojine identificirane v različnih stopnjah priprave kislih rženih kruhov (1: Kirchhoff in Schieberle, 2002; 2: Hansen in Schieberle, 2005; 3. Grosch in Schieberle, 1997; 4: Kirchhoff in Schieberle, 2001; 5: Cho in Peterson, 2010)**

hlapna spojina	tip arome	mesto vzorčenja			
		RŽ	KISLO TESTO	SREDICA KRUHA	SKORJA KRUHA
2,3-butanedion	maslo		x <sup>1,2</sup>	x <sup>2,4</sup>	x <sup>5</sup>
heksanal	trava	x <sup>1</sup>	x <sup>2</sup>	x <sup>2,4</sup>	
1-okten-3-on	gobe		x <sup>2</sup>		x <sup>5</sup>
metional	kuhan krompir	x <sup>1</sup>	x <sup>1</sup>	x <sup>2,3,4</sup>	x <sup>3,5</sup>
(E)-2-nonenal	trava, maščobe	x <sup>1</sup>		x <sup>2,3,4</sup>	x <sup>3,5</sup>
(E,E)-2,4-nonadienal	maščobe, vosek			x <sup>4</sup>	
2-etil-3,5-dimetilpirazin					x <sup>3,5</sup>
(E,E)-2,4-dekadienal	maščobe, vosek		x <sup>1</sup>	x <sup>2,3</sup>	x <sup>3</sup>
4,5-epoksi-(E)-2-dekanal	metalnen		x <sup>2</sup>		
3-hidroksi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon	začinjen /začimbe		x <sup>2</sup>	x <sup>3,4</sup>	x <sup>3</sup>
4-hidroksi-2,5-dimetil-3(2H)-furanon					x <sup>3</sup>
2- in 3-metilbutanal	grenki mandlji, trava		x <sup>1,2</sup>	x <sup>2,3,4</sup>	x <sup>3,5</sup>
3-hidroksi-5-etil-4-metil-2(5H)-furanon	pekoč				x <sup>3</sup>
3-(metiltio)-propanol	kuhan krompir		x <sup>2</sup>		
vanilin	sladek, med		x <sup>1,2</sup>	x <sup>2,4</sup>	
fenilacetaldehid	med			x <sup>2,3,4</sup>	x <sup>3,5</sup>
ocetna kislina	ocetni		x <sup>1,2</sup>	x <sup>2,3,4</sup>	x <sup>3</sup>
2-/3-metilbutanojska kislina	sladko		x <sup>1</sup>	x <sup>2,3,4</sup>	x <sup>3</sup>
2,3-butanedion (diacetil)	maslen		x <sup>2</sup>	x <sup>2</sup>	

### 2.3 DIACETIL

Med fermentacijo žitaric se tvorijo različne hlapne spojine, ki prispevajo h kompleksni mešanici okusov v različnih izdelkih (Kohajdović in Karovičova, 2007). Ena izmed teh je diacetil ali 2,3-butanedion, ki se lahko tvori tako z MKB kot tudi s kvasovkami (Hansen in Schieberle, 2005). Ta karbonilna spojina (Gobbetti, 1998) ima močno aromo po maslu, ki

je v majhnih koncentracijah bistvena v različnih mlečnih proizvodih, kot so maslo, pinjenec, sveži sir (Hugenholtz in sod., 2000), sladoled in skuta (Quintas in sod., 2008), pomembno pa prispeva tudi k aromi rženih kislih kruhov. Pri proizvodnji piva (Hugenholtz in sod., 2000), sokov citrusov ter destiliranih alkoholnih pijačah pa je diacetil najbolj nezaželena aroma (Sandine in Elliker, 1970).

Ker je diacetil spojina, ki se nahaja v veliko živilskih proizvodih ter se tvori s podobnimi MO, lahko njeno biosintezo nastanka do določene mere prenesemo v drugo okolje. V nadaljevanju smo se osredotočili predvsem na mlečne izdelke in pivo, saj o nastanku diacetila v kislih testih ter kruhah ni veliko literature.

### 2.3.1 Nastanek diacetila z MKB

Že dolgo je poznano, da pod določenimi pogoji MKB tvorijo drugačne metabolite, med katere spadata tudi diacetil in acetoin (Hugenholtz in Kleerebenzem, 1999). Oba sta si kemijsko zelo podobna in se v majhnih količinah pojavljata kot stranski proizvod med mlečno-kislinsko fermentacijo preko  $\alpha$ -acetolaktata (Swindell in sod., 1996; Hugenholtz in sod., 2000). Medtem ko se acetoin tvori z aktivnostjo  $\alpha$ -acetolaktat dekarboksilaze, je diacetil rezultat neencimske oksidativne dekarboksilacije (Nadal in sod., 2009).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovarieteta *diacetylactis* (Quintas in sod., 2008) se široko uporablja v živilski industriji kot starter kultura mlečnih izdelkov (García-Quintáns in sod., 2008). Ta pri mlečni-kislinski fermentaciji zaradi uravnoveženega redoks potenciala pretvori sladkorje (glukoza in laktoza) preko piruvata v mlečno kislino. Medtem ko se pri bolj oksidiranem substratu, kot je citronska kislina, tok piruvata preusmeri preko nastanka  $\alpha$ -acetolaktata (Hugenholtz in sod., 2000; Nadal in sod., 2009), ki se istočasno pretvarja v C4 aromatični spojini acetoin in diacetil (García-Quintáns in sod., 2008) ter CO<sub>2</sub>.

Do preusmeritve toka citrata pride, ker pri pretvorbi glukoze v laktat nastajata 2 mola ATP na 1 mol metabolizirane glukoze. Pri tem se lahko NAD<sup>+</sup>, ki se porabi v začetnih stopnjah poti, regenerira med pretvorbo piruvata v laktat ter tako vzdrži redoks potencial. Medtem pa se ob prisotnosti glukoze in citrata iz vsakega mola slednjega proizvede zgolj 1 mol piruvata, ne da bi pri tem regeneriral z NADH. To povzroči znotrajcelični presežek piruvata, ki je zato izpeljan v sintezo  $\alpha$ -acetolaktata ter posledično aromatičnih spojin.

Domnevajo, da te bakterije proizvajajo C4 spojine samo zato, da bi izločile količine piruvata, ki se tvorijo pod že omenjenimi rastnimi pogoji ter pri nizkem pH. Ti pogoji so ugodni za delovanje  $\alpha$ -acetolaktat sintaze (optimum 6,0) (García-Quintáns in sod., 2008), ki katalizira kondenzacijo dveh molekul piruvata, pri čemer nastane  $\alpha$ -acetolaktat. Ker je ta intermediat nestabilen, se takoj dekarboksilira v acetoin z acetolaktat dekarboksilazo ali z neencimsko dekarboksilacijo (ob prisotnosti kisika) v diacetil. Nastale spojine se lahko izločijo, ne da bi pri tem potrebovale specifičen transporter (Quintas in sod., 2008; Goupy in sod., 2000).

Ravnotežje med končnimi produkti citrata (acetoin, diacetil...) je odvisno od redoks stanja celice (Quintas in sod., 2008). Diacetil se lahko pretvori v acetoin, ki se dalje reducira v

2,3-butanediol. Redukcija diacetila v acetoin je ireverzibilna, medtem ko je redukcija acetoina v 2,3-butandiol reverzibilna. Pretvorbo 2,3-butanediola v acetoin katalizira 2,3-butanediol dehidrogenaza. Aktivnost diacetil reductaze pa je odvisna od seva MKB (García-Quintáns in sod., 2008).

Ob odsotnosti citrata se kopičijo zanemarljive količine aromatičnih spojin. Acetoin in diacetil se akumulirata pozno v fermentaciji, kar sovпада z obdobjem, ko se je pričel katabolizem citrata. Poleg tega je aerobna fermentacija predvsem v prid akumulaciji diacetila in acetoina v skladu z zgoraj omenjenim oksidativnim metabolizmom citrata (Goupry in sod., 2000).

### 2.3.2 Tvorba diacetila s kvasovkami

Medtem ko je nastanek diacetila pri mlečnih izdelkih zaželen, pri pivu povzroča slabo aromo. Ta nastane pri proizvodnji kvasovk kot posledica pomanjkanja hranil med fazo razmnoževanja oz. log fazo, ko kvasne celice potrebujejo dušikove spojine za tvorbo kvasnih AK, beljakovin ter drugih celičnih spojin. Če jih v mediju ni dovolj v obliki, ki bi jo lahko asimilirale, bodo uporabile kombinacijo metabolnih poti za sintezo ogljikovih hidratov in sintezo beljakovin (Bassit in sod., 1995).

AK, proizvedeni s kvasovkami, sta izolevcin in valin, ki nastaneta preko intermediata acetolaktata. Večina acetolaktata se pretvori v valin, del pa preide iz celice v pivo, kjer se dalje pretvori v diacetil s kemično (ne encimsko) oksidacijo. Ta korak je odvisen od temperature ter kvasnih encimov. Pri 10 °C kemična oksidacija poteka zelo počasi, narasla koncentracija valina pa inhibira encim  $\alpha$ -acetolaktat in posledično nastanek diacetila (Eßlinger in Narziß, 2003).

Ko je fermentacija upočasnjena in kvasovke vstopijo v stacionarno fazo rasti, pravimo, da je pivo podvrženo fazi zorenja. V tej fazi uporabijo diacetil, ki so ga proizvedle, ter ga encimsko z diacetil reductazo pretvorijo v acetoin in nato v 2,3-butanediol. Redukcija je počasnejša pri nizkih temperaturah (Pastore, 2007).

### 2.3.3 Vloga diacetila v kruhu

Vsebnost diacetila je višja v kisljih testih, ki so fermentirana s homofermentativnimi MKB (izjema *Lb. delbruecki* subsp. *delbruecki*). Njegova vsebnost se močno poveča tudi v kisljih testih, ki so jim bile dodane kvasovke (Hansen in Schieberle, 2005). Večjo količino diacetila so zaznali tudi pri kemijsko zakisanih kruhkih (Martínez-Anaya, 1996).

Diacetil je pomembna aromatična spojina, katere koncentracija v rženi moki znaša okoli 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Njegova vsebnost med fermentacijo kislega testa naraste tudi do 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Pri izdelavi kruha kislo testo razredčimo z moko, kar zniža koncentracijo diacetila v celotni mešanici (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Pri ponovni fermentaciji se zopet zviša in lahko celo preseže koncentracijo v primerjavi z prvo fermentacijo (750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Med peko se vsebnost diacetila zniža za približno 40 % in s končno vrednostjo 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  prispeva k značilni



aromi rženih kislih kruhov. Prag zaznave diacetila je okoli 7 µg/kg, iz česar je dobro razviden njegov prispevek h karakteristični aromi po maslu v vseh fazah izdelave kislih rženih kruhov (Hansen in Schieberle, 2005).

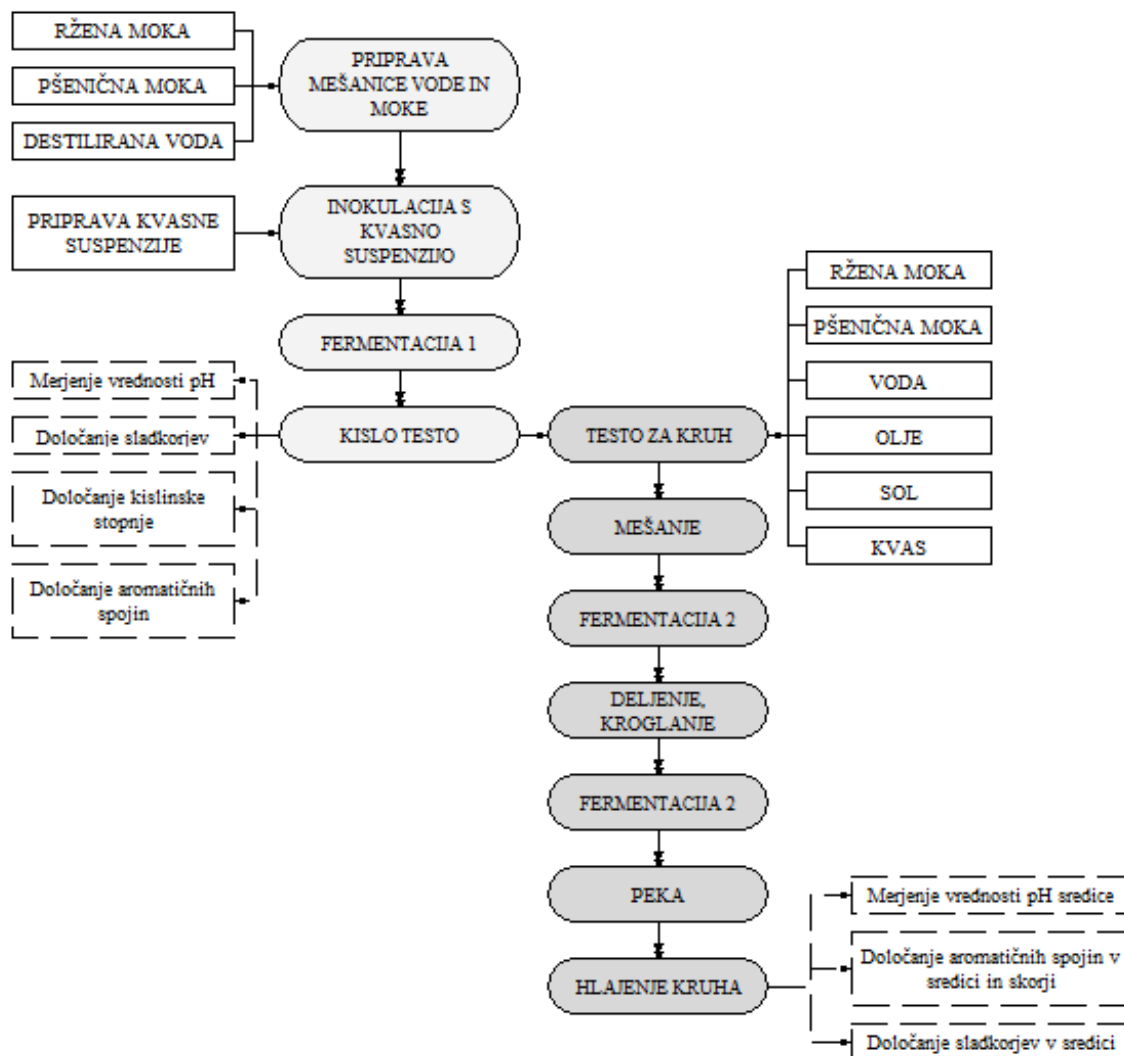
Diacetil največ prispeva k aromi sredice rženega kruha. Kirchhoff in Schieberle (2002) sta z uporabo tehnike AEDA ter z določitvijo FD v škrobu in v vodi potrdila njegov pomen pri rženih kislih testih.

Michalska in sod. (2002) so določali nastanek hlapnih spojin, kot sta diacetil in acetoin v kislih testih, z dodatkom različnih mešanic sevov MKB. Vsebnost acetoina je bila najvišja pri fermentaciji ržene moke z dodatkom mešanice sevov *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in *Lb. plantarum*, kot tudi pri mešanici z dodanima sevoma *Lb. plantarum* ter eno od vrst *Lb. casei*, pri katerih so izmerili koncentraciji 1,032 mg/kg ter 1,066 mg/kg po 72 urah fermentacije. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da *Lb. plantarum* proizvaja veliko količino acetoina. To je posledica pretvorbe piruvata v acetoin (namesto nastanka kislih proizvodov) zaradi vzdrževanja pH homeostaze. Ker je prag zaznave slednjega nizek (0,75 mg/kg), pomembno prispeva k aromi sredice rženih zakisanih kruhov (Michalska in sod., 2002), čeprav nekateri avtorji navajajo, da acetoin ne prispeva veliko k aromi (Martínez-Anaya, 1996). Mešanica sevov, ki je dala najvišje vrednosti diacetila, je sestavljena iz sevov: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ter *Lb. plantarum*. Najvišja vrednost je bila dosežena že po 48 urah fermentacije (1,053 mg/kg), a se je pri 72 urah nekoliko znižala (0,662 mg/kg) (Michalska in sod., 2002).

*S. cerevisiae* je med kvasovkami najpogosteje omenjena kot tista, ki prispeva k nastanku diacetila v kruhu, medtem ko pri nastanku diacetila s pomočjo MKB omenjajo predvsem seve *Lb. plantarum*, *Lb. alimentarius*, *Lb. farciminis*, *Lb. acidophilus*, (Damiani in sod., 1996; Christensen in Pederson, 1958) *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Pediococcus cerevisiae* ter *Streptococcus faecalis*. Nekateri izmed njih proizvajajo diacetil tudi v odsotnosti citrata (Christensen in Pederson, 1958).

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIALI IN NAČRT POSKUSA



Slika 3: Shema priprave rženih kislih kruhov

##### 3.1.1 Priprava kislega testa in glavnega zamesa

- ržena moka tip 1250 (Žito)
- pšenična moka tip 500 (Žito)
- liofilizirane kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (saf-instant, Lesafree)
- sončnično olje (Gea)
- sol, fino mleta (Droga Kolinska)
- bidestilirana voda
- voda (temperatura  $\sim 30 \pm 1$  °C)

### 3.1.2 Reagenti in raztopine

- PBS pufer (Oxoid)
- NaOH (Merck) za pripravo 0,1 M raztopine NaOH
- etanol (60 %, Merck)
- HMDS=heksametildisilazan (čistost > 99 %, Fluka)
- tetrafluoroocetna kislina (čistost > 99 %, Riedel-de Haën)
- reagent R1: V 100 mL bučko smo zatehtali 2 g 99 % hidroksilamina hidroklorida (Sigma) ter jo do oznake dopolnili z 99,5 % piridinom (Fluka).
- interni standard 4-metil-2-pentanol: V 25 mL bučko smo zatehtali 30 mg 4-metil-2-pentanol ter jo dopolnili do oznake z bi-destilirano vodo.

### 3.1.3 Aparature in pribor

- tehtnica (Soehnle, 2000 g)
- tehtnica (Mettler toledo, 310 g)
- mešalnik (Diosna, 15 kg)
- termometer (Toledo)
- vzhajalna komora (Gostol)
- peč (Gostol)
- bioreaktor (Chemap CF 2000, 3,5 l)
- gorilnik
- centrifuga (Eppendorf)
- termostatski blok (Vlm)
- pipeta 5 µl, 10 µl, 1000 µl in 5 mL (Transferpette)
- pH-meter: Mettler Toledo DL50 Graphix
- plinski kromatograf: 789N (Agilent, ZDA)
- vakumski izparjevalnik (Genevac HT- 4, series II system)

## 3.2 METODE DELA

Kruh smo pripravili z indirektnim načinom zamesa na Katedri za tehnologije, prehrano in vino na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Fermentacijo kislega testa smo izvedli v 3,5 L bioreaktorju na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil ter ga nato dodali glavnemu zamesu.

Za pripravo slepega vzorca kislega testa nismo uporabili, ampak smo njegov del nadomestili z ustrezno količino mešanice mok in vode, ki jih predhodno nismo fermentirali.

### 3.2.1 Priprava kislega testa

#### 3.2.1.1 Zatehta

Iz moke in vode smo pripravili mešanico, ki je fermentirana s kvasovkami ter MKB (De Vuyst in Vancanneyt, 2007). Bakterije lahko izvirajo iz naravno kontaminirane moke in

ostalnih surovin, saj niso podvržene toplotni sterilizaciji (Corsetti in Settanni, 2007). Dodatek kvasovk vpliva na sestavo spontane mikroflore in tako tudi na fermentacijo.

Naprave/Aparature:

- tehtnica (Soehnle, 2000g)

Uporabljen material:

- dve 1000-mL plastični čaši
- steklena palčka, žlica
- lij

Izvedba metode:

V dveh 1000-mL plastičnih čašah smo posebej zatehtali mešanico 600 g moke ter 1400 g bidestilirane vode. Mešanico moke je sestavljalo 120 g ržene moke tip 1250 in 480 g pšenične moke tip 500. Moki smo ob konstantnem mešanju s stekleno palčko počasi dodajali bidestilirano vodo. Nastale grudice smo zdrobili s pomočjo žlice. Z uporabo lija smo vse prenesli v predhodno steriliziran 3,5-L bioreaktor.

**Preglednica 7: Receptura za izdelavo kislega testa**

sestavine	masa (g)
moka	600
- ržena moka	120
- pšenična moka	480
bi-destilirana voda	1400

3.2.1.2 Priprava kvasne suspenzije

Aktivne liofilizirane kvasovke vsebujejo približno 8 % vode, kar ne zadošča za aktiven metabolizem, zato jih je potrebno pred inokulacijo rehidrirati. Temperatura, sestava medija in čas rehidracije so pogoji, ki vplivajo na živost kvasnih celic ter njihovo fiziološko stanje. Spremenijo lahko tudi njihovo fermentacijsko obnašanje, predvsem pa dolžino lag faze. Ta je pomembna, saj imajo pri dolgi lag fazi avtohtone kvasovke priložnost, da prevladajo. Večina tehnik priprave liofilizirane kvasne suspenzije priporoča 30-minutno rehidracijo pri temperaturi 35 – 40 °C (Soubeyrand in sod., 2006; Ferrarini in sod., 2007).

Naprave/Aparature:

- tehtnica (Mettler toledo, 310g)

Uporabljen material:

- PBS pufer (Oxoid)
- liofilizirane kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (saf-instant, Lesafree)
- 100-mL čaša
- steklena palčka

Izvedba metode:

V 100-mL stekleno čašo smo zatehtali 5 g liofiliziranih kvasovk ter prilili 50 mL PBS pufra (pH = 7). Kvasovke smo rehidrirali 30 minut ter vmes suspenzijo večkrat premešali s stekleno palčko.

### 3.2.1.3 Inokulacija mešanice s kvasno suspenzijo

Mešanici moke in vode smo dodajali različne količine kvasovk *S. cerevisiae*. Katina (2005) navaja, da se z dodatkom teh kvasovk poveča tvorba hlapnih aromatičnih spojin, ki pomembno vplivajo na aromo.

Naprave/aparature:

- bioreaktor (Chemap CF 2000; 3,5 l)
- 1000 µl in 5 mL pipeti (Transferpette)
- gorilnik

Izvedba metode:

Poizkus smo izvedli na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. V bioreaktorju smo opravili tri različne fermentacijske poskuse. Kot kontrolo smo uporabili mešanico moke in bidestilirane vode brez dodatka kvasne suspenzije. V ostalih dveh fermentacijskih poskusih pa smo z pipeto mešanici v bioreaktorju aseptično dodali dve različni količini kvasne suspenzije: 0,13 mL in 1,30 mL na 2000 g mešanice moke in bidestilirane vode.

### 3.2.1.4 Fermentacija

Fermentacija kislega testa je edinstvena simbioza med MKB ter kvasovkami. Interakcije med njimi so pomembne za metabolno aktivnost testa (Sadeghi, 2008, Kozlinski in sod., 2008) in prispevajo k nastanku aromatičnih spojin (Van der Meulen in sod., 2007).

Naprave/Aparature:

- bioreaktor (Chemap CF 2000, 3,5 L)

Uporabljen material:

- predhodno pripravljena mešanica moke in bidestilirane vode
- predhodno pripravljena kvasna suspenzija
- dve 500-mL stekleni čaši

Izvedba metode:

Zmes ržene (tip 1250) ter pšenične moke (tip 500), bidestilirane vode (in kvasne suspenzije) smo fermentirali v bioreaktorju ob konstantnem mešanju  $100 \pm 2$  vrtljajev/minuto pri temperaturi  $30 \pm 2$  °C do vrednosti pH~4. Med fermentacijo je računalnik na vsake 3 minute beležil spremembe pH in pO<sub>2</sub> vrednosti s pomočjo pH ter pO<sub>2</sub> elektrode. Tako dobljeno brozgo smo po doseženem željenem pH iz bioreaktorja

pretočili v dve 500-mL čaši. Vsak poskus je potekal v treh paralelkah. Rezultate smo podali kot povprečne vrednosti.

#### Poskusi:

1. brez dodatka kvasne suspenzije
2. z dodatkom 0,13 mL kvasne suspenzije na 2000 g mešanice moke in bidestilirane vode
3. z dodatkom 1,13 mL kvasne suspenzije na 2000 g mešanice moke in bidestilirane vode

### **3.2.2 Glavni zames**

Ržene kruhe iz kislega testa smo zamesili iz dela predhodno fermentiranega kislega testa (z ali brez dodatka kvasne suspenzije), ki smo mu smo dodali svežo moko in vodo ter ostale sestavine, navedene po recepturi v preglednici 9.

#### Naprave/Aparature:

- mešalnik (Diosna, 15 kg)
- termometer (Toledo)
- vzhajalna komora (Gostol)
- peč (Gostol)

#### Uporabljen material:

- kislo testo
- sestavine, navedene v preglednici 9
- steklene čaše različnih velikosti
- modelna košarica
- nož

#### Tehnološki postopek:

V steklene čaše smo natehtali sestavine po recepturi, navedeni v preglednici 9, ter vse skupaj prenesli v mešalnik. Pripravljeno zmes smo najprej mešali 3 minute pri nizki hitrosti, nato pa še 6 minut pri najvišji.

#### **Preglednica 8: Receptura za zames rženega kislega kruha**

sestavine	količina
moka	1000 g
- ržena moka	150 g
- pšenična moka	850 g
voda	600 mL
olje	25 mL
sol	20 g
kvas	5 g

Pripravili smo tudi rženi kruh (slepi vzorec) brez kislega testa, pri čemer smo uporabili postopek direktnega zamesa.

### 3.2.3 Vzhajanje (fermentacija 2)

Testu smo izmerili temperaturo ter ga položili v plastično posodo, jo pokrili s pokrovom ter vstavili v vzhajalno komoro za 90 minut pri temperaturi  $30 \pm 2$  °C. Vzhajano testo smo ročno razdelili na dva približno enaka dela in ju oblikovali v hlebčka. Vsakega smo položili v modelno košarico, ki smo jo predhodno pomokali, ter ju ponovno vstavili v vzhajalno komoro še za dodatnih 30 minut pri isti temperaturi.

### 3.2.4 Peka

Po zaključeni fermentaciji smo obema hlebčkoma na vrhnji strani z nožem naredili po dve vzdolžni zarezi ter ju pekli v mali konvekcijski peči v isti liniji 30 minut pri temperaturi 230 – 240 °C. Spečena hlebčka smo 40 minut hladili pri temperaturi  $5 \pm 1$  °C.

### 3.2.5 Fizikalno-kemijske analize kislega testa in kruha

Na dan peke smo najprej izmerili vrednost pH rženega kislega testa, po peki in hlajenju pa še sredice kruha. Isti dan smo kruhu izmerili tudi maso in volumen. Poleg tega smo pripravili še ostale potrebne vzorce ter jih zamrznili na  $-80 \pm 2$  °C. Za shranjevanje kislega testa smo uporabili 50 mL plastične centrifugirke, medtem ko smo vzorce sredice in skorje po predhodni obdelavi s tekočim dušikom ter drobljenju v terilnici shranili v vialo za GC, prepihali z dušikom ter hermetično zaprli. Ko smo vzorce potrebovali, smo jih odmrznili pri sobni temperaturi. Kislemu testu in sredici smo izmerili hlapne spojine in sladkorje, v skorji pa smo določali le hlapne spojine.

Za merjenje sladkorjev pri slepem vzorcu smo namesto fermentiranega kislega testa uporabili enako količino sveže pripravljene zmesi moke in vode.

#### 3.2.5.1 Merjenje vrednosti pH in titrabilnih kislin

##### Izvedba:

Meritve smo opravili z avtomatskim pH-metrom Mettler Toledo DL50 Graphix na Katedri za tehnologijo vina. Takoj po končani fermentaciji v bioreaktorju smo kislemu testu najprej izmerili vrednost pH. V posebno plastično posodico smo oddtehtali 30 g testa ter mu dodali 10 g bidestilirane vode. Pripravljeni mešanici smo izmerili pH, nato pa še titrabilne kisline. Poizkus smo opravili v treh ponovitvah in rezultate podali kot povprečne vrednosti.

Po peki smo ohlajeni kruh razrezali na četrtine. Iz vsake četrtine smo iz različnih delov kruha vzeli vzorce sredice ter jo nadrobili. 15 g sredice smo odtehtali v 100 mL stekleno čašo ter ji prilili 100 g bidestilirane vode in občasno premešali s stekleno palčko. Dobljeno suspenzijo smo s pomočjo lija po 30 minutah filtrirali skozi filtrirni papir v 100 mL erlenmajerico. V posebno plastično posodico smo natehtali 40 g dobljenega filtrata ter mu z avtomatskim pH-metrom izmerili pH. Kislemu testu in kruhovi sredici smo z

avtomatskih pH-metrom določili titrabilne kisline tako, da smo vzorce titirali z 0,1 M raztopino NaOH do pH 6,6 ter izmerili porabo. TTA smo izrazili kot količino porabljene NaOH (v mL).

Naprave/Aparature:

- pH-meter: Mettler Toledo DL50 Graphix
- tehtnica (Mettler toledo, 310 g)

Uporabljen material:

- čaša 100 mL
- erlenmajerica 100 mL
- plastične posodice 60 mL
- 0,1 M NaOH z koncentracijo  $c=0,009721$

### 3.2.5.2 Določanje volumna in mase rženih kislih kruhov

Izvedba:

Volumen kruha smo računali na količino moke, iz katere je bil kruh izdelan in je bila v vseh eksperimentih enaka. Uporabili smo metodo z nasipom gorčičnih semen in specifičen volumen kruha podali v mL/g.

Prazno merilno posodo smo napolnili z gorčičnimi semeni do roba ter s pomočjo ravnila poravnali površino ter tako odstranili odvečna semena. Nato smo večino semen presuli iz prve posode v drugo posodo, le nekaj smo jih pustili na dnu. V to smo položili hlebček, ki smo ga predhodno stehali ter ga prekrili s semeni iz druge posode vse do roba. Ponovno smo površino poravnali z ravnilom ter odvečna semena in semena, ki niso šla v posodo z kruhom presuli v merilni valj in odčitali volumen. Iz mase ter izmerjenega volumna smo nato izračunali specifičen volumen kruha.

Uporabljen material:

- merilni valj 500 mL
- gorčična semena
- merilna posoda
- ravnilo

Izračun:

$$\text{SPECIFICEN VOLUMEN} = \frac{\text{volumen kruha (mL)}}{\text{masa kruha (g)}} \quad \dots (1)$$



### 3.2.5.3 Določanje sladkorjev v kislem testu in sredici

#### Izvedba:

V epruvete z navojem smo zatehtali 200 mg kislega testa ali nadrobljene sredice (predhodno obdelana s tekočim dušikom) in z pipeto dodali 1,5 mL 60 % etanola. Epruvete smo zaprli s pokrovčki, vstavili v termostatski blok in jih segrevali pri 70 (±2) °C za 30 minut. Nato smo 500 µL bistre tekočine s pipeto prenesli v mikrocentrifugirke (v nadaljevanju epice) z volumnom 1,5 mL ter jih 5 minut centrifugirali pri 15.000 obratih/min. Tako dobljen supernatant smo s pomočjo 5 mL injekcije prefiltrirali preko Syringa filtra za enkratno uporabo, s porami velikosti 0,45 µm, v epruvete. Te smo ustavili v vakuumsko centrifugirko dokler ni supernatant izparel. Epruvetam smo nato dodali 100 µL reagenta R1, jih zaprli z zamaškom ter segrevali pri 70 ± 2 °C za 30 minut. Nadalje smo dodali še 100 µL HMDS ter 10 µL trifluoroocetne kisline, epruvete ponovno hermetično zaprli ter segrevali pri 100 ± 2 °C še dodatnih 60 minut. Po končanem segrevanju smo vzorce razredčili z 400 µL HDMS. Bistvo raztopino smo nato s steklenimi kapalkami prenesli v vialo za GC. Rezultat je bil izražen kot vsebnost sladkorja (g) v 100g vzorca.

#### Izračun:

$$c_{\text{SLADKORJA (mg / L) V VIALI}} = \frac{\text{površina pod krivuljo vzorca}}{\text{površina pod krivuljo standarda}} \times \text{koncentracija standarda} \quad \dots (2)$$

#### Naprave/aparature:

- pipeta 10 µL, 1000 µL in 5 mL (Transferpette)
- steklene kapalke
- centrifuga (Eppendorf)
- termostatski blok
- vakuumsko centrifuga
- plinski kromatograf: 7890 N (Agilent, ZDA)
  - \*Kolona: OPTIMA 1 MS: 12 m x 0,2 mm x 0,35 µm (dolžina, premer, nanos filma; Supelco)
  - \*Detektor: MS-detektor, 5975 C (Agilent, ZDA)

#### Uporabljen material:

- steklene epruvete z navojem ter zamaški
- 1,5 µL mikrocentrifugirka (epice)
- 6 mL injekcija (Norm-Ject, Luer)
- Syringa filtri z porami velikost 0,45 µm (Henke Sass wolf)
- vialo za GC z pokrovčki

#### Raztopine in reagenti:

- etanol
- 99 % heksametildisilazan (HMDS, Fluka)
- 99 % tetrafluoroocetna kislina (Riedel-de Haën)
- raztopina R1

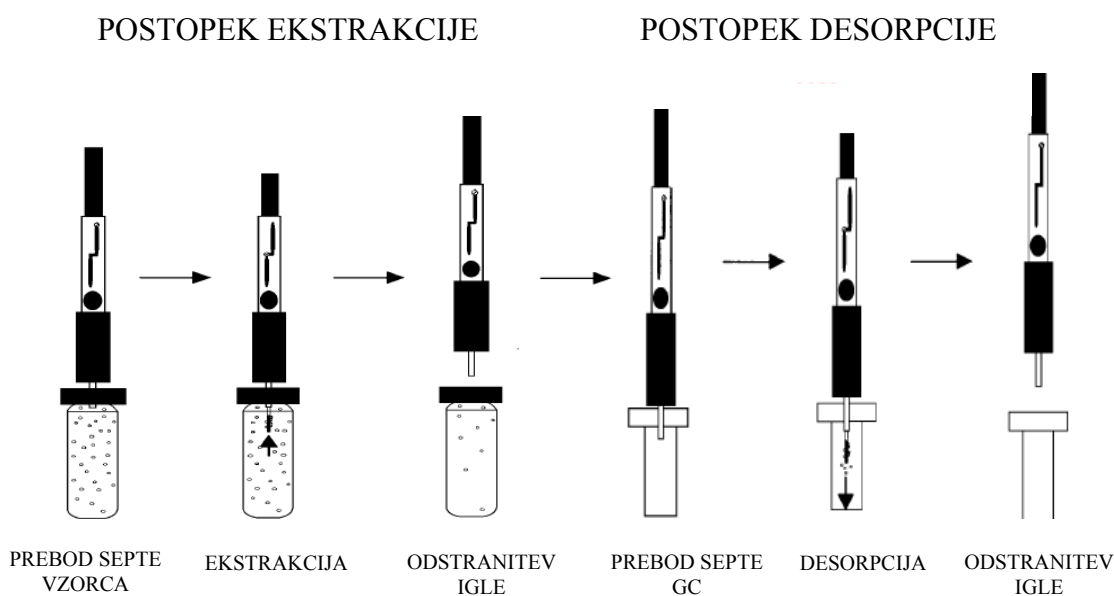
### Eksperimentalni pogoji na GC-MS:

- Kromatografski pogoji:
  - temperatura injektorja: 280 °C,
  - nosilni plin: helij 6,0 s pretokom 1,1 mL/min pri 120 °C,
  - začetna temperatura peči: 120 °C (1 min),
  - temperaturni gradient v peči: 12 °C/min,
  - končna temperatura peči: 300 °C (9 min)
  
- Detektor: masni spektrometer
  - temperatura ionskega izvora: 230°C,
  - temperatura kvadripola: 150 °C,
  - masni spekter: full-scan mode (40-500 m/z).

#### 3.2.5.4 Določanje aromatičnih spojin v kislem testu, skorji in sredici rženega kislega kruha

Ekstrakcijo in koncentriranje hlapnih spojin smo izvedli po principu analize nadprostora nad vzorcem z uporabo ekstrakcijske igle. To je metoda mikroekstrakcije na trdni fazi (SPME), kjer je igla prevlečena s stacionarno fazo, na katero se iz plinske faze absorbira analit – hlapna spojina, ki je v ravnotežju z vzorcem. Koncentracija vezanega analita je premosorazmerna s koncentracijo tega v vzorcu. Desorpcija poteče v povezavi z GC, ki je kombinirana z masno spektrometrijo MS. GC snovi loči, MC pa identificira in kvantificira. Tako metodo imenujemo SPME/GC-MS.

SPME metoda je primerna za polarne in nepolarne spojine, pri čemer uporaba topil ni potrebna. Pri metodi potrebujemo zelo majhno količino vzorca. Odlikuje pa jo tudi hitrost ter enostavna uporaba.



Slika 4: Postopek ekstrakcije in desorpcije za SPME (Mundrup in Shirey, 2001)

#### Izvedba metode:

V epruvete z navojem smo zatehtali  $2000 \pm 0,1$  mg kislega testa, nadrobljene sredice ali pa skorje. Z pipeto smo dodali po  $0,5 \mu\text{l}$  internega standarda ter na vijalo hermetično pritrdili pokrovčke s pomočjo posebnih klešč.

#### Izračun:

Ker poznamo količino dodanega internega standarda, lahko iz odzivnosti preračunamo ostale količine hlapnih spojin, določene z GC-MS.

Odzivnost internega standarda (IS) ustreza  $0,5 \mu\text{l}$ . Ker poznamo količino 30 mg 4-metil-2-pentanola, ki smo ga zatehtali v 25 mL bučko, lahko izračunamo njegovo vsebnost v  $0,5 \mu\text{l}$ :  $0,5 \mu\text{L}$  ustreza  $0,0006$  mg 4-metil-2-pentanola.

$$m_{4\text{-METIL-2-PENTANOL V VIALI (mg)}} = m_{\text{IS}} = 0,0006 \text{ mg IS} \quad \dots (3)$$

$$m_{\text{AROMATICNE SPOJINE V VIALI (mg)}} = \frac{m_{\text{IS}} (\text{mg}) \times \text{odzivnost aromatisne spojine}}{\text{odzivnost IS}}$$

$$C_{\text{AROMATICNE SPOJINE V VZORCU (g/kg)}} = \frac{m_{\text{AROMATICNE SPOJINE V VZORCU (g)}}}{m_{\text{VZORCA (kg)}}}$$

#### Naprave/aparature:

- tehtnica (Mettler toledo, 310 g)
- pipeta  $1 \mu\text{L}$  (Transferpette)
- Plinski kromatograf: 7890N (Agilent, ZDA)
  - \*Kolona: DB5 MS: 60 m x 0,32 mm x  $0,1 \mu\text{m}$  (dolžina, premer, nanos filma; Supelco)
  - \*Mikroekstrakcijska igla:  $85 \mu\text{m}$  Carboxen/PDMS (Supelco)
  - \*Detektor: 5975C (Agilent, ZDA)

#### Uporabljen material:

- steklene epruvete z navojem ter zamaški
- plastična kapalka
- viala za GC s pokrovčki

#### Raztopine in reagenti:

- tekoči dušik
- raztopina internega standarda: 4-metil-2-pentanol (30 mg standarda zatehtamo v 25 mL bučko in dopolnimo do oznake z destilirano vodo)

#### Eksperimentalni pogoji na GC-MS:

- Mikroekstrakcija na igli:
  - temperatura ekstrakcije:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,
  - čas ekstrakcije: 30 min
- Kromatografski pogoji:
  - čas termične desorpcije vlakna: 2 min,
  - temperatura injektorja:  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

- nosilni plin: helij 6,0 s pretokom 1,3 mL/min pri 40 °C,
- začetna temperatura peči: 40 °C (1 min),
- temperaturni gradient v peči: 8 °C/min,
- končna temperatura peči: 230 °C (1 min)
- Detektor: masni spektrometer
  - temperatura ionskega izvora: 230°C,
  - temperatura kvadripola: 150 °C,
  - masni spekter: full-scan mode (30-250 m/z).

### 3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Za pripravo in ureditev v poskusu dobljenih rezultatov smo uporabili računalniški program Microsoft Office Excel 2003.

Vse tri poskuse (1. brez dodatka, 2. z dodatkom 0,13 µL kvasne suspenzije in 3. z dodatkom 1,3 µL kvasne suspenzije) smo opravili v treh ponovitvah, medtem ko smo slepi vzorec izvedli v dveh ponovitvah. Rezultate meritev smo podali kot povprečne vrednosti ( $\bar{x}$ ) s standardnim odklonom (S.O.) ter koeficientom variabilnosti, ki smo jih dobili s pomočjo enačb:

- Povprečna vrednost ( $\bar{x}$ )

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (4)$$

- Standardni odklon (S.O.)

$$S.O. = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \dots (5)$$

- Koeficient variabilnosti (KV)

$$KV(\%) = \frac{S.O.}{\bar{x}} \times 100 \quad \dots (6)$$

pri čemer je  $n$  število vzorcev,  $X_i$  pa vrednost  $i$ -te ponovitve (Košmelj, 2007).

Dobljene podatke smo nato obdelali še s t-testom, s katerim smo primerjali eksperimentalne razlike dveh setov podatkov ali pa eksperimentalno povprečje enega seta podatkov s poznano oz. referenčno vrednostjo po naslednji enačbi:

$$t = \frac{\bar{x}_d}{s_d} \times \sqrt{N} \quad \dots (7)$$

pri čemer je  $\bar{x}_d$  glavna razlika med vrednosti parov,  $s_d$  pa ocenjen standardni odklon razlik (Kealey in Haines, 2002).

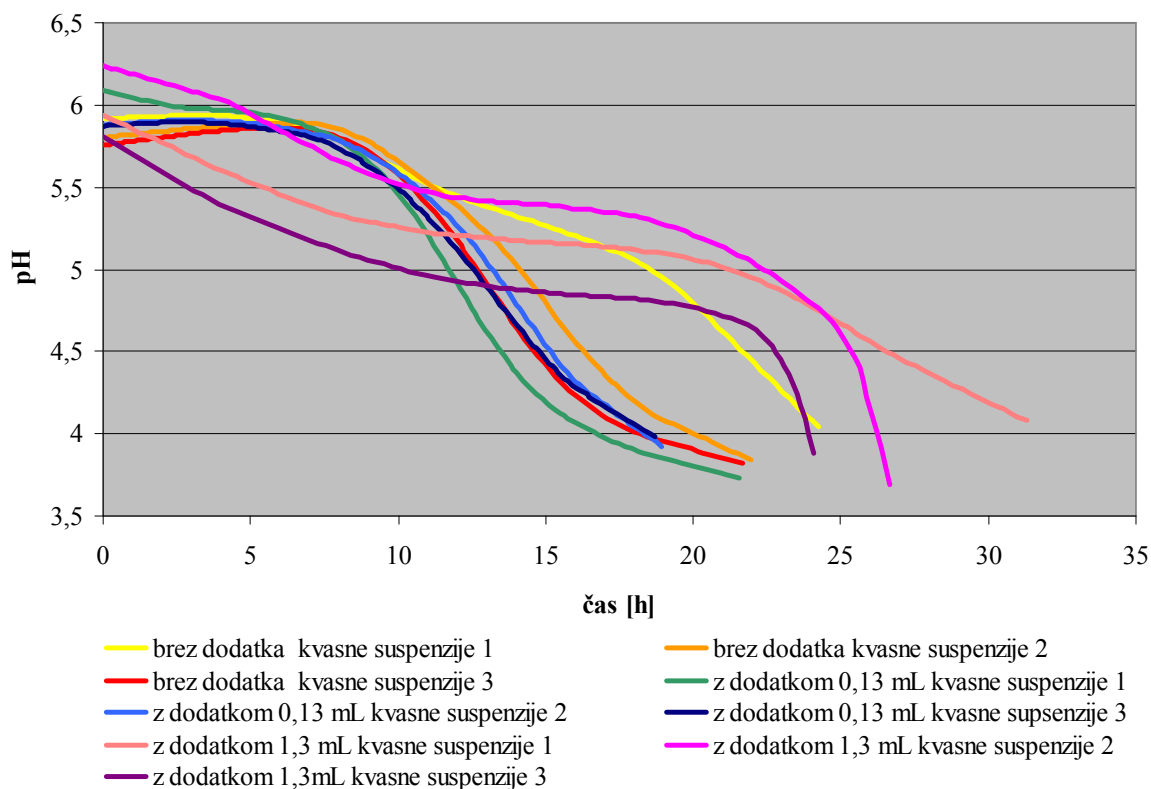
Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncan testa in so primerjane pri 1 % in 5 % tveganju.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VPLIV DODATKA RAZLIČNE KOLIČINE KVASNE SUSPENZIJE KISLEMU TESTU NA OSNOVNE STATISTIČNE PARAMETRE (pH, TTA, volumen, masa)

#### 4.1.1 Spremljanje vrednosti pH tekom fermentacije kislega testa

Med fermentacijo nastavka kislega testa v bioreaktorju smo s pH-metrom spremljali padec vrednosti pH, do katerega pride zaradi organskih kislin, nastalih z mikrofloro, prisotno v moki. Različni avtorji navajajo, da pH rženih kislih test dosega vrednosti med 3,5 in 4,1 (Michalska in sod., 2002). Zato smo kisloto vsakič fermentirali do  $\text{pH } 4 \pm 0,12$ , pri tem pa je računalnik na vsake 3 minute beležil spremembe vrednosti pH v sistemu ter čas fermentacije.



Slika 5: Vpliv dodatka različnih količin (0,13 mL in 1,13 mL) kvasne suspenzije na spremembo vrednosti pH glede na čas fermentacije [h]

Na podlagi dobljenih rezultatov smo izdelali graf, ki prikazuje pH krivulje v odvisnosti od časa.

S slike 6 je razvidno, da fermentacijski mešanici v primeru, ko ji ne dodajamo kvasne suspenzije, pH pade zelo hitro (~22,5 ur). Vzrok za to pripisujemo prevladi MKB v sistemu. Še hitreje (~19,5 ur) dosežemo zeleno vrednost pH ob dodatku manjše količine kvasne suspenzije (0,13 mL). Iz pH krivulje je razvidno, da je padec vrednosti pH na

začetku nekoliko počasnejši kot v primeru, če kvasovk ne dodamo. Po prilagoditvi in vzpostavitvi ravnovesja med MKB in kvasovkami v sistemu se naklon padca krivulje ponovno približa naklonu v primeru, ko kvasovk ne dodamo. Proti koncu fermentacije postane celo bolj očiten. Iz tega sklepamo, da majhna količina kvasovk pozitivno vpliva na metabolizem MKB. Največ časa smo za doseg vrednosti pH  $4 \pm 0,12$  potrebovali, ko smo v bioreaktor dodali 1,13 mL kvasne suspenzije (~27 ur), kar povezujemo s prevlado kvasovk v sistemu. V zadnjih dveh urah fermentacijskega procesa je opazen strm padec pH krivulje, kar je ponovno odraz prevlade MKB.

#### 4.1.2 Rezultati merjenja vrednosti pH in titrabilnih kislin (TTA) končnega kislega testa in sredice rženih kislih kruhov

Vrednost pH kislega testa smo merili takoj po končani fermentaciji v bioreaktorju, in sicer v treh paralelkah. Na osnovi izračunanih K.V. lahko zaključimo, da je naša metoda ponovljiva, saj so izračunani koeficienti variabilnosti (dokaj) nizki.

**Preglednica 9: Rezultati merjenja vrednosti pH in titrabilnih kislin do končne točke titracije (6,6) v končnem kislem testu, sredici rženih kislih kruhov in sredici rženih kruhov**

vrsta poskusa	pH kislega testa					pH sredice				
	n	$\bar{x}$	SO	K.V.	P	n	$\bar{x}$	SO	K.V.	P
slepi vzorec	/	/	/	/	/	2	5,91	0,15	1,26	/
brez dodatka kvasne suspenzije	9	3,99	0,06	1,50	/	3	5,47	0,04	0,86	<b>0,00*</b> <sup>a</sup>
z dodatkom 0,13 mL kvasne suspenzije	9	3,88	0,12	2,96	<b>0,05**</b>	3	5,30	0,06	0,86	<b>0,05**</b>
z dodatkom 1,13 mL kvasne suspenzije	9	4,06	0,12	2,85	0,18	3	5,71	0,19	0,86	<b>0,00*</b>

$\bar{x}$  = povprečna vrednost

SO = standardni odklon

K.V. (%) = koeficient variabilnosti

P = stopnja značilnosti razlike med kislim testom, kjer kvasovk nismo uporabili, in kislim testom, kjer smo uporabili različno količino kvasovk: \* $P \leq 0,01$  in  $P \leq 0,05$  – statistično značilno; \*\* $P > 0,05$  – ni statistično značilno; **a** = slepi vzorec vs. kislo testo brez dodatka kvasovk

**slepi vzorec** = mešanica moke in vode, katere nismo prehodno fermentirali (razmerje enko kot pri kislem testu); rženi kruh, kateremu nismo dodali kislega testa

Iz meritev, podanih v zgornji preglednici, je razvidno, da so vrednosti pH sredice rženih kislih kruhov vedno višje od vrednosti pH rženih kislih test. To je predvsem posledica krajšega fermentacijskega časa (vzhajanja 2) v primerjavi s kislimi testi. Da uporaba kislega testa pri zamesu kruha statistično zelo značilno vpliva na znižanje vrednosti pH sredice le-tega, je razvidno iz primerjave rezultatov slepega vzorca (ne dodamo kislega testa) z rženim kislim kruhom, ki mu nismo dodali kvasne suspenzije. pH kislega testa je bil v vseh primerih približno enak (~ 4). Ob dodatku majhne količine kvasne suspenzije se je sredica statistično značilno še bolj zakisala. Iz tega sklepamo, da kvasovke v takšnih količinah pozitivno vplivajo na metabolizem MKB. Nasprotno pa izmerimo najvišji pH ( $P \leq 0,01$ ) pri vzorcih, ki smo jim dodali večje količine kvasne suspenzije. Slednje potrjuje prevlado kvasovk in s tem zmanjšanje produkcije organskih kislin s strani MKB.

Ker na znižanje vrednosti pH vpliva nastanek organskih kislin, so temu primerne tudi vrednosti titrabilnih kislin, navedene v preglednici 13. Te so določene s titracijo do pH 6,6.

Iz preglednice 10 lahko ugotovimo, da se vsebnost skupnih titrabilnih kislin v kislih testih ni spreminjala, saj smo fermentacije teh prekinili pri približno enakih vrednostih. Najbolj statistično značilno se vsebnost TTA spremeni v sredici kislih rženih kruhov brez dodatka kvasne suspenzije v primerjavi z rženimi kruhi, ki jim kislo testo ni bilo dodano. Iz tega lahko sklepamo, da kislo testo vpliva na zakisanje pH sredice kruha.

**Preglednica 10: Rezultati merjenja porabe NaOH (mL) v kislem testu, sredici rženih kislih kruhov in sredici rženih kruhov**

vrsta poskusa	poraba NaOH v mL (kislo testo) - TTA					poraba NaOH v mL (sredica) - TTA				
	n	$\bar{x}$	SO	K.V.	P	n	$\bar{x}$	SO	K.V.	P
slepi vzorec	/	/	/	/	/	2	1,26	0,57	45,42	/
brez dodatka kvasne suspenzije	9	11,33	0,40	3,54	/	3	0,86	0,01	0,61	<b>0,00*</b> <sup>a</sup>
z dodatkom 0,13 mL kvasne suspenzije	9	12,26	1,83	47,19	0,37	3	0,86	0,00	0,00	0,42
z dodatkom 1,13 mL kvasne suspenzije	9	11,85	1,72	14,54	0,69	3	0,86	0,00	0,00	0,42

$\bar{x}$  = povprečna vrednost

SO = standardni odklon, deviacija

K.V. (%) = koeficient variabilnosti

P = stopnja značilnosti razlike med kislim testom, kjer kvasovk nismo uporabili, in kislim testom, kjer smo uporabili različno količino kvasovk: \*P≤0,01 in P≤0,05 – statistično značilno; \*\*P>0,05 – ni statistično značilno; **a** = slepi vzorec vs. kislo testo brez dodatka kvasovk

#### 4.1.3 Vpliv dodatka kvasovk na volumen in maso rženih kislih kruhov

Iz preglednice 11 je razvidno, da največji volumen rženih kislih kruhov (P≤0,01) dobimo iz kislega testa, ki smo mu dodali največjo količino (1,13 mL) kvasovk, kar dokazuje njihovo prevlado. Ob dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije se volumen končnega izdelka statistično značilno ne spremeni, vendar je še vedno zadovoljiv. Torej dodatek kvasovk statistično zelo značilno vpliva na povečanje volumna končnih izdelkov le ob višji količini dodane kvasne suspenzije (1,13 mL). Najmanjši volumen smo izmerili pri kruhah, pripravljenih iz kislega testa, kateremu nismo dodali kvasne suspenzije. Podobne volumne kruhov smo dobili tudi ob dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije. Vse to kaže na sinergistično delovanje MKB in kvasovk ter pomembnost kvasovk pri tvorbi ogljikovega dioksida.

Iz K.V., podanih v preglednici 11, lahko trdimo, da so vsi dobljeni rezultati s to metodo ponovljivi.



**Preglednica 11: Vpliv uporabe kislega testa ter dodatka različnih količin kvasovk na volumen in maso rženih kislih kruhov v primerjavi z rženimi kruhi**

vrsta poskusa	volumen (mL)					masa (g)				
	n	$\bar{x}$	SO	K.V.	P	n	$\bar{x}$	SO	K.V.	P
slepi vzorec	4	3160,00	14,14	0,45	/	4	766,75	9,88	1,29	/
brez dodatka kvasne suspenzije	6	2985,50	55,49	1,86	<b>0,00*</b> <sup>a</sup>	6	738,33	22,17	3,00	<b>0,03***</b> <sup>a</sup>
z dodatkom 0,13 mL kvasne suspenzije	6	3056,67	126,44	4,14	0,45	6	759,83	35,01	4,61	0,27
z dodatkom 1,13 mL kvasne suspenzije	6	4312,50	36,97	0,86	<b>0,00*</b>	6	775,50	13,88	1,79	<b>0,01*</b>

$\bar{x}$  = povprečna vrednost

SO = standardni odklon, deviacija

K.V. (%) = koeficient variabilnosti

P = stopnja značilnosti razlike med kislim testom, kjer kvasovk nismo uporabili, in kislim testom, kjer smo uporabili različno količino kvasovk: \*P≤0,01 in P≤0,05 – statistično značilno; \*\*P>0,05 – ni statistično značilno; **a** = slepi vzorec vs. kislo testo brez dodatka kvasovk

V preglednici 12 so prikazane vrednosti specifičnega volumna kruha, ki ga podamo na osnovi izmerjenega volumna in mase. Razberemo lahko, da tako dodatek kislega testa kot tudi dodatek 1,13 mL kvasne suspenzije statistično značilno vpliva na povečanje specifičnega volumna rženih kislih kruhov.

**Preglednica 12: Specifičen volumen rženih kislih kruhov glede na količino dodatne kvasne suspenzije (0,13 in 1,13 mL) v primerjavi s tistimi, katerim kvasovk nismo dodali ter rženimi kruhi**

vrsta poskusa	specifičen volumen (mL/g)				
	n	$\bar{x}$	SO	K.V.	P
slepi vzorec	4	4,12	0,04	0,01	
brez dodatka kvasne suspenzije	6	4,04	0,03	0,02	<b>0,05**</b> <sup>a</sup>
z dodatkom 0,13 mL kvasne suspenzije	6	4,02	0,07	0,01	0,19
z dodatkom 1,13 mL kvasne suspenzije	6	5,56	0,08	0,01	<b>0,05*</b>

$\bar{x}$  = povprečna vrednost

SO = standardni odklon, deviacija

K.V. (%) = koeficient variabilnosti

P = stopnja značilnosti razlike med kislim testom, kjer kvasovk nismo uporabili, in kislim testom, kjer smo uporabili različno količino kvasovk: \*P≤0,01 in P≤0,05 – statistično značilno; \*\*P>0,05 – ni statistično značilno; **a** = slepi vzorec vs. kislo testo brez dodatka kvasovk

## 4.2 VPLIV DODATKA RAZLIČNIH KOLIČIN KVASNE SUSPENZIJE KISLEMU TESTU NA NA SLADKORJE IN HLAPE AROMATIČNE SPOJINE

### 4.2.1 Sladkorji v kislem testu in sredici

Sladkorje v kislem testu smo določali takoj po fermentaciji, v sredici pa potem, ko smo kruh ohladili na primerno temperaturo. Rezultati iz preglednice 13 nam kažejo, da je koncentracija maltoze po peki vedno višja v primerjavi z ustreznimi kislimi testi, ne glede na vrsto uporabljene fermentacije. Koncentracija maltoze lahko znatno naraste v primerjavi s kislim testom pred peko. Tako velika količina tega topnega ogljikovega hidrata kaže na

visoko aktivnost encima amilaze v rženi moki. Ob dodatku 1,13 mL kvasovk najdemo v sredici rženih kislih kruhov poleg maltoze tudi večje količine fruktoze ter saharoze v primerjavi z rženimi kislimi testi, medtem ko je vsebnost glukoze v kislem testu vedno višja kot pa v sredici, ne glede na vrsto uporabljene fermentacije. Iz tega lahko sklepamo, da so kvasovke bolj dovzetne za fermentacijo saharoze kot MKB ali pa jo fermentirajo hitreje.

**Preglednica 13: Rezultati merjenj vsebnosti različnih sladkorjev (g/100g) v kislem testu in sredici rženega kislega kruha ter rženega kruha**

		VSEBNOST SLADKORJEV (mg/100g)			
		slepi vzorec	brez dodatka kvasne suspenzije	z dodatkom 0,13 mL kvasne suspenzije	z dodatkom 1,13 mL kvasne suspenzije
n		3	6	6	6
fruktoza v kislem testu	$\bar{x}$	0,780	14,543	27,064	1,275
	S.O.	0,222	0,095	1,278	0,095
	P	/	<b>0,01*</b>	<b>0,04**</b>	<b>0,01*</b>
fruktoza v sredici	$\bar{x}$	7,766	17,884	0,006	20,573
	S.O.	2,169	4,004	0,000	1,283
	P	/	0,26	0,39	0,40
glukoza v kislem testu	$\bar{x}$	0,862	89,381	172,688	3,506
	S.O.	2,355	0,732	0,000	0,557
	P	/	<b>0,00*</b>	<b>0,05**</b>	<b>0,00*</b>
glukoza v sredici	$\bar{x}$	8,610	9,203	0,003	6,851
	S.O.	2,355	0,732	0,000	0,557
	P	/	0,83	0,28	<b>0,04**</b>
saharaza v kislem testu	$\bar{x}$	0,000	5,351	0,116	0,041
	S.O.	0,000	6,794	0,005	0,016
	P	/	0,27	0,47	0,06
saharaza v sredici	$\bar{x}$	57,416	0,124	1,320	0,195
	S.O.	5,468	0,027	1,527	0,032
	P	/	0,47	0,28	<b>0,3**</b>
maltoza v kislem testu	$\bar{x}$	13,456	151,845	341,220	3,638
	S.O.	0,386	13,661	9,207	0,530
	P	/	<b>0,05**</b>	<b>0,05**</b>	<b>0,01*</b>
maltoza v sredici	$\bar{x}$	134,550	570,904	0,173	594,105
	S.O.	3,924	10,697	0,002	70,099
	P	/	<b>0,01*</b>	<b>0,05**</b>	0,68

$\bar{x}$  = povprečna vrednost

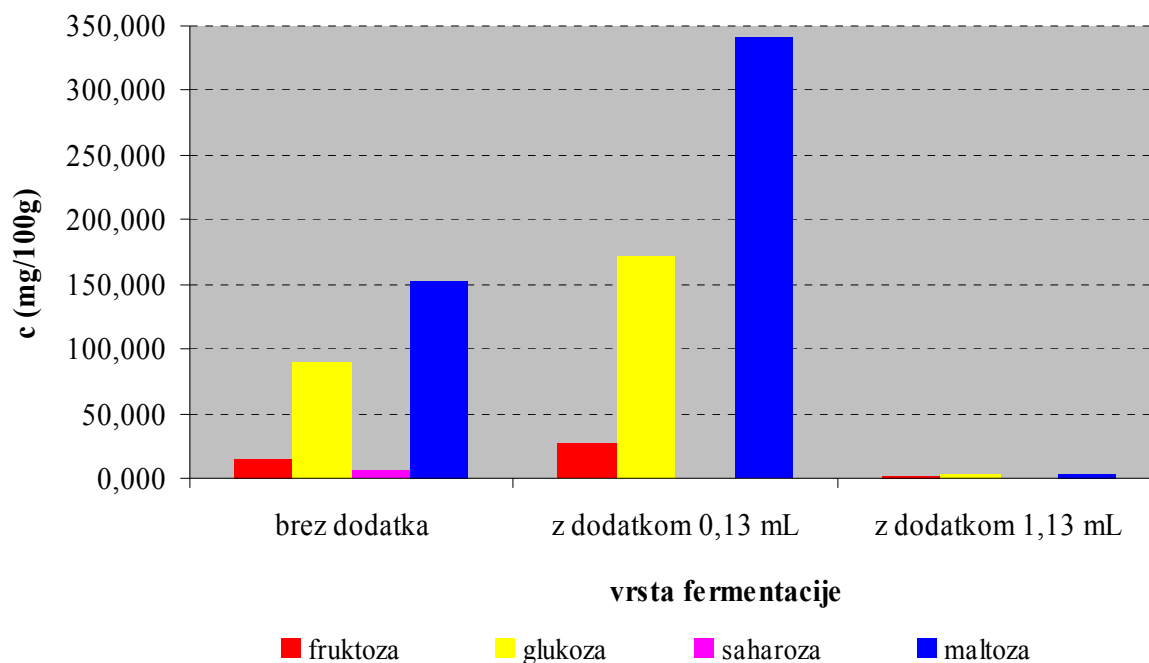
SO = standardni odklon, deviacija

P = stopnja značilnosti razlike med kislim testom, kjer kvasovk nismo uporabili, in kislim testom, kjer smo uporabili različno količino kvasovk: \*P≤0,01 in P≤0,05 – statistično značilno; \*\*P>0,05 – ni statistično značilno; a = slepi vzorec vs. kislo testo brez dodatka kvasovk

slepi vzorec = mešanica moke in vode, ki je nismo predhodno fermentirali (razmerje je enako kot pri kislem testu); rženi kruh, ki mu nismo dodali kislega testa

- KISLO TESTO

Na koncu fermentacije kislega testa v bioreaktorju smo izmerili vsebnost sladkorjev v njem. Ne glede na vrsto fermentacije smo vedno izmerili najvišjo vsebnost maltoze, sledili sta glukoza ter fruktoza, v zelo majhnih količinah je bila prisotna tudi saharoza (slika 6).



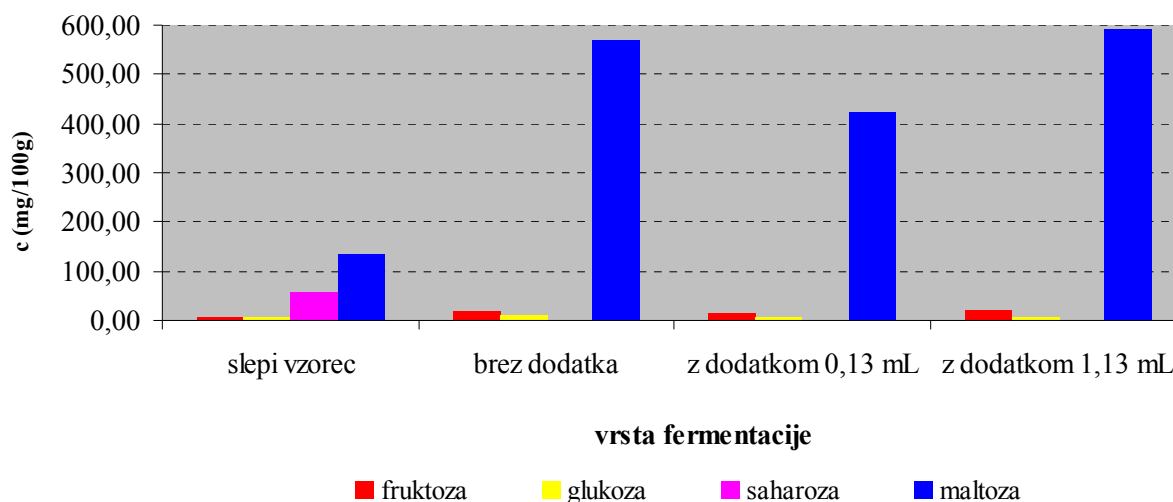
Slika 6: Primerjava vsebnosti fruktoze, glukoze, maltoze in saharoze v rženih kislih testih brez dodatka ter z dodatkom (0,13 mL ter 1,13 mL) suspenzije kvasovk

V kislih testih brez dodatka kvasne suspenzije opazimo večjo količina saharoze, fruktoze in glukoze. Vsebnost zadnjih dveh še dodatno naraste, ko dodamo fermentacijski mešanici v bioreaktor 0,13 mL kvasne suspenzije. Iz tega lahko sklepamo o vplivu zakisanja na delovanje encimov, s katerimi nastajajo fermentabilni ogljikovi hidrati. Nasprotno dodatek večje količine kvasovk (1,13 mL) spremlja močan upad koncentracije vseh omenjenih sladkorjev, predvsem maltoze. Iz tega sklepamo na prisotnost večjega števila kvasovk, ki pričnejo uporabljati maltozo šele, ko so količine glukoze in fruktoze močno zmanjšane. Vsebnost saharoze je v slepem vzorcu zanemarljiva. V največji količini smo saharozo izmerili v kislih testih brez dodatka kvasovk. Vsebnost je nato z dodajanjem vse večje količine kvasovk statistično značilno upadala. To dejstvo potrjuje prisotnost kvasovk, saj fermentirajo saharozo veliko hitreje, kot pa MKB porabljajo nastale produkte (Salim-ur-Rehman in sod., 2006).

- SREDICA RŽENEGA KISLEGA KRUHA

Med končnim zamesom in peko se vsebnost fermentabilnih sladkorjev spremeni, kot nam prikazuje slika 7. Vsebnost maltoze je statistično značilno narasla z dodatkom 0,13 mL kvasovk, najmanj pa smo jo izmerili v slepem vzorcu. Iz tega je viden močan vpliv kislega testa na delovanje encimov ter nastanek fermentabilnih ogljikovih hidratov, izmed katerih se prične maltoza porabljati šele, ko so ostali trije prisotni v manjših količinah. Nasprotno

je bila količina saharoze v slepem vzorcu najvišja, njena vsebnost pa je statistično značilno močno padla v sredicah kislih kruhov brez dodanih kvasovk ter v tistih, ki smo jim dodali po 1,13 mL kvasne suspenzije. Razlog za padec je najverjetneje posledica hitrejši fermentacije saharoze s strani kvasovk. Nespremenjeno količino saharoze smo izmerili v kislih testih brez dodatka in ob dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije. Vsebnost glukoze in fruktoze je bila nizka ne glede na vrsto fermentacije in se je le malenkost spreminjala. Iz tega sklepamo, da se večina kvasovk in MKB, prisotnih v kislem testu, prehranjuje raje z monosaharidi, maltozo pa uporabi šele po njihovi porabi.



Slika 7: Primerjava vsebnosti fruktoze, glukoze, maltoze in saharoze v sredici rženih kruhov (slepi vzorec) in sredici rženih kislih kruhov brez dodatka ter z dodatkom (0,13 mL ter 1,13 mL) kvasovk

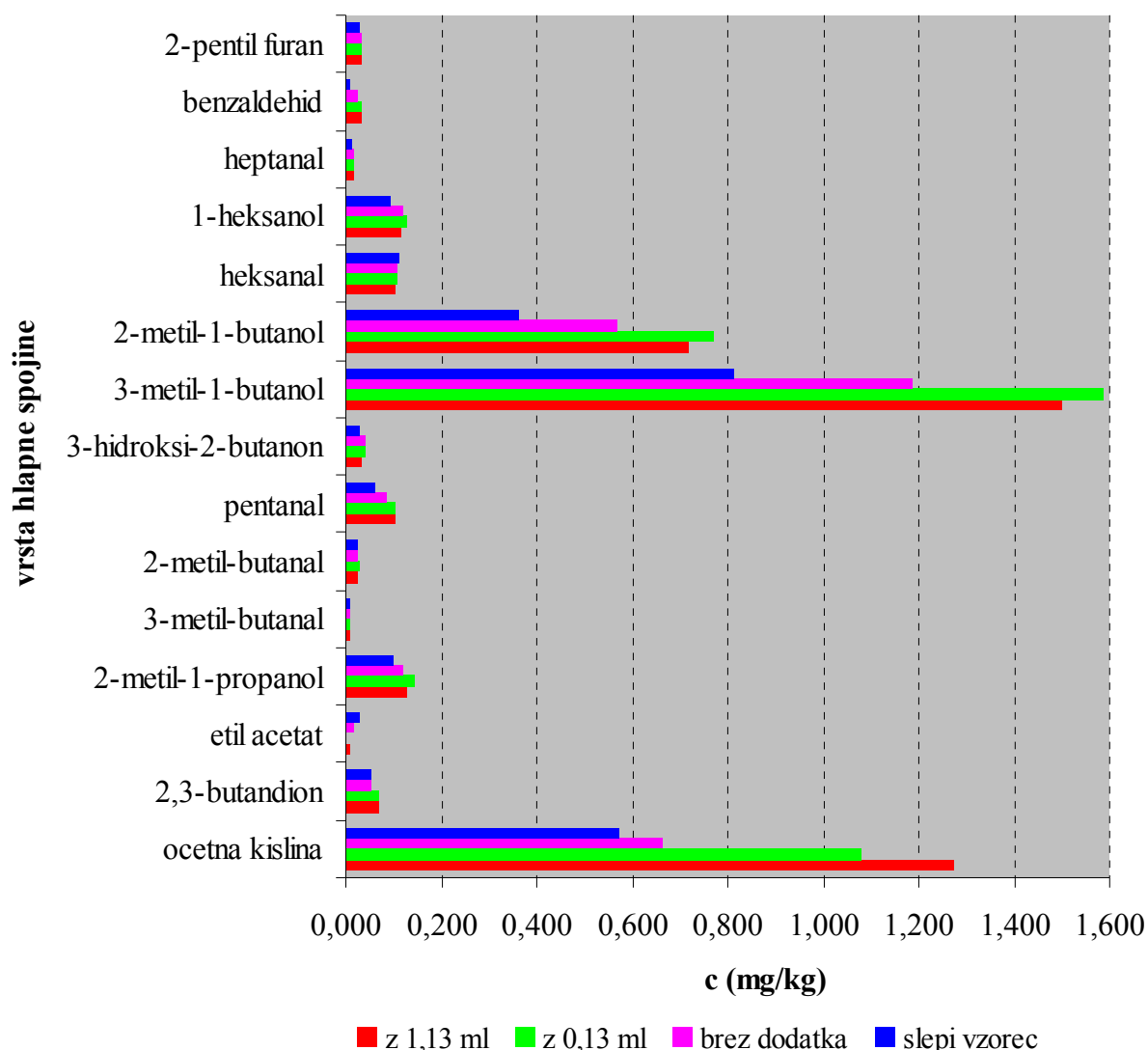
#### 4.2.2 Aromatične spojine v kislem testu, sredici in skorji rženega kruha

- KISLO TESTO

Na nastanek aromatičnih hlapnih spojin v kislem testu vpliva predvsem aktivno delovanje MKB in kvasovk (Hansen in Schieberle, 2005). Da bi določili koncentracijo aromatičnih hlapnih spojin, smo vzorce kislega testa pripravili po opisu iz poglavja 3.2.6.3. S pomočjo dodanega internega standarda smo preračunali koncentracije ostalih aromatičnih spojin. Ker so bile vrednosti hlapnih aromatičnih spojin na meji detekcije, smo rezultate zavrgli, saj se fermentacija kislega testa kljub hitri zmrznitvi vzorcev na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  najverjetneje ni takoj zaustavila. Poleg tega so določene aromatične spojine bile med potekom zmrzovanja in oddaljevanja substrat za preživele mikroorganizme.

- SREDICA RŽENIH KRUHOV IN RŽENIH KISLIH KRUHOV

Po peki smo s pomočjo **GC-MS** izmerili koncentracije 23 hlapnih aromatičnih spojin, prisotnih v rženih kislih kruhkih. Njihova vsebnost v sredici je določena z mikrobnou fermentacijo, medtem ko se aroma skorje razvije pretežno iz termičnih reakcij (Hansen in Hansen, 1996).



Slika 8: Primerjava vsebnost aromatičnih hlapnih spojin v rženem kruhu (slepi vzorec), rženem kislem kruhu brez ter z dodatkom kvasovk (0,13 mL in 1,13 mL)

S slike 8 je razvidno, da so očetna kislina (MKB) in 2- ter 3-metil-1-butanol (kvasovke) tiste hlapne aromatične spojine, ki se nahajajo v sredici kislih rženih kruhov v največjih koncentracijah, ne glede na tip fermentacije. Iz tega lahko sklepamo, da MKB in kvasovke proizvajajo visoke koncentracije aromatičnih spojin in tako prispevajo k aromi sredice rženih kislih test.

Če kruh, pri katerem smo uporabili kislo testo, primerjamo z navadnim rženim kruhom, se statistično povečajo tako produkti kvasovk, kot so 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola, kot tudi MKB, v tem primeru benzaldehid. Vsebnost etil acetata in predvsem 2-metil-1-butanola se statistično zelo značilno zmanjšata. To nam pove, da dodatek kislega testa omejeno vpliva na povečanje vsebnosti aromatičnih spojin, saj se količina večine aromatičnih spojin poveča, zmanjša pa se koncentracija le dveh spojin (etil acetata in

helsanal). Iz preglednice 14 lahko razberemo, da na vsebnost ostalih desetih spojin dodatek kislega testa nima vpliva, saj so njihove spremembe statistično neznačilne.

Dodatek 0,13 mL kvasovk povzroči porast koncentracije kar polovice aromatičnih hlapnih spojin. Najbolj statistično značilno se poveča 2-metil-1-propanol, medtem ko se vsebnost 2-metil-1-butanola, očetne kisline in 1-heksanola statistično poveča. Prvi dve aromatični spojini sta produkta kvasovk, medtem ko ostali dve proizvajajo MKB. Slednje v pomanjšani količini statistično značilno proizvajajo etil acetat, heptanal in benzaldehid, medtem ko se vsebnost 2-pentil furana statistično značilno zniža. Zaradi velike vsebnosti očetne kisline pomembno vlogo pripisujemo heterofermentativnim MKB, opazen pa je tudi porast hlapnih spojin, ki jih proizvedejo kvasovke.

Ob dodatku 1,13 mL kvasne suspenzije pride do statistično značilnega povečanja vsebnosti 2-metil-1-propanola, 2-/3-metil-1-butanola in 3-hidroksi-2-butanona. Za našete spojine velja, da so tipični produkti kvasovk. Statistično najbolj značilno se zmanjša benzaldehid, sledita pa mu pentanal in heksanal, ki sodita med spojine, ki jih proizvajajo MKB.

**Preglednica 14: Prikaz izmerjenih koncentracij hlapnih aromatičnih spojin v sredici rženega kruha, rženega kislega kruha brez ter z različnim dodatkom kvasne suspenzije (0,13 mL in 1,13 mL)**

**Razpredelnica 13: Prikaz izmerjenih koncentracij hlapnih aromatskih spojin v sredici rženega kruha, rženega kislega kruha brez ter z različnim dodatkom kvasne suspenzije (0,13 mL in 1,13 mL)**

IME SPOJINE	slepi vzorec		brez dodatka kvasne suspenzije		z dodatkom 0,13 mL		z dodatkom 1,13 mL		P1	P2	P3	P4	P5	P6
	c (µg/kg)	SO	c (µg/kg)	SO	c (µg/kg)	SO	c (µg/kg)	SO						
ocetna kislina	0,575	0,001	1,081	0,230	1,502	0,419	0,868	0,000	0,369	0,240	0,582	<b>0,054**</b>	0,145	<b>0,013**</b>
2,3-butanodion	0,052	0,014	0,070	0,016	0,061	0,013	0,253	0,104	0,496	0,584	0,104	0,385	0,055	0,073
Etil acetat	0,030	0,001	0,006	0,001	0,012	0,002	0,088	0,066	<b>0,011**</b>	<b>0,032**</b>	0,430	<b>0,051**</b>	0,326	0,344
2-metil-1-propanol	0,097	0,003	0,142	0,005	0,110	0,032	0,180	0,036	<b>0,025**</b>	0,116	<b>0,026**</b>	<b>0,011**</b>	<b>0,028**</b>	<b>0,010**</b>
3-metil-butanol	0,008	0,000	0,009	0,001	0,007	0,003	0,022	0,019	0,097	0,133	0,558	0,121	0,582	0,510
2-metil-butanol	0,024	0,000	0,028	0,007	0,016	0,007	0,023	0,015	0,522	0,156	0,958	0,133	0,595	0,585
Pentanal	0,062	0,004	0,104	0,004	0,118	0,021	0,003	0,041	0,089	0,137	<b>0,027**</b>	0,567	<b>0,021**</b>	0,081
3-hidroksi-2-butanon	0,030	0,003	0,043	0,036	0,026	0,004	0,301	0,120	0,319	0,405	<b>0,034**</b>	0,153	<b>0,018**</b>	<b>0,027**</b>
3-metil-1-butanol	0,810	0,113	1,587	0,147	1,378	0,311	2,081	0,285	<b>0,021**</b>	<b>0,011**</b>	<b>0,006**</b>	0,106	<b>0,048**</b>	<b>0,002**</b>
2-metil-1-butanol	0,363	0,039	0,772	0,039	0,657	0,178	1,214	0,260	<b>0,001**</b>	<b>0,017**</b>	<b>0,025**</b>	<b>0,046**</b>	<b>0,049**</b>	<b>0,029**</b>
heksanal	0,110	0,002	0,106	0,003	0,109	0,015	0,007	0,042	0,077	<b>0,957</b>	<b>0,018**</b>	0,842	<b>0,021**</b>	0,090
1-heksanol	0,095	0,017	0,128	0,004	0,099	0,022	0,149	0,027	0,265	0,832	0,311	<b>0,027**</b>	0,377	0,162
heptanal	0,014	0,002	0,016	0,001	0,013	0,002	0,007	0,008	0,346	0,726	0,560	<b>0,006**</b>	0,374	0,523
benzaldehyde	0,010	0,002	0,035	0,003	0,029	0,004	0,004	0,012	<b>0,030**</b>	<b>0,028**</b>	0,128	<b>0,040**</b>	<b>0,001*</b>	<b>0,008**</b>
2-pentil furan	0,029	0,001	0,035	0,002	0,031	0,002	0,028	0,002	0,171	0,598	0,544	<b>0,028**</b>	<b>0,019**</b>	<b>0,005**</b>

P – stopnja značilnosti razlike glede na tip fermentacije (slepa, brez dodatka kvasovk, z dodatkom 0,13 mL kvasovk in z dodatkom 1,13 mL kvasovk)

\*P ≤ 0,001 – statistično zelo značilna razlika med vistama fermentacije

\*\*P ≤ 0,05 – statistično značilno

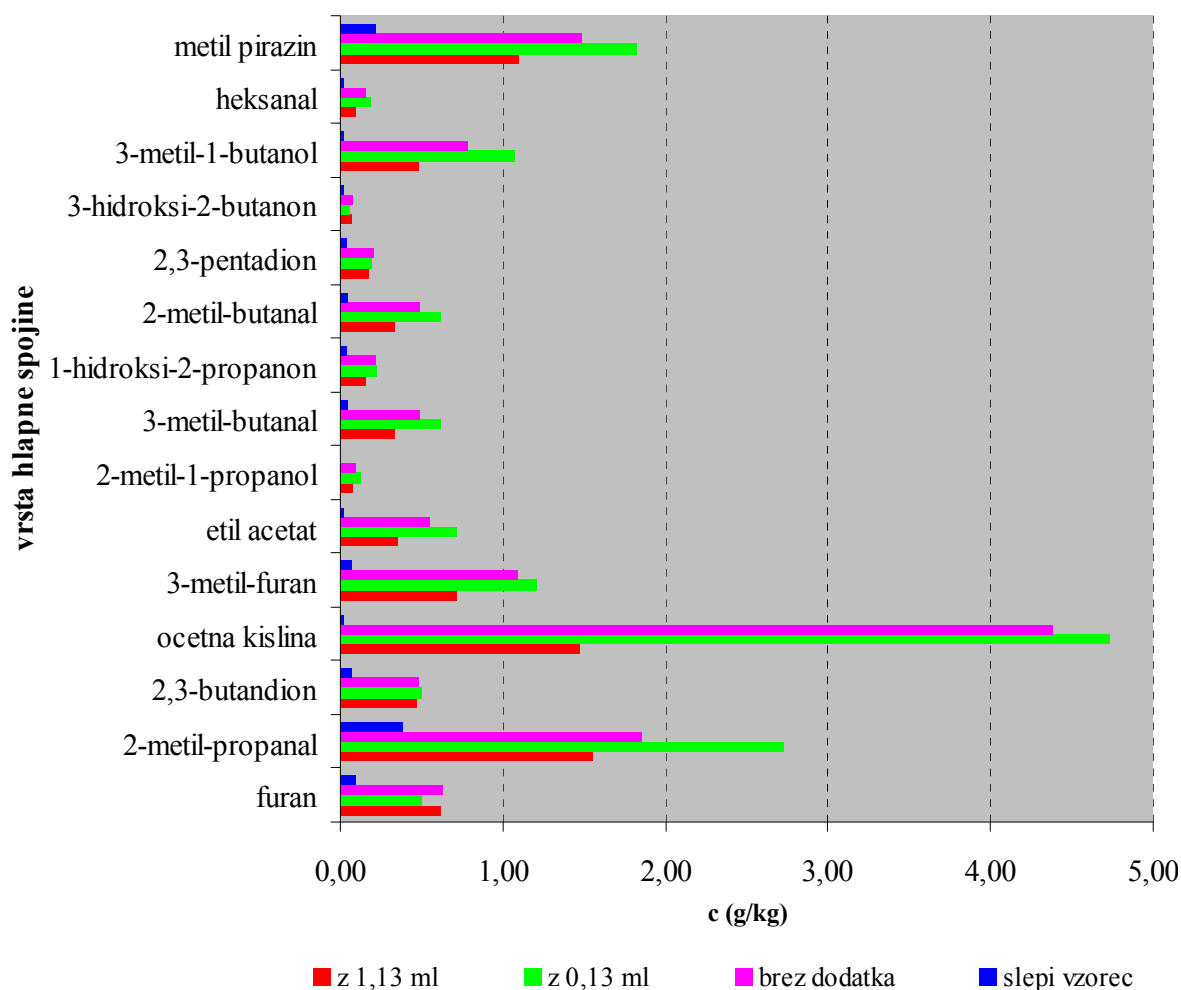
P > 0,05 – ni statistično značilno

slepi vzorec	brez dodatka kvasne suspenzije		z dodatkom 0,13 mL		z dodatkom 1,13 mL	
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
brez dodatka kvasne suspenzije						
z dodatkom 0,13 mL						
z dodatkom 1,13 mL						

T – primerjava eksperimentalnih razlik dveh setov podatkov ali pa eksperimentalno povprečje enega seta podatkov s poznano oziroma referenčno vrednostjo (v našem primeru kislo testo brez dodatka kvasne suspenzije)

- SKORJA RŽENIH KRUHOV IN RŽENIH KISLIH KRUHOV

Aroma skorje se razlikuje od arome sredice, saj je bila podvržena še dodatnim Maillardovimi reakcijam, ki potekajo le na površini hlebčka. S slike 9 lahko razberemo, da je ne glede na vrsto fermentacije v skorji vsebnost 2-metil-propanala, metil pirazina ter 3-metil furana v najvišjih koncentracijah. Zadnji dve spojini smo določili le v skorji kislih rženih kruhov, iz česar sklepamo, da izvirajo iz procesa peke.



Slika 9: Primerjava vsebnosti aromatičnih hlapnih spojin v rženem kruhu, rženem kislem kruhu brez ter z dodatkom kvasovk (0,13 mL in 1,13 mL)

Ob dodatku kislega testa smo opazili povečanje skoraj vseh prisotnih hlapnih aromatičnih spojin v primerjavi s kruhom, ki mu kislega testa nismo dodajali. Iz rezultatov iz preglednice 15 je razvidno, da se statistično najbolj povečajo vsebnosti 2-metil-propanala in 3-hidroksi-2-butanona (acetoin). Ti dve spojini sta produkta kvasovk, ki prispevata k prijetni značilni aromi skorje. Omembne vredno je še povečanje očetne kisline, ki doseže najvišjo koncentracijo glede na ostale aromatične spojine, prisotne v sredici rženega kislega kruha. Izmerjen rezultat nam potrjuje pomembnost heterofermentativnih bakterij, ki s produkcijo organskih kislin zakisajo testo. Ostale aromatične spojine se prav tako povečajo statistično značilno.



Dodatek 0,13 mL kvasovk *S. cerevisiae* stimulatívno vpliva na produkcijo devetih hlapnih aromatičnih spojin. Nastane več 3-metil butanala ( $P>0,01$ ) in 3-metil-1-butanola ( $P>0,05$ ), ki sta značilna produkta kvasovk. Izmerili smo tudi povečane koncentracije očetne kisline ter etil acetata ( $P>0,05$ ), iz česar lahko sklepamo na povečano število heterofermentativnih MKB v primerjavi s homofermentativnimi. Statistično značilno narasejo tudi vsebnosti 2-metil-propanala, metil pirazina, 3-metil furana, nastanek katerih pripisujemo termalnim reakcijam, ki potekajo med peko.

Nasprotno se ob še večjem dodatku kvasovk (1,13 mL) poveča vsebnost le trem hlapnim aromatičnih spojinam. Statistično najbolj značilno je povečanje koncentracije očetne kisline, značilnega produkta heterofermentativnih MKB, medtem ko vsebnost 2,3-butandiona s strani kvasovk in heksanala kot posledica termičnih reakcij narasejo statistično značilno. Vsebnost večine ostalih spojin, ki smo jim določali koncentracije v skorji rženih kislih test, je ob tako visokem dodatku kvasovk večinoma upadla.

**Preglednica 15: Prikaz izmerjenih koncentracij hlapnih aromatičnih spojin v skorji rženega kruha, rženega kislega kruha brez ter z različnim dodatkom kvasne suspenzije (0,13 mL in 1,13 mL)**

**Razpredelnica 14: Prikaz izmerjenih koncentracij hlapnih aromatičnih spojin v skorji rženega kruha, rženega kislega kruha brez ter z različnim dodatkom kvasne suspenzije (0,13 mL in 1,13 mL)**

IME SPOJINE	slepi vzorec		brez dodatka kvasne suspenzije		z dodatkom 0,13 mL		z dodatkom 1,13 mL		P1	P2	P3	P4	P5	P6
	c (µg/kg)	SO	c (µg/kg)	SO	c (µg/kg)	SO	c (µg/kg)	SO						
furan	0,095	0,015	0,556	0,150	0,658	0,018	0,502	0,098	0,050**	0,168	0,011**	0,487	0,560	0,505
2-metil-propanal	0,384	0,056	1,805	0,090	3,263	0,852	1,454	0,272	0,000*	0,016**	0,146	0,032**	0,393	0,112
2,3-butanon	0,164	0,029	0,399	0,132	0,438	0,121	0,518	0,061	0,024**	0,017**	0,032**	0,040**	0,049**	0,079
Ocetna kislina	0,024	0,004	3,733	1,126	4,983	0,482	1,589	0,217	0,015**	0,005**	0,036**	0,031**	0,000*	0,010**
3-metil-furan	0,067	0,011	1,096	0,286	1,372	0,348	0,675	0,117	0,139	0,120	0,120	0,047**	0,186	0,132
etil acetat	0,022	0,002	0,499	0,088	0,775	0,111	0,314	0,118	0,019**	0,028**	0,188	0,044**	0,243	0,076
2-metil-1-propanol	0,005	0,000	0,112	0,019	0,135	0,015	0,068	0,018	0,006**	0,044**	0,148	0,215	0,195	0,058
3-metil-butanal	0,043	0,008	0,529	0,060	0,671	0,098	0,255	0,143	0,066	0,047**	0,132	0,012**	0,217	0,137
1-hidroksi-2-propanon	0,041	0,007	0,231	0,046	0,254	0,053	0,148	0,011	0,115	0,104	0,063	0,012**	0,179	0,145
2-metil-butanal	0,045	0,010	0,467	0,060	0,676	0,098	0,271	0,143	0,005**	0,022**	0,132	0,054	0,127	0,033**
2,3-penta dion	0,040	0,002	0,158	0,084	0,167	0,050	0,180	0,019	0,022**	0,013**	0,050**	0,098	0,194	0,372
3-hidroksi-2-butanon	0,015	0,003	0,063	0,028	0,055	0,014	0,087	0,028	0,001*	0,037**	0,119	0,175	0,333	0,297
3-metil-1-butanol	0,024	0,002	0,878	0,169	1,149	0,063	0,579	0,191	0,009**	0,019**	0,076	0,042**	0,195	0,110
heksanal	0,015	0,002	0,164	0,015	0,173	0,019	0,117	0,031	0,021**	0,007**	0,009**	0,163	0,050*	0,004**
metil pirazin	0,216	0,025	1,573	0,265	1,983	0,351	1,023	0,157	0,106	0,083	0,070	0,003**	0,158	0,093

P – stopnja značilnosti razlike glede na tip fermentacije (slepa, brez dodatka kvasovk, z dodatkom 0,13 mL kvasovk in z dodatkom 1,13 mL kvasovk)

\* P ≤ 0,001 – statistično zelo značilna razlika med vrstama fermentacije

\*\* P ≤ 0,05 – statistično značilno

P > 0,05 – ni statistično značilno

slepi vzorec	brez dodatka kvasne suspenzije		z dodatkom 0,13 mL		z dodatkom 1,13 mL	
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
brez dodatka kvasne suspenzije						
z dodatkom 0,13 mL						
z dodatkom 1,13 mL						

T – primerjava eksperimentalnih razlik dveh setov podatkov ali pa eksperimentalno povprečje enega seta podatkov s poznano oziroma referenčno vrednostjo (v našem primeru kislota testo brez dodatka kvasne suspenzije)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Kislo testo izboljša okus, teksturo, prehranske lastnosti ter rok trajanja in je prav zaradi teh lastnosti v zadnjem času pridobilo na popularnosti (Kulp, 2003). V proizvodnji rženih kruhov je za doseg te lastnosti uporaba kislega testa esencialna. Fermentacija je osnovana na spontanem fermentacijskem procesu iz MKB in kvasovk, ki so naravno prisotne v moki (Kozlinski in sod., 2008). Meignen in sod. (2001) so objavili, da kvasovke proizvedejo višje koncentracije hlapnih spojin kot MKB, zato smo se odločili, da ugotovimo, ali lahko z dodatkom kvasovk kislemu testu povečamo vsebnost zelenih hlapnih aromatičnih spojin v rženih kislih testih ter predvsem rženih kislih kruhah.

Namen diplomske naloge je bil proučiti, kako dodatek dveh različnih količin (0,13 mL in 1,13 mL) kvasovk *S. cerevisiae* vpliva na sestavo in koncentracijo hlapnih aromatičnih spojin v spontano kisanih testih ter po opravljeni peki tudi v končnem proizvodu - kruhu. V anaizo smo vključili 21 hlapnih aromatičnih spojin značilnih za ržena kislata testa, katerih koncentracije smo določili z uporabo plinskega kromatograma. Opravili smo tudi nekatere fizikalno-kemijske analize (vrednost pH, poraba NaOH, določanje fermentabilnih sladkorjev, merjenje volumna in mase kruha) ter dobili eksperimentalne podatke, na podlagi katerih lahko sklepamo, zakaj/kako je prišlo do nastanka oziroma izgube ter povečanja oziroma zmanjšanja različnih hlapnih aromatičnih spojin ter tako končne arome rženega kislega kruha.

S ciljem ovrednotiti uspešnost naše metode smo med seboj primerjali kislata testa, katerim smo dodali *S. cerevisiae*, s tistimi, ki jim kvasovka ni bila dodana. Slednje testo smo imenovali za kontrolno. Da bi dokazali, kako pomembno je kislo testo za ržene kruhe, smo pripravili tudi kruh, kateremu kislo testo ni bilo dodano, ter rezultate primerjali z ostalimi zamesi.

- FERMENTACIJA KISLEGA TESTA

V rženi moki prisotna avtohtona mikoflora je tista, ki je odgovorna za spontano fermentacijo kislega testa (De Vuyst in Neysen, 2005). Ker imajo MKB izredno sposobnost prilagajanja okolju, ni presenečenje, da kljub njihovi nižji vsebnosti v kislem testu ter prisotnosti kvasovk tekom fermentacije MKB prevladajo. To je lepo razvidno s slike 5, kjer pH fermentacijske mešanice pade hitreje v testih, katerim kvasa nismo dodali, oziroma smo ga dodali v zelo majhni količini, kot pa tistim, katerim smo dodali večjo količino kvasovk. De Vuyst in Neysen (2005) ter Hammes in Gänzle (1998) navajata, da so MKB s poudarkom na heterofermentativnih tiste, ki proizvajajo organske kisline (mlečno in očetno), posledica česar je hitro znižanje pH na želena vrednost, ki v našem primeru znaša ~ 4. To pojasnjuje naše ugotovitve o prevladi MKB v kislih testih brez oziroma z majhnim dodatkom kvasovk.

Visoka vsebnost maltoze (preglednica 13) v kislih testih je posledica delovanja  $\alpha$ -amilaz (moka, kvasovke), s katerimi je ržena moka zelo bogata, na škrob. Zasluga, da MKB prevladujejo v združbi spontano fermentiranih test ter tistih, kjer so bile kvasovke dodane v

majhni koncentraciji, gre vsekakor njihovemu visoko adaptiranemu metabolizmu na glavni vir energije - fruktozi in maltozi. Uporaba slednjega je preferenčna (De Vuyst in Neysen, 2005; Stolz in sod., 1996). Neubauer in sod. (1994) opisujejo metabolno pot uporabe maltoze kot konkurenčno prednost, saj se pri tem glukoza-1-fosfat porablja, nefosforilirana glukoza pa se sprošča v okolje, kar tudi pojasni njeno visoko vsebnost v teh kislih testih, razvidno tudi iz slike 6. Ker se pri tem ATP ne porabi, MKB tako pridobijo na energijski prednosti. Poleg tega lahko izločena nefosforilirana glukoza povzroči represijo z glukozo v ostalih MO, ter jim tako prepreči tekmovanje za maltozo (Gobetti in Corsetti., 1997). Kot navajajo Van der Meulen in sod. (2007) si energetske prednosti zagotovijo tudi z uporabo alternativnih akceptorjev elektronov, kot je fruktoza, pri čemer poleg acetata nastaja tudi ATP. Povečane vsebnosti fruktoze v testih brez ali z malo dodanih kvasovk se ujemajo z rezultati raziskave, ki jo je opravil Saeed (2009). Ta ugotavlja, da se vsebnost fruktoze poveča predvsem zaradi metabolizma MKB, ki v teh testih prevladujejo, k čemur bolj pripomorejo heterofermentativne kot pa homofermentativne MKB.

Kot smo predhodno omenili, prevlade MKB nismo opazili zgolj v kislih testih brez dodatka kvasovk, ampak tudi v tistih, katerim smo dodajali po 0,13 mL le-teh. Zelena vrednost pH je bila v slednjem primeru dosežena v še krajšem času (~19,5 ur) kot pri kontrolni fermentaciji (~22,5 ur), kar je razvidno s slike 5. Iz tega sklepamo, da so kvasovke ugodno delovale na MKB, zaradi česar so slednje hitreje tvorile organske kisline, posledično pa je bil hitrejši tudi padec vrednosti pH. Gobetti in sod. (1994) ter Berg in sod. (1981) so prav tako ugotovili, da se je ob dodatku *S. cerevisiae* izboljšal metabolizem MKB, kar so razložili z vidika zagotavljanja ustreznih rastnih faktorjev, predvsem specifičnih aminokislin in peptidov, s strani kvasovk. Gobetti in Corsetti (1997) sta kot primer izpostavila stimulacijo rasti *Lb. sanfranciscensis* in *Lb. plantarum* s povečano dostopnostjo specifičnih amino kislin in peptidov, ki jih izločajo kvasovke kot sta *S. cerevisiae* in *S. exiguus*.

S slike 5 je razvidno, da ima največji vpliv dodatek 1,13 mL kvasovk, ki zatre delovanje spontane mikroflore iz surovin. V tem primeru je vrednost pH padala veliko počasneje, saj smo zeleno vrednost dosegli šele po ~1790 min, kar smo pripisali zmanjšanemu metabolizmu MKB ter povečanemu kvasnemu metabolizmu. De Vuyst in Neysen (2005) navajata, da mikrofloro kislega testa običajno sestavlja stabilna asociacija kvasovk ter MKB. Najpogosteje so to maltoza pozitivni sevi MKB in maltoza negativne kvasovke. V primeru dodatka večje količine *S. cerevisiae* se ravnotežje poruši, saj je ta maltoza pozitivna. Ob njeni prisotnosti torej pride do padca metabolizma MKB, saj kvasovke hitreje porabljajo maltozo in predvsem glukozo ter tako zmanjšajo dostopnost glukoze MKB kot je *Lb. sanfranciscensis*. S tem, ko je rast slednjih upočasnjena, se zmanjša tudi produkcija kislin, zaradi česa vrednost pH pada počasneje (Martínez-Anaya, 2003). Naše domneve potrjuje meritve prikazane v preglednici 13, ki kažejo zelo znižano koncentracijo glukoze in maltoze v končnem kislem testu.

Kljub temu, da večino časa fermentacije prevladujejo kvasovke, prične vrednost pH ob dodatku 1,13 mL kvasovk proti koncu fermentacije upadati hitreje. Sklepamo, da se je metabolizem MKB v primerjavi s *S. cerevisiae* znova povečal. Stolz in sod. (1995) ugotavljajo, da je izginjanje *S. cerevisiae* lahko povezano z represijo genov vključenih v fermentacijo maltoze, kar povzroči hitro izginjanje saharoze. To je opazno še posebej, ko

je ta v asociaciji z *Lb. brevis* (Meignen s sod., 2001). Poleg tega Salim-ur-Rehman (2006) navaja, da so nekateri sevi *S. cerevisiae* veliko bolj občutljivi na proizvedeno očetno kislino s strani MKB, predvsem pri pH 4,0 - 4,5 vrednostih, ki so ugodne za nedisocirano lipofilno ter membransko difuzijsko obliko organskih kislin. Na nizek pH so veliko bolj odporne MKB. Slednje so razvile veliko mehanizmov, s katerimi lahko ublažijo kislinski stres. Med njimi je zelo razširjena ADI metabolna pot, ki jim poleg energetske prednosti daje tudi zaščito pred kislinskim stresom (Van Hyleckama in Hugenholtz, 2007). Poleg vsega naštetega k ponovni prevladi pripomore tudi sposobnost fermentacije pentoz (ksiloza, arabinoza) s strani nekaterih MKB. De Vuyst in Neysen (2005) omenjata predvsem *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. alimentarius* in *Lb. plantarum*, ki jim sposobnost fermentiranja širokega spektra ogljikovih hidratov lahko zmanjša metabolno tekmovanje s kvasovkami.

Slika 7 prikazuje količino sladkorjev v sredici kruha, iz katere je razvidna visoka vsebnost maltoze. Röcken in Voysey (1995) navajata, da je proteolitična aktivnost ržene moke močnejša v primerjavi s pšenično in zato le redko pride do njene porabe. Ob dodatku kvasovk se njena vsebnost še poveča, saj jo te pričnejo porabljati šele, ko se količina glukoze in fruktoze zmanjša. Nasprotno pa se količina saharoze zmanjša glede na količino dodane kvasovke. To lahko pripisujemo hidrolizi saharoze s kvasno invertazo v glukozo in fruktozo. To so potrdili tudi Salim-ur-Rehman in sod. (2006), ki so ugotovili, da hidroliza saharoze v združbi *Lb. plantatum*, *S. cerevisiae* in *S. exiguus* poteka 200x hitreje kot pa so fermentirani dobljeni monosaharidi, kar se ujema z našimi rezultati iz razpredelnice 15.

- VOLUMEN KISLEGA TESTA IN VREDNOST pH SREDICE RŽENIH KRUHOV

Iz rezultatov v razpredelnici 11 je razvidno, da sam dodatek kislega testa ne poveča volumna rženih kislih kruhov. Do podobne ugotovitve so prišli tudi Barber in sod. (1992), medtem ko Katina (2005) nasprotno opisuje njegov pozitiven učinek in povečanje volumna. Na to naj bi vplivali stopnja zakisanja ter vrste uporabljenih mikroorganizmov (Sadeghi in sod., 2007).

Sadeghi in sod. (2007) navajajo stopnjo zakisanja kislega testa kot pomemben faktor, ki vpliva na volumen. Slednja je bila v našem primeru pri vseh treh vrstah fermentacije regulirana na pH ~ 4. Ob dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije v kislno testo se je volumen rženega kislega kruha zanemarljivo povečal v primerjavi s kislim testom, ki mu kvasovk nismo dodali. Tako pripisujemo prevladi MKB, kar potrjuje tudi pH-krivulja, prikazana na sliki 5. Kar 44 % večji hlebček pa smo dobili ob uporabi 1,13 mL kvasne suspenzije, kar je posledica povečane aktivnosti kvasovk. Sadeghi in sod. (2007) so zapisali, da homofermentativne MKB povečajo metabolno aktivnost kvasovk, ki zaradi tega dajejo hlebčke z večjim volumnom. *S. cerevisiae* lahko zato v družbi *Lb. sanfranciscensis* proizvede večje količine ogljikovega dioksida v celo za tretjino krajšem času, kot bi ga potreboval sicer.

S primerjavo rezultatov, prikazanih na sliki 5 in v preglednici 11, smo ugotovili, da dodatek 1,13 mL kvasne suspenzije pozitivno vpliva na volumen ustreznih kislih rženih kruhov kljub temu, da so ob koncu fermentacije tako pripravljenih kislih test bile MKB

bolj aktivne kot pa kvasovke. Čeprav so kvasovke prevladovale večji del fermentacije, očitno padec pH-krivulje (prikazan na sliki 5) kaže na njihovo zmanjšano delovanje in prevlado MKB. Iz tega sklepamo, da kvasovke niso odmrle, ampak so najverjetneje v fazi prilagajanja. Vzrok za to lahko pripišemo tudi zelo zmanjšani vsebnosti sladkorjev v takšnih kislih testih (slika 6). Ob zamesu kruha s svežo moko in tako pripravljenimi kislimi testi dobijo kvasovke ponovno dovolj hranila, da se namnožijo in ponovno prevladajo.

Ustrezno z nižjo vrednostjo pH, smo izmerili višje vrednost TTA rženih kislih test, kot prikazuje preglednica 11. Katina in sod. (2007) so ugotovili, da so vrednosti TTA višje pri rženih kislih testih kot pa pri pšeničnih, saj imajo ta višjo puferno kapaciteto. Slednjo sposobnost jim pripisujejo zaradi večjo vsebnosti mineralov.

- H LAPNE AROMATIČNE SPOJINE V RŽENIH KISLIH KRUHIIH

Po končani peki rženih kislih kruhov smo s pomočjo GC-MC izmerili koncentracije hlapnih aromatičnih spojin prisotnih v sredici in skorji rženih kruhov ter kislih rženih kruhov brez ter z različnimi dodatki kvasovke *S. cerevisiae*.

Iz dobljenih rezultatov smo potrdili tezo Thiele in sod. (2002), ki so ugotovili, da je kisloto testo ter iz njega pripravljen kruh veliko bolj aromatično kot pa v primeru, da tega ne bi uporabili. Prav tako je razvidno, da ob uporabi kislega testa največje spremembe nastanejo pri aromatični sestavi skorje, kjer se poveča vsebnost dvanajstih od skupno petnajstih aromatičnih spojin, katerih koncentracije smo določali. Do manjših sprememb pride tudi v notranjosti rženih kislih hlebčkov, kjer naraste vsebnost treh spojin, koncentracija večine ostalih pa ostane nespremenjena v primerjavi z rženimi kruhi brez dodatka kislega testa. V sredici k povečani aromi prispevajo predvsem kvasovke z 2-metil-1-propanolom in 3-metil-1-butanolom ter v manjši meri MKB z benzaldehidom. Nasprotno pa se v skorji zelo poveča vsebnost očetne kisline, ki tako doseže najvišjo vrednost v primerjavi z ostalimi prisotnimi aromatičnimi spojinami. Slednja skupaj z povečanim nastankom etil acetata kaže na prisotnosti heterofermentativnih MKB in s tem padec vrednosti pH, kar povzroči zakisanja testa ter mu daje kiselkast okus (slika 5). Homofermentativne MKB so skupaj z kvasovkami odgovorne za povečanje koncentracije 2,3-butandiona ter prekursorja 3-hidroksi-2-butanona, ki prispevata skorji masleno noto. Prav tako se poveča koncentracija spojin, ki se tvorijo med peko. Predvsem izstopa 2-metil-propanal (slad), sledijo pa mu furan, 2,3-pentadion, heksanal in metil pirazin. Za slednjega Bianchi in sod. (2008) navajajo, da daje pomembno/značilno aromo po pečenem skorji rženih kislih kruhov. Kvasovke pa v večji meri prispevajo k njegovi aromi še z 2-metil butanalom, za katerega je značilna aroma po sladu.

Kirchhoff in Schieberle (2001) sta ugotovila, da k celostni aromi sredice rženega kislega kruha najbolj prispevajo 2,3-butandion (po maslu), heksanal (po travi), 3-metilbutanal (po sladu), vanilin (po vaniliji), fenilacetaldehid (po medu), metional (po kuhanem krompirju), (E)-2-nonenal (po travi, po maščobah), (E,E)-2,4-dekadienal (po maščobi, po vosku), 3-hidroksi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon (po začimbah) ter 2-/3-metilbutanojska kislina (po sladkem). Prisotnost prvih treh spojin smo ugotovili tudi pri sredicah naših kruhov. Kot navajata Hansen in Schieberle (2005) slednje prispevajo že k aromi ržene moke. Naše meritve so pokazale, da sta spojini z najvišjo koncentracijo v sredici 2- in 3-metil-1-

propanol, nastanek katerih je odvisen od metabolizma kvasovk. V podobnih koncentracijah se prav tako nahaja tudi očetna kislina nastala z MKB, posledica česar je tudi padec vrednosti pH ~4. Najvišjo vsebnost slednje spojine smo določili tudi v skorji rženih kislih kruhov, kjer se v velikih količinah nahajata tudi 2-metil-propanol (po sladcu) in 3-metil-1-butanol (po sladcu) kot značilna produkta kvasovk. V podobnih koncentracijah smo zaznali tudi metil pirazin ter 3-metil furan, ki za razliko od ostalih nastajata z termalnimi reakcijami povzročeni s peko. Cho in Peterson (2010) sta kot glavne aromatične spojine skorje rženih kislih kruhov navedla, 3-metil-butanal, (E)-2-nonenal, 2,6-dimetil-3-etil-pirazin, metional in 2,3-butandion.

Na podlagi podatkov zapisanih v preglednicah 16 in 17 smo ugotovili, da že minimalen dodatek kvasne suspenzije v kislno testo vpliva na spremembo koncentracije aromatičnih hlapnih spojin v primerjavi s kruhi, katerim kvasovk nismo dodali. Koncentracije 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola ter očetne kisline se povečajo tako v sredici kot tudi v skorji takih rženih kislih kruhov, kar je ugotovil tudi Damiani in sod. (1996). Hansen in Schieberle (2005) sta dokazala, da se z dodatkom *S. cerevisiae* poveča vsebnost alkoholov, estrov in nekaterih karbonilov, zaradi česar dobimo bolj aromatični kruh. Poleg navedenih ugotovljata še povišane vrednosti etil acetata, ki smo ga pri nas zaznali le v skorji. Tu smo poleg tega določili še povečane vsebnosti 3-metil butanala, ki daje aromo po sladcu. Z aktivnostjo MKB pa se je v sredici povišala vsebnost 1-heksanola. Povišana vsebnost etil acetata in očetne kisline nam ponovno potrди naš sklep o povečanem številu heterofermentativnih MKB. Vsebnost slednjih vpliva tudi na hiter padec vrednosti pH, kot prikazuje slika 5. Kot rezultat peke se povečajo tudi vsebnosti 2-metil-propanala, metil pirazina in 3-metil furana, katerih nastanek je pogojen s termičnimi reakcijami v skorji.

Če so ob dodatku manjše količine kvasa narasle predvsem aromatične spojine v skorji pa ob dodatku 1,13 mL kvasa narasejo predvsem tiste v sredici. Slednje so značilne predvsem za metabolizem kvasovk, med katere štejemo 2-metil-1-propanol, 2-/3-metil-1-butanol in 3-hidroksi-2-butanon. Vsebnost MKB pa se zmanjša in s tem tudi vsebnost produktov kot je benzaldehid, sledita pa mu pentanal in heksanal. Vsebnost 2,3-butandiona narase tako v sredici kot tudi v skorji, v slednji pa poleg te spojine narase le še vsebnost heksanala, kar je posledica termičnih reakcij. Količina večine ostalih spojin je ob tako visokem dodatku kvasovk večinoma upadla. Thiele in sod. (2002) so ta pojav razložili z dejstvom, da zaradi visokega povpraševanja po aminokislinah s strani metabolizma kvasovk pride do slabe akumulacije teh ter tako pomanjšane tvorbe aromatičnih spojin, ki se tvorijo med peko.

Glede na dobljene rezultate in ugotovitve smo sklepali, da mora biti optimalen ržen kruh iz kislega testa z vidika arome zmerno zakisan. Pomemben parameter pri tem je tudi optimalna sestava hlapnih spojin tako v sredici kot tudi skorji rženih kislih kruhov. Ker je ob dodatku 0,13 mL suspenzije kvasovk *S. cerevisiae* količina (želenih) aromatičnih hlapnih spojin višja v primerjavi z dodatkom 1,13 mL smo se slednjega izbrali kot optimalen dodatek kvasne suspenzije. Pri omenjeni količini 0,13 mL se povečajo predvsem spojine, ki dajejo kruhu slajšo aromo, med peko nastajajo tudi spojine, ki so pomembne za noto po pečenju. Teza, da dodatek kvasovk vpliva na povečanje 2,3-butandiona se je izkazala za resnično predvsem za njegov nastanek v skorji ne glede na količino dodane kvasne suspenzije. Medtem ko se je njegova vsebnost povečala v sredici le v testu, kateremu smo dodali 1,13 mL kvasovk. V slednjih okoliščinah se je povečala tudi

koncentracija 3-hidroksi-2-butanona, ki je prekurzor 2,3-metilbutanona. Za kupce je pomemben podatek tudi volumen hlebčka rženega kislega kruha. Čeprav je bil najustreznejši volumen dosežen pri uporabi 1,13 mL kvasne suspenzije, pa aromatična sestava kruha v tem primeru ni bila tako bogata. Tako volumen kot tudi masa sta pri manjšem dodatku kvasa bila sicer nižja a kljub temu še vedno zadovoljiva in višja kot pri kruhah brez dodatka.

Potrdili smo hipotezo, da dodatek kvasovk *S. cerevisiae* vpliva tako na sestavo kot tudi koncentracijo hlapnih aromatičnih snovi. Prav tako smo potrdili hipotezo, da njihov dodatek v količini 1,13 mL vpliva na povečanje vsebnosti spojine 2,3-metilbutanol tako v sredici kot tudi skorji končnega izdelka. Medtem pa ob dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije slednja narase le v sredici.

Želja po doseganju čim bolj aromatičnih kislih rženih kruhov vodi do iskanja novih možnosti, osnovanih na dosedanjih raziskavah. Iz podatkov, dobljenih v tem diplomskem delu sklepamo, da bi lahko v nadaljnjih raziskavah preučili predvsem uporabo dodatka večje količine kvasne suspenzije (1,13 mL) v kislno testo. Čeprav smo ob uporabi manjše količine (0,13 mL) le-te dobili bolj aromatične kisle ržene kruhe, je bila sredica slednjih veliko bolj zakisana kot pa ob dodatku večje količine. Uporaba večjega deleža kislega testa, ki smo mu dodali 0,13 mL kvasne suspenzije, bi tako najverjetneje dala kruhe z močno zakisano sredico, kar pa bi bilo s senzoričnega vidika kupcev slabše sprejeto. Nasprotno bi uporaba večje količine kislega testa, zakisanega z dodatkom 1,13 mL kvasne suspenzije, dala kruhe z manj zakisano sredico, ki bi najverjetneje bila še vedno sprejemljiva. Prav tako pa bi tak kruh vseboval tudi večjo količino hlapnih aromatičnih spojin.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovni opravljenih analiz, dobljenih rezultatov in razprave lahko sklepamo:

- Dodatek različne količine kvasne suspenzije *S. cerevisiae* vpliva na hitrost nastanka organskih kislin (mlečne in očetne) z MKB, in sicer dodatek 0,13 mL kvasovk pospeši, medtem ko dodatek 1,13 mL upočasni nastanek kislin v kislih testih in s tem padec vrednosti pH v primerjavi s tistimi kislimi testi, ki jim kvasovk nismo dodali.
- Dodatek različne količine kvasne suspenzije vpliva na končno vrednost pH sredice rženih kislih kruhov, in sicer dodatek 0,13 mL kvasovk statistično zelo značilno zniža, medtem ko dodatek 1,13 mL kvasovk statistično značilno zviša vrednost pH sredice rženega kislega testa v primerjavi s tistimi kislimi testi, ki jim kvasovk nismo dodali.
- Volumen rženih kislih kruhov je odvisen od količine dodane suspenzije kvasovk. Ta se statistično zelo značilno poveča le ob dodatku 1,13 mL kvasne suspenzije, medtem ko manjši dodatek kvasne suspenzije (0,13 mL) statistično značilno nima vpliva.



- Dodatek različne količine kvasne suspenzije vpliva tudi na količino sladkorjev v kislem testu. Ob dodatku 0,13 mL kvasovk se v kislih testih poveča vsebnost maltoze, glukoze in fruktoze medtem, ko njihova vsebnost ob dodatku 1,13 mL pade v primerjavi s tistimi kislimi testi, ki jim kvasovk nismo dodali.
- Na vsebnost sladkorjev v rženih kislih kruhkih vpliva predvsem dodatek 1,13 mL kvasne suspenzije pri čemer se vsebnost saharoze poveča, vsebnost glukoze pa zmanjša v primerjavi z kruhi katerim kislo testo ni bilo dodano. Ob dodatku 0,13 mL kvasovk se spremeni le vsebnost maltoze, ki se zmanjša.
- Dodatek različne količine kvasne suspenzije *S. cerevisiae* vpliva na sestavo in količino hlapnih aromatičnih spojin, nastalih med fermentacijo in peko.
- Dodatek 0,13 mL kvasne suspenzije poveča sestavo in količino nekaterih hlapnih aromatičnih spojin predvsem v skorji kislih rženih kruhov v primerjavi s tistimi, ki jim kvasa nismo dodali. Ob dodatku 1,13 mL kvasne suspenzije se sestava in vsebnost nekaterih hlapnih aromatičnih spojin v skorji prav tako poveča, vendar v veliko manjši meri, saj vsebnost večine ostane nespremenjena.
- Dodatek 0,13 mL kvasne suspenzije poveča sestavo in količino nekaterih hlapnih aromatičnih spojin tudi v sredici rženih kislih kruhov. Podoben učinek ima tudi dodatek 1,13 mL kvasne suspenzije.
- Optimalen dodatek kvasne suspenzije je 0,13 mL in vodi do nastanka večje količine hlapnih snovi predvsem v skorji, ki naredijo ržene kisle kruhe bolj aromatične ter posledično tudi kvalitetnejše.
- V sredici rženih kislih kruhov, ki smo jim dodali 0,13 mL kvasovk, se statistično zelo značilno povečajo koncentracije 2-metil-1-propanola, medtem ko se vsebnost metil-1-butanola, 2,3-butandiona, očetne kisline in 1-heksanola poveča statistično značilno. Nasprotno se vsebnost etil acetata, heptanala, benzaldehida ter 2-pentil furana statistično značilno zmanjšajo.
- V skorji rženih kislih kruhov, ki smo jim dodali 0,13 mL kvasovk, se statistično značilno povečajo koncentracije 3-metil butanala, 1-hidroksi-2-propanona, 3-metil-1-butanola, 2,3-butandiona, 2-metil-propanala, očetne kisline, metil pirazina, 3-metil furana in etil acetata.
- Dodatek različnih količin kvasne suspenzije vpliva na koncentracijo 2,3-butandiona, in sicer se ob dodatku 0,13 mL kvasne suspenzije statistično značilno poviša tako v sredici kot tudi v skorji, ob dodatku 1,13 mL kvasovk pa le v skorji.

## 6 POVZETEK

Zaradi vedno večjega povpraševanja sodobnih potrošnikov po naravnih, okusnih ter aromatičnih kruhah se kislno testo ponovno vrača v uporabo. Aroma je ena najbolj cenjenih senzoričnih lastnosti kruha. Pomembne so tako hlapne kot tudi nehlapne spojine, vendar ne moremo nobene izmed njih obravnavati posamezno kot glavno komponento arome kruhov, saj delujejo sinergistično. Pri tem so odločilna njihova relativna razmerja, ki se lahko spremenijo s prisotnostjo drugih snovi v kruhu. Hkrati pa prisotnost določene spojine še ne pomeni, da bo pri aromi tudi sodelovala. Aromatične spojine morajo presegati njihov specifični prag zaznave vonja ali okusa.

Fermentacija kislega testa je tradicionalni proces, ki je sprva služil predvsem nastanku CO<sub>2</sub> in s tem vzhajanju. Danes se uporablja predvsem zaradi izboljšanja strukture testa in podaljšanja roka trajanja, poleg tega pa prispeva tudi k izrazitim organoleptičnim lastnostim v končnem proizvodu – kruhu. S pomočjo proteaz se med procesom fermentacije osvobodijo AK, ki služijo kot prekurzorji. Z metabolno aktivnostjo mikroorganizmov se pretvorijo v aromatične spojine, ki lahko nastanejo tudi s termičnimi reakcijami med peko. Poleg tega na okus in aromo kruhov vplivata tudi mlečna in očetna kislina.

Kislno testo smo pripravili iz mešanice ržene in pšenične moke ter vode, ki smo ji dodali različne znane koncentracije (0,13 ml in 1,13 ml) suspenzije kvasovk. Zmes smo fermentirali v bioreaktorju pri temperaturi 30±2 °C do pH ~ 4. Del tako pripravljenega kislega testa smo uporabili v glavnem zamesu, iz katerega smo spekli rženi kisli kruh. Dobljene rezultate analiz smo primerjali z analizami kislih test in kruhov brez dodatka kvasne suspenzije ter s slepim vzorcem (direkten zames).

Namen diplomskega dela je bilo razumevanje nastanka aromatičnih spojin ter njihov vpliv na aromo v končnem izdelku – kruhu. Primerjali smo sestavo in količino hlapnih spojin v rženih kislih testih ter ustreznih rženih kislih kruhah, še posebno pozornost pa smo namenili 2,3-butandionu (diacetilu). S fizikalno-kemijskimi analizami smo določili vsebnost aromatičnih spojin, vsebnost sladkorjev, pH-vrednost, TTA-vrednost, volumen in maso.

Vrednost zgornjih parametrov se spreminja glede na količino dodane kvasne suspenzije. Dodatek 0,13 mL kvasovk pospeši, medtem ko dodatek 1,13 mL upočasni nastanek kislina v rženih kislih testih in s tem povzroči padec vrednosti pH v primerjavi s tistimi, ki jim kvasovk nismo dodali. To je razvidno predvsem v sredicah rženih kislih kruhov.

Povečanje volumna in mase rženih kislih kruhov kot posledice delovanja kvasovk in homofermentativnih MKB smo dosegli šele, ko smo kislemu testu dodali 1,13 mL kvasovk *S.cerevisiae*. Dobili smo kar 44 % večje hlebčke. Iz dobljenih vrednosti smo izračunali specifičen volumen rženih kislih kruhov.

Na količino sladkorjev v kislem testu vpliva dodatek različnih koncentracij kvasovk. Vsebnost maltoze, glukoze in fruktoze se poveča ob dodatku 0,13 ml kvasovk, medtem ko

njihova vsebnost ob dodatku 1,13 ml pade v primerjavi s tistimi testi, ki jim kvasovk nismo dodali. Dodatek vpliva tudi na vsebnost sladkorjev v rženih kislih kruhkih. Ko dodamo 1,13 ml kvasne suspenzije, se vsebnost saharoze poveča, vsebnost glukoze pa zniža. Ob dodatku 0,13 ml kvasovk se zniža le vsebnost maltoze.

Dodatek kislega testa vpliva na količino in na sestavo hlapnih aromatičnih spojin v rženih kislih testih in ustreznih rženih kislih kruhkih v primerjavi s tistimi, ki jim kislega testa nismo dodali. Ob dodatku kvasne suspenzije smo opazili povečanje količin enih in zmanjšanje drugih. Optimalen dodatek kvasne suspenzije je 0,13 ml in vodi do nastanka večje količine hlapnih spojin, predvsem v skorji. Med hlapne spojine uvrščamo 3-metilbutanal, 1-hidroksi-2-propanon, 3-metil-1-butanol, 2,3-butandion, 2-metil-propanal, očetno kislino, metil pirazin, 3-metil furan in etil acetat. Nekatero hlapno aromatično spojino se povečajo tudi v sredici. Te so predvsem 2-metil-1-propanol, metil-1-butanol, 2,3-butandion, očetna kislina in 1-heksanol. Nastale aromatične spojine so produkti kvasovk in MKB.

Dodatek različnih količin kvasne suspenzije vpliva na koncentracijo 2,3-butandiona. Ob dodatku 0,13 ml kvasovk se poviša v sredici in v skorji, ob dodatku 1,13 ml kvasovk pa le v skorji.

Ugotovili smo, da dodatek 0,13 mL kvasne suspenzije pozitivno vpliva na kakovost rženih kislih kruhov tako z vidika sestave in vsebnosti hlapnih aromatičnih spojin v rženih kislih kruhkih kot tudi z vidika zadovoljivega volumna. Kljub temu da ob dodatku 1,13 mL kvasne suspenzije v kislno testo ne dobimo tako aromatičnih končnih izdelkov, se uporaba slednjega odraža s hlebčki povečanega volumna, predvsem pa z manj zakisano sredico. Prav ta lastnost kaže na dodatne možnosti uporabe dodatka 1,13 mL kvasne suspenzije v kislnem testu. Predvsem z uporabo večje količine kislega testa v končnem zamesu bi najverjetneje dobili bolj aromatične ržene kisle kruhe z velikim volumnom in ne preveč zakisano sredico.

## 7 VIRI

Arendt E.K., Ryan L.A.M., Dal Bello F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24: 165-174

Barber B., Ortolá C., Barber S., Fernández F. 1992. Storage of packaged white bread. III. Effects of sourdough and addition of acids on bread characteristics. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 194: 442-449

Bassit N., Boquien C.-Y., Picque D., Corrieu G. 1995. Effect of temperature on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 483. *Journal of Dairy Research*, 62: 123-129

Berg R.W., Sandine W.E., Anderson A.W. 1981. Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 786-788

Bianchi F., Careri M., Ciavaro E., Musci M., Vittadini E. 2008. Gas chromatographic-massspectrometric characterization of the Italian protected designaion of origin »Altamura« bread volatile profile. *Food Chemistry*, 110: 787-793

Brandt M.J. 2007. Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology*, 24: 161-164

Brandt M.J., Hammes W.P., Gänzle M.G. 2004. Effects of processparameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *European Food Research Technology*, 218: 333-338

Brummer, J.M., Lorenz K. 1991. European development in wheat sourdoughs. *Cereal Foods World*, 36: 310-314

Cho I.H., Peterson D.G. 2010. Chemistry of bread aroma: review. *Food Science and Biotechnology*, 19, 3: 575-582

Christensen M.D., Peterson C.S. 1958. Factors affecting diacetyl production by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 6: 319-322

Corsetti A., Settanni L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation – review. *Food Research International*, 40: 539-558

Czerny M., Schieberle P. 2002. Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white wheat flour: Identification and quantitative changes during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6835-6840

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. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29: 63-70

De Vuyst L., Neysen P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 43-56

De Vuyst L., Schrijvers V., Paramithotis S., Hoste B., Vancanneyt M., Swings J., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., Messens W. 2002. The biodiversity of lactic acid bacteria in greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12: 6059-6069

De Vuyst L., Vancanneyt M. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 24: 120-127

De Vuyst L., Vranckem G., Ravyts F., Rimaux T., Weckx S. 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*, 26: 666-675

Decock P., Cappelle S. 2005. Bread technology in sourdough technology. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 113-120

Diowksz A., Ambroziak W. 2006. Sourdough. V: *Bakery products science and technology*. Hui Y.H. (ed.). Iowa, Blackwell Publishing: 365-380

Eßlinger H.M., Narziß L. 2003. Beer. V: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 6<sup>th</sup> ed. Vol. 4. Bohnet M., Brinker C.J., Cornils B., Evans T.J., Greim H., Hegedus L.L., Heitbaum J., Herrmann W.A., Keim W., Kleemann A., Kreysa G., Larid T., Löliger J., McClellan R.O., McGuire J.L., Mitchell J.W., Mitsutani A., Onoda T., Plass L., Stephanopoulos G., Werner D., Woditsch P., Yoda N. (eds.). Weinheim, Wiley-VCH: 684-687

Ferrarini R., Bocca E., Cavazza A. 2007. Mechanical dispersion procedures improve the rehydration of active dry yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 5: 1251-1255

Gänzle M.G., Loponen J., Gobbetti M. 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 513-521

Gänzle M.G., Vermeulen N., Vogel R.F. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*, 24: 128-138

García-Quintáns N., Repizo G., Martín M., Magni C., Lóez P. 2008. Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7: 1988-1996

Gobbetti M. 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 267-274

Gobbetti M., Corsetti A. 1997. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology*, 14: 175-187

Gobbetti M., Corsetti A., Rossi J. 1994. The sourdough microflora: Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 175-179

Gobbetti M., De Angelis M., Crowley A., Di Cagno R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 57-69

Gobbetti M., Simonetti M.S., Corsetti A., Santinelli F., Rossi J., Damiani P. 1995. Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: Influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiology*, 12: 497-507

Gobbetti M., Smacchi E., Fox P., Stepaniak L., Corsetti A. 1996. The sourdough microflora. Cellular localization and characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29: 561-569

Goupry S., Croguennec T., Gentil E., Robins R.J. 2000. Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 207-211

Grosch W. 2001. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, 26: 533-545

Grosch W., Schieberle P. 1997. Flavour of cereal products-a review. *Cereal Chemistry*, 74, 2: 91-97

Häggman M., Salovaara H. 2008a. Effect of fermentation rate on endogenous leavening of *Candida milleri* in sour rye dough. *Food Research International*, 41: 266-273

Häggman M., Salovaara H. 2008b. Microbial re-inoculation reveals differences in the leav power of sourdough yeast strains. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 41: 148-154

Hammes W.P., Gänzle M.G. 1998. Sourdough breads and related products. V: *Microbiology of fermented food: Vol. 1*, 2<sup>nd</sup> ed. Wood B.J.B (ed.). London, Blackie Academic and Professional: 199-216

Hansen A., Hansen B. 1996. Volatile compound in wheat sourdoughs produced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 198: 202-209

Hansen A., Schieberle P. 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: Applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 1/3: 85-94

Hazelwood L.A., Daran J.-M., van Maris A.J.A., Pronk J.T., Dickinson J.R. 2008. The Ehrlich for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8: 2259-2266

Heiniö R.-L. 2006. Sensory attributes of bakery products. V: *Bakery products science and technology*. Hui Y.H. (ed.). Iowa, Blackwell Publishing: 285-298

Heiniö R.-L., Liukkonen K.-H., Myllymäki O., Pihlava J.-M., Adlercreutz H., Heinonen S.-M., Poutanen K. 2008. Quantities of phenolic compound and their impacts on the perceived flavour attributes of rye grain. *Journal of Cereal Science*, 47: 566-575

Heiniö R.-L., Katina K., Wilhelmson A., Myllymäki O., Rajamäki T., Latva-Kala K., Liukkonen K.-H., Poutanen K. 2003. Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated, sourdough fermented and native rye following the extrusion process. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36: 533-545

Horszwald A., Troszyńska A., del Castillo M.D., Zieliński H. 2009. Protein profile and sensorial properties of rye breads. *European Food Research and Technology*, 229: 875-886

Hughenoltz J., Kleerebenzem M. 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 492-497

Hughenoltz J., Kleerebenzem M., Starrenburg M., Delcour J., De Vos W., Hols P. 2000. *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 9: 4112-4114

Kariluoto S., Aittamaa M., Korhola M., Salovaara H., Vahteristo L., Piironen V. 2006. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 137-143

Kariluoto S., Vahteristo L., Salovaara H., Katina K., Liukkonen K.H., Piironen V. 2004. Effects of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chemistry*, 81, 1: 134-139

Katina K. 2005. Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. Academic Dissertation. Espoo, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki: 92 str.

Katina K., Arendt E., Liukkonen K.-H., Aution K., Flander L., Poutanen K. 2005. Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 104-112

Katina K., Kaisa P., Karin A. 2004. Influence and interactions of processing conditions and starter culture on formation of acids, volatile compounds, and amino acids in wheat sourdoughs. *Cereal Chemistry*, 81, 5: 598-610

Katina K., Liukkonen K.-H., Kaukovirta-Norja A., Adlercreutz H., Heinonen S.-M., Lampi A.-M., Pihlava J.-M., Poutanen K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutrition value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, 46: 348-355

Kealey D., Haines P.J. 2002. *Analytical chemistry*. Oxford, BIOS: 37-39

Kirchhoff E., Schieberle P. 2001. Determination of key aroma compounds in the crumb of a tree-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4304-4311

Kirchhoff E., Schieberle P. 2002. Quantitation of odor-active compounds in rye flour and rye sourdough using stable isotope dilution assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5378-5385

Kline L., Sugihara T.F. 1971. Microorganisms of the sanfrancisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the sourdough activity. *Applied Microbiology*, 21: 459-465

Kohajdović Z., Karovičova J. 2007. Fermentation of cereals for specific purpose. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46, 2: 51-57

Kozlinski E., Skudra L., Klava D., Kunkulberga D. 2008. Characterization of rye sourdough microflora. V: *FOODBALT-2008. 3<sup>rd</sup> Baltic conference on food science and technology*. Karklina D., Venskutonis P.R., Vokk R., Verhe R., Lucke F.-K., Kuka P., Rukshan L., Shleikin A. (eds.). Jelgava, Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Science and Technology: 89-93

Kulp K. 2003. Baker's yeast and sourdough technologies in the production of U.S. bread products. V: *Handbook of dough fermentations*. Kulp K., Lorenz K. (eds.). New York, Marcel Dekker: 97-143

Linko Y.-Y., Javanainen P., Linko S. 1997. Biotechnology of bread baking. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 339-344

Liukkonen K.-H., Heiniö R.-L., Salmenkallio-Marttila M., Autio K., Katina K., Poutanen K. 2006. Rye. V: *Bakery products science and technology*. Hui Y.H. (ed.). Iowa, Blackwell Publishing: 109-122

Lönner C., Preve-Akesson K. 1988. Acidification properties of lactic acid bacteria in rye sour doughs. *Food Microbiology*, 5: 43-58

Lönner C., Welander T., Molin N., Dostálek M. 1986. The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiology*, 3, 1: 3-12

Maloney D.H., Fox J. 2003. Yeast fermentations. V: *Handbook of dough fermentations*. Kulp K., Lorenz K. (eds.). New York, Marcel Dekker: 43-61



Martínez-Anaya M.A. 2003. Association and interactions of microorganisms in dough fermentations: effects on dough and bread characteristics. V: Handbook of dough fermentations. Kulp K., Lorenz K. (eds.). New York, Marcel Dekker: 63-95

Martínez-Anaya M.A. 1996. Enzymes and bread flavour: review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 9: 2469-2480

Meignen B., Onnon B., Gélinas P., Infantes M., Guilois S., Cahagnier B. 2001. Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. Food Microbiology, 18: 239-245

Meroth C.B., Hammes W.P., Hertel C. 2003. Identification and population dynamics by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 69, 12: 7453-7461

Michalska U., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E. 2002. Quality of rye flour starter prepared with some lactic acid bacteria. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 11/52, 3: 65-74

Müller M.R.A., Wolfrum G., Stolz P., Ehrmann M.A., Vogel R.F. 2001. Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. Food Microbiology, 18: 217-227

Mundrup R., Shirey R.E. 2001. Improved performance of SPME fibres and applications. Bellefonte, Sigma-Aldrich Corporation: 25 str.  
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Brochure/10942.Par.0001.File.tmp/10942.pdf> (Februar 2011)

Nadal I., Rico J., Pérez-Martínez G., Yebra M.J., Monedero V. 2009. Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36: 1233-1237

Neubauer H., Glaasker E., Hammes W.P., Poolman B., Konings W.M. 1994. Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. Journal of Bacteriology, 176: 3007-3012

Pastore G.M., Alves Macedo G. 2007. Genetic engineering. V: Handbook of food products manufacturing. Principles, bakery, beverages, cereals, cheese, confectionary, fats, fruits and functional foods. Hui Y.H. (ed.). West Sacramento, Wiley: 169-177

Paramithiotis S., Sofou A., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G. 2007. Flour carbohydrate catabolism and metabolite production by sourdough lactic acid bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 1417-1423

Penalvo J., Haajanen K., Botting N.A., Adlercreutz H. 2005. Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 9342-9347

Plessas S., Bekatoru A., Gallanaghi J., Nigam P., Koutinas A.A., Psarianos C. 2008. Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*. *Food Chemistry*, 107: 883-889

Quintas N.G., Blancato V., Repizo G., Magni C., López P. 2008. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. V: Molecular aspect of lactic acid bacteria for tradicional and new applications. Mayo B., López P. Pérez-Martínez G. (eds.). Kerala, Research Singpost: 65-88

Redek T. 2009. Vpliv kvasovk na sestavo hlapnih spojin v spontano kisanih testih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 43 str.

Röcken W., Voysey P.A. 1995. Sourdough fermentation in bread making. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, Suppl. S: 38S-39S

Rosenquist H., Hansen A. 2000. The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiology*, 17: 241-250

Sadeghi A. 2008. The secrets of sourdough: a review of miraculous potentials of sourdough in bread shelf life. *Biotechnology*, 7, 3: 413-417

Sadeghi A., Sahahidi F., Mortazavi S.A., Koocheki A., Mohebbi M. 2007, Evaluation of sourdough effect on Iranian barbari bread staling. *World Applied Science Journal*, 2, 5: 490-498

Saeed M. 2009. Isolation characterization and utilization of starter culture for the production of sourdough bread. Dissertatation. Faisalabad, National Institute of Food Science and Technology, University of Agriculture: 99 str.

Salim-ur-Rehman, Nawaz H., Hussain S., Ahmad M.M., Murtaza M.A., Ahmad M.S. 2007. Effect of sourdough bacteria on the quality and shelf life of bread. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 6: 562-565

Salim-ur-Rehman, Paterson A., Piggott J.R. 2006. Flavour in sourdough: review. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 557-566

Salovaara H. 2004. Lactic acid bacteria in cereal based products. V: Lactic acid bacteria - technology and health effects. 3<sup>rd</sup> ed. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A (eds.). New York, Marcel Dekker: 431-452

Salmenkallio-Martilla M., Katina K., Autio K. 2001. Effect of bran fermentation on quality and microstructure od high-fibre wheat bread. *Cereal Chemistry*, 78: 429-435

Sandine W.E., Elliker P.R. 1970. Microbially induced flavors and fermented foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 4: 557-562

Savić D., Savić T., Škrinjar M., Joković N. 2006. Profile of lactic acid bacteria in rye flour and sourdough. *Journal of Culture Collections*, 5: 38-45

Soubeyrand V., Julien A., Sablayrolles J.-M. 2006. Rehydration protocols for active dry wine yeasts and the search for early indicator of yeast activity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 4: 474-480

Stolz P. 2003. Biological fundamentals of yeast and lactobacilli fermentation in bread dough. V: *Handbook of dough fermentations*. Kulp K., Lorenz K. (eds.). New York, Marcel Dekker: 23-43

Stolz P., Böcker G., Hammes W.P., Vogel R.F. 1995. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. I. *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 201: 91-96

Stolz P., Hammes W.P., Vogel R.F. 1996. Maltose-phosphorylase and hexokinase activity in lactobacilli from traditionally prepared sourdoughs. *Advances in Food Sciences*, 18: 1-6

Swindell A.R., Bensosn K.H., Griffin H.G., Renault P., Ehrlich S.D., Gasson M.J. 1996. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 7: 2641-2643

Thiele C. 2003. Hydrolysis of gluten and the formation of flavour precursors during sourdough fermentation. Academic Dissertation. München, Technische Universität München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie: 129 str.

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 Chemistry*, 79, 1: 45-51

Tuukkanen K., Lojonen J., Mikola M., Sontag-Strohm T., Salovaara H. 2005. Degredation of secalins during rye sourdough fermentation. *Cereal Chemistry*, 82, 6: 677-682

Valmorri S., Tofalo R., Settanni L., Corsetto A., Suzzi G. 2010. Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy). *Antonie van Leeuwenhoek*, 97: 119-129

Valmorri S., Mortensen H.D., Jespersen L., Corsetti A., Gardini F., Suzzi G., Arneborg N. 2008. Variations in internal pH in typical Italian sourdough yeasts during co-fermentation with Lactobacilli. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 1610-1615

Van der Meulen R., Scheirlinck I., Van Schor A., Huys G., Vancanneyt M., Vandamme P., De Vuyst L. 2007. Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 15: 4741-4750

Van Hylckama V.J., Hugenholtz J. 2007. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 11: 1290-1297

Weckx S., Van der Meulen R., Maes D., Scheirlinck I., Huys G., Vandamme P., De Vuyst L. 2010. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology*, 27: 1000-1008

Yang C.H. 2006. Fermentation. V: Bakery products science and technology. Hui Y.H. (ed.). Iowa, Blackwell Publishing: 261-271

Zlateva D., Karadzhov G. 2008. Sensory quality of bread prepared with levanes of lactic acid bacteria and added amino acids. *Forum Ware International*, 1: 50-57

Zhou M., Robards K., Glennie-Holmes M., Helliwell S. 1999. Analysis of volatile compounds and their contribution to flavour in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10: 3941-3953

Žugić-Petrović T.D., Joković N.M., Savić D.S. 2009. The evolution of lactic acid bacteria community during the development of mature sourdough. *Acta Periodica Technologica*, 40: 111-122



## ZAHVALA

Za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge ter posredovano znanje se zahvaljujem mentorju doc. dr. Andreju Plestenjaku.

Velika zahvala za požrtvovalnost in razumevanje gre recenzentki doc. dr. Poloni Jamnik, prav tako pa sem ji hvaležna za strokoven in temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala tudi dr. Emilu Zlatiču za nasvete in vodenje pri praktični izvedbi diplomske naloge.

Univ. dipl. ing. Lini Burkan Makivić se zahvaljujem za pomoč pri končnem oblikovanju in popravkih ter Ani Kodelja za lektoriranje.

Posebno zahvalo dolgujem svoji družini, ki mi je v času študija potrpežljivo stala ob strani, me vzpodbujala in se mojih dosežkov veselila skupja z menoj. Z največjim veseljem jim zato posvečam nastalo delo.

Hvala tudi vsem, ki ste mi z navidez majhnimi dejanji olajšali delo in pomagali k uspešnemu zaključku študija.