

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tomaž REDEK

**VPLIV KVASOVK NA SESTAVO HLAPNIH SPOJIN V SPONTANO  
KISANIH TESTIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF YEASTS ON COMPOSITION OF VOLATILE  
COMPOUNDS IN SPONTANEOUS ACIDIFICATED SOURDOUGH**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Kemijske analize so bile opravljene v laboratoriju Katedre za tehnologije rastlinskih živil na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Andreja Plestenjaka ter za recenzentko doc. dr. Polono Jamnik.

Mentor: doc. dr. Andrej Plestenjak

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora.

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tomaž Redek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 664.654 : 543.645(043)=163.6
- KG pekarstvo /testo / vzhajanje testa / kislina testa / fermentacija testa / mlečnokislinske bakterije / kvasovke / hlapne spojine / sekundarni metaboliti / očetna kislina / diacetil / 3-hidroksi-2-butanon / pH vrednost / aroma kruha
- AV REDEK, Tomaž
- SA PLESTENJAK, Andrej (mentor) / JAMNIK, Polona (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2009
- IN VPLIV KVASOVK NA SESTAVO HLAJNIH SPOJIN V SPONTANO KISANIH TESTIH
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 43 str. 11 pregl., 8 sl., 53 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI V diplomskem delu smo ugotavljali, kako dodatek kvasa, vpliva na sestavo in količino aromatičnih hlapnih spojin v spontano kisanih testih. Z različno količino dodanih kvasnih celic smo skušali povečati število in količino zelenih hlapnih spojin. Med fermentacijo smo spremljali nastanek hlapnih spojin, pH vrednost in pretok CO<sub>2</sub>. Kislo testo brez dodatka kvasa je vsebovalo velike količine etilacetata, diacetila, očetne kisline. Te spojine so tipične za kislina testa in dajejo kruhu, pripravljenem iz kislega testa, značilno aromo, po drugi strani pa lahko v velikih količinah povzročajo neprijetno aromo. Kisla testa z dodano kvasno suspenzijo so vsebovala velike koncentracije 2-metil butanala, 3-metil butanala, 1-butanol-3-metila, feniletil etanola 3-hidroksi-2-butanona, ki pozitivno vplivajo na aromo kruha. Optimalni dodatek kvasne suspenzije glede na sestavo in količino hlapnih spojin znaša med 0,4 in 0,04 mL. V tem primeru nastaja optimalna količina hlapnih spojin. Pri teh testih so bile kljub dodatku kvasa opazne lastnosti kislega testa.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 664.654 : 543.645(043)=163.6
- CX breadmaking/ dough / rising dough / sourdough/ dough fermentation / lactic acid bacteria / yeasts / volatile compounds /secondary metabolites /acetic acid / diacetyl / 3-hydroxy-2-butanone / pH value / bread aroma
- AU REDEK, Tomaž
- 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 2009
- TI INFLUENCE OF YEASTS ON COMPOSITION OF VOLATILE COMPOUNDS IN SPONTANEOUS ACIDIFICATED SOURDOUGH
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 43 p. 11 tab., 8 fig., 53 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB In this graduate work we determined how the addition of yeast, affect the composition and quantity of volatile aromatic compounds in spontaneously sourdoughs. By varying the amount of added living yeast cells, we have tried to increase the number and desired quantity of volatile compounds. During the fermentation we were monitored the formation of volatile compounds, the pH value and flow of CO<sub>2</sub>. Sourdough without the addition of yeast contained a large amount of ethyl acetate, diacetyl, acetic acid. These compounds are typical of the sourdough, which give characteristic aroma of sourdough bread, on the other hand, in large quantities can cause unpleasant aroma. Sourdoughs with added yeast suspension had highest concentrations of 2-methyl butanal, 3-methyl butanal, 1-butanol-3-methyl, ethyl alcohol, phenylethyl 3-hydroxy-2-butanone, which positively affect the aroma of bread. Optimal addition of yeast suspension concerning composition and quantity of volatile compounds was between 0.4 and 0.04 mL, leading to optimal quantity of volatile compounds. Although yeast was added characteristics of sourdough were still observed.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO RAZPREDELNIC .....	VII
KAZALO SLIK .....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	IX
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN CILJ NALOGE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PROCES IN MIKROBIOLOGIJA KISLEGA TESTA .....	3
2.1.1 Surovine .....	3
2.1.1.1 Moka .....	3
2.1.1.2 Voda .....	5
2.1.1.3 Kvas .....	5
2.1.2 Načini zamesa testa .....	6
2.1.2.1 Direktni način – neposredni način zamesa (dodatek pekovskih kvasovk) ....	6
2.1.2.2 Indirektni način – posredni način zamesa (s kvasnim nastavkom) .....	6
2.1.2.3 Zames s kislim testom .....	6
2.1.3 Mikrobna populacija kislega testa .....	7
2.1.4 Interakcije med mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami v kislem testu....	7
2.2 VPLIV KISLEGA TESTA NA KONČNI ZAMES KRUHA; BIOKEMIJSKE SPREMEMBE .....	8
2.2.1 Zakisanje testa .....	9
2.2.2 Proteoliza .....	10
2.2.3 Produkcija hlapnih spojin .....	11
2.2.3.1 Vpliv hlapnih snovi na aromo kruha .....	12
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1 MATERIALI .....	16
3.1.1 Priprava kislega testa .....	16
3.1.2 Priprava kvasne suspenzije .....	16
3.1.3 Določanje živosti kvasnih celic .....	16
3.1.3.1 Aparature .....	16
3.1.3.2 Reagenti, raztopine .....	17
3.1.4 Spremljanje hlapnih spojin med fermentacijo .....	17
3.1.4.1 Aparature .....	17
3.1.4.2 Reagenti, raztopine .....	17
3.1.5 Merjenje pH vrednosti testa med fermentacijo .....	17
3.1.5.1 Aparature .....	17

3.1.6 Merjenje sproščenega CO <sub>2</sub> med fermentacijo .....	17
3.1.6.1 Aparature .....	17
3.2 METODE .....	17
3.2.1 Priprava kislega testa .....	17
3.2.2 Priprava kvasne suspenzije .....	18
3.2.3 Določanje živosti kvasnih celic .....	18
3.2.4 Inokulacija testa s kvasno suspenzijo .....	18
3.2.5 Fermentacija kislega testa .....	18
3.2.6 Določanje hlapnih spojin kislega testa .....	20
3.2.6.1 Princip mikroekstrakcije na igli .....	20
3.2.7 Merjenje pH vrednosti testa .....	20
3.2.8 Merjenje sproščenega CO <sub>2</sub> med fermentacijo .....	20
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>21</b>
4.1 VPLIV NAČINA IN ČASA REHIDRACIJE NA ŽIVOST KVASNIH CELIC .....	21
4.2 SPREMLJANJE PRODUKCIJE HLAJNIH SPOJIN, pH VREDNOSTI IN PRETOKA SPROŠČENEGA CO <sub>2</sub> TEKOM FERMENTACIJE KISLEGA TESTA .....	21
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>34</b>
5.1 RAZPRAVA .....	34
5.2 SKLEPI .....	36
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>37</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>38</b>
<b>ZAHVALA .....</b>	<b>43</b>

## KAZALO RAZPREDELNIC

Preglednica 1: Nekatero potencialne aromatične spojine pšeničnega kruha (Schieberle, 1996; Hansen in Hansen, 1996; Katina, 2005).....	12
Preglednica 2: Hlapne spojine in njihova značilna aroma (Kirchhoff, 2001; Czerny in Schieberle, 2002; Kulp, 2003).....	12
Preglednica 3: Določanje živosti celic z merjenjem fluorescence (Po 30-ih in 90-ih minutah rehidracije).....	21
Preglednica 4: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo kislega testa brez dodatka kvasne suspenzije (kontrolna fermentacija).....	22
Preglednica 5: Spremljanje pH vrednosti in pretoka sproščenega CO <sub>2</sub> med fermentacijo kislega testa brez dodatka kvasne suspenzije (kontrolna fermentacija) .....	23
Preglednica 6: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,04 mL).....	25
Preglednica 7: Spremljanje pH vrednosti in pretoka CO <sub>2</sub> med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,04 mL).....	26
Preglednica 8: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,4 mL).....	28
Preglednica 9: Spremljanje pH vrednosti in pretoka CO <sub>2</sub> med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,4 mL).....	28
Preglednica 10: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (4 mL).....	31
Preglednica 11: Spremljanje pH vrednosti in pretoka CO <sub>2</sub> med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (4 mL).....	32

## KAZALO SLIK

Slika 1: Fermentacija kislega testa in faktorji, ki vplivajo na njo (Katina, 2005).....	9
Slika 2: Nastanek arome kruha med procesom proizvodnje (Katina, 2005).....	14
Slika 3: Shema poskusa .....	16
Slika 4: Shematični prikaz spremljanja fermentacije .....	19
Slika 5: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO <sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu brez dodane kvasne suspenzije (kontrolna fermentacija).....	24
Slika 6: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO <sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu z dodano kvasno suspenzijo (0,04 mL).....	27
Slika 7: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO <sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu z dodano kvasno suspenzijo (0,4 mL).....	30
Slika 8: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO <sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu z dodano kvasno suspenzijo (4 mL).....	33



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

GC-MS	plinska kromatografija z masnim detektorjem
M	molarna koncentracija (mol/l)
NaOH	natrijev hidroksid
SPMA	solid phase microextraction
CFU	colony-forming unit
CO <sub>2</sub>	ogljikov dioksid
<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>
V	volumen
NaOH	natrijev hidroksid
NaCl	natrijev klorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-natrijevhidrogenfosfat
HCl	klorovodikova kislina
S.D.	standardna deviacija
c	koncentracija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijevdihidrogenfosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-kalijevhidrogenfosfat

## 1 UVOD

Sodobni potrošnik želi aromatične, okusne in trajnejše izdelke in temu sledi hitro uvajanje tehnologij, ki v preteklosti na področju pekarstva niso bile tako močno zastopane in med katere lahko uvrščamo tudi tehnologijo kislega testa, ki ima kot tradicionalni proizvod vse pogoje, da izpolni funkcionalne zahteve živil. Ta tehnološki postopek omogoča proizvodnjo visoko kakovostnega kruha.

Kislo testo je verjetno najstarejše znano sredstvo za vzhajanje krušnega testa, saj izhaja že iz antičnih časov. Kot vzhajalno sredstvo se je uporabljalo, dokler ga ni sredi devetnajstega stoletja zamenjal pekovski kvas (Corsetti, 2007). Je zmes moke in vode, fermentirane s strani mlečnokislinskih bakterij in kvasovk, ki navadno izhajajo iz moke in okolja. Uporablja se kot orodje pri oblikovanju kakovosti kruha, saj fermentacija kislega testa služi tako za tvorbo plinov kot za izboljšanje teksture, arome in trajnosti kruha. Učinek kislega testa je rezultat skupnega delovanja žitnih encimov, avtohtonih kvasovk in mlečnokislinskih bakterij, ki povzročijo nastajanje organskih kislin in hlapnih aromatičnih spojin.

Fermentacija kislega testa je bila podrobno preučena, vendar zaradi zapletene narave proces še ni popolnoma razumljiv. Po tradicionalnem postopku se mikroorganizmi namnožujejo po naravni poti. Pekarski izdelki, pripravljene po tradicionalnem postopku, se odlikujejo po intenzivnejši aromi in okusu, ki sta posledica raznovrstne aktivnosti mikroflore v testu. Po drugi strani pa je v velikem interesu uporaba novih, izboljšanih starter kultur, ker omogočajo boljšo kontrolo in optimizacijo procesa. To nam omogoča cenejšo izdelavo kruha, vendar je le ta osiromašen z vidika sensorike. Zaradi tega je izbira mikroorganizmov zelo pomembna (Hansen in Schieberle, 2005).

## 1.1 NAMEN IN CILJ NALOGE

Cilji moderno usmerjene pekovske industrije je proizvodnja kakovostnejše, trajnejše, bolj aromatične in obstojnejše vrste kruha. Pekovski izdelki, pripravljene z dodatkom kislega testa, imajo intenzivnejšo aromo in daljšo obstojnost.

Namen diplomske naloge je podrobno razumevanje biokemijskih sprememb med fermentacijo kislega testa, saj nam le to omogoča optimizacijo procesa in izboljššan končni izdelek. Preučili bomo vpliv znanih koncentracij živih kvasovk na sestavo hlapnih spojin kislega testa iz pšenične moke. Optimalna količina dodanih mikroorganizmov je izredno pomembna, saj vpliva na prevlado določenih mikroorganizmov, od katerih je odvisna sestava hlapnih spojin in posledično tudi kakovost kruha.

S pomočjo analize GC/MS tehnike bomo spremljali sestavo hlapnih spojin, ki so neposredni pokazatelj aktivnosti kvasovk in drugih mikroorganizmov.

Predvidevamo, da dodatek znanih koncentracij kvasovk (pozitivno) vpliva na sestavo in količino hlapnih spojin med fermentacijo in na ponovljivost postopka priprave kislega testa.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PROCES IN MIKROBIOLOGIJA KISLEGA TESTA

#### 2.1.1 Surovine

##### 2.1.1.1 Moka

Moka je glede na delež v masi testa najpomembnejša sestavina. Igra osrednjo vlogo zaradi sposobnosti absorpcije vode in oblikovanja kohezivne viskoelastičnosti testa. V veliki meri vpliva na lastnosti in kakovost pečenih izdelkov, zato so njene značilnosti ključnega pomena. Opredeljujemo jo glede na vsebnost pepela in vode, pa tudi po stopnji mletja (Spicher, 1996). Moko razvrščamo po tipih, ki nam povedo, koliko pepela vsebuje moka (tip 500, 800 in 1100 ter graham moka). Moka tip 500 je bela, vsebuje 0,5 % pepela, dobimo jo z mletjem osrednjih delov žitnega zrna. Vsebuje veliko škroba, malo beljakovin (s tem tudi lepka), malo maščob in celuloze. Lepek veže vodo, zato daje večji izkoristek testa in zadržuje med vzhajanjem nastale pline. Moka vsebuje tudi encimsko aktivnost (Hrovat, 2000 a).

BELJAKOVINE so visokomolekularne organske spojine, sestavljene iz aminokislin in povezane s peptidnimi vezmi. Žito jih vsebuje 8 - 15 %. Beljakovine se nahajajo v vseh anatomskih delih zrna, tehnološko najpomembnejše pa se nahajajo v meljaku (Plestenjak, 2004). Beljakovine moke so odgovorne za edinstvene viskoelastične lastnosti testa. Beljakovine v moki razdelimo po Osbornu, in sicer na albumine in globuline, ki so topni v vodi in slani raztopini. Te dve frakcije predstavljata 20 % vseh proteinov v pšenični moki, vključujeta pa tudi v vodi in soli topne encime v moki. Ostalih 80 % predstavljajo prolamin (topni v etanolu) in gliadini (topni v šibki kislini ali bazi). Med temi sta najpomembnejša gliadin in glutenin, saj tvorita proteinski kompleks, imenovan gluten (lepek). Gliadini so linearni proteinski polimeri, kar pomeni, da aminokisliline tvorijo nerazvejano dolgo verigo z intermolekularnimi disulfidnimi vezmi. Njihova funkcija je plastičnost glutenske mreže. Glutenini tvorijo daljše in zapletenejše strukture, ki vključujejo intermolekularne in intramolekularne disulfidne vezi (Sluimer, 2005).

Glutenski proteini so skladiščni žitni proteini. Gluten vsebuje okoli 80 % proteinov, 8 % lipidov, ostalo so minerali in ogljikovi hidrati. Po splošnem prepričanju je gluten odgovoren za viskoznost testa, sposobnost zadrževanja plina med fermentacijo, delno pa tudi pri formiranju samega testa med peko. Glutenski proteini vsebujejo visok delež glutaminske kisline (okoli 35 % celotnega proteina), oz. v vsaki tretji aminokislini v glutenu najdemo glutaminsko kislino. Ostanke glutaminske kisline se v glutenu pojavijo kot njegovi amidi-glutamini. Vsebuje nizko količino lizina in visoko količino prolina (okoli 14 %). Aminokislinska sestava kaže, da je polovico proteina sestavljena iz dveh aminokislin (glutamina, prolina), 35 % vseh glutenskih aminokislin pa ima hidrofobne stranske verige (Bushuk in Thachuk, 1991).

ŠKROB predstavlja okoli 67 - 68 % pšeničnega zrna in določa glavni sestavni del pšenične moke (78 - 82 %), nahaja se v obliki granul v endospermu zrna. Škrob je sestavljen iz dveh

polimerov glukoze, amiloze in amilopektina. Amiloza je sestavljena iz dolgih linearnih verig glukoz, povezanih z  $\alpha$ -1,4 vezjo, medtem ko je amilopektin sestavljen iz razvejanih verig glukoz, ki so povezane med seboj tako z  $\alpha$ -1,4 vezjo kot tudi z  $\alpha$ -1,6 vezjo. Pšenični škrob vsebuje 25 % amiloze in 75 % amilopektina. Škrob se pri sobni temperaturi nahaja v inertni obliki, kar pomeni, da je skoraj neobčutljiv na encime in vsrkava malo vode. Povišana temperatura (54 - 63°C) povzroči zaklepitev škroba, kar pomeni povečano vezavo vode, škrob začne nabrekati. Posledično škrob izgubi kristalitično obliko in postane amorfen (Massaux in sod., 2008; Sluimer, 2005). Med mletjem žita se škrobna zrnca poškodujejo, škrob izgubi nativne lastnosti, bolje vpija vodo, nabreka in je dovzetnejši na delovanje encimov. Encime, ki so odgovorni za razgradnja škroba, imenujemo amilaze in jih delimo na endoencim  $\alpha$ -amilazo in eksoencim  $\beta$ -amilazo.  $\alpha$ -amilaza cepi  $\alpha$ -1,4 vezi vzdolž škrobne verige in tako zmanjša velikost škrobnih molekul. Produkti te reakcije so manjši ali večji deli škrobne molekule, imenovani dekstrini. Končni produkt encimske razgradnje škroba je maltoza in glukoza. Na nereducirajočem koncu škrobnih verig  $\beta$ -amilaza izmenično cepi  $\alpha$ -1,4 vezi. Nastaneta produkta maltoza in ostanek, imenovan  $\beta$ -limitni dekstrin (Sluimer, 2005).

Drugi encimi, ki sodelujejo pri razgradnji ogljikovih hidratov:

- Amiloglukozidaze razgrajuje molekule škroba na  $\alpha$ -1,6 vezeh.
- Glukoamilaze cepi glukozo z nereducirajočih koncev škrobnih verig in hidrolizira  $\alpha$ -1,4 in  $\alpha$ -1,6 vezi.
- Maltaza cepi sladkor v glukozo; najpomembnejša je maltaza, ki jo vsebujejo kvasovke.
- Invertaza (saharaza) je najdlje poznan encim in razgrajuje saharozo na fruktozo in glukozo (Hrovat, 2000 b; Belitz, 1999).

Moka poleg šroba in neškrobnih polisaharidov vsebuje tudi: celuloze, hemiceluloze in pentozanov tudi majhna količina (okoli 2,8 %) drugih sladkorjev, 0,09 % glukoze, 0,33 % rafinoze, 0,84 % saharoze, 0,06 % fruktoze in 1,45 % glukofuktana. Glukoza nastaja tudi z razgradnjo drugih sladkorjev, zaradi delovanja encimov med vzhajanjem testa pa se pretvori v alkohol in ogljikov dioksid. Dodana saharaza se razgradi v glukozo in fruktozo ter vpliva na potek fermentacije. Celuloza in hemiceluloza predstavljajo prehranske vlaknine, ki jih človekovi prebavni encimi ne razgradijo (Honesey, 1994).

Druge sestavine v moki so še:

- MAŠČOBE, v žitnem zrnu jih je približno 2 %, v beli moki pa manj kot 1 %. Približno 70 % vseh maščobnih kislin predstavljajo linolenske kisline in predvidevajo, da konjugirane dvojne vezi prispevajo k oksidaciji testa pri mešanju (Sluimer, 2005).
- MINERALNE SNOVI, katerih vsebnost označujemo kot odstotek pepela. Povprečna vsebnost pepela na zunanjih plasteh jedra zrna znaša 8 %, v alevronski plasti 15 % in v endospermu 0,4 % (Sluimer, 2005).

### 2.1.1.2 Voda

Voda je pomembna sestavina testa, saj pospešuje nabrekanje in zaklejitev škroba. Njena optimalna količina se spreminja glede na vrsto in tip moke.

Kakovost vode je pomembna predvsem v testu, ki vsebujejo pšenično moko z nizko stopnjo mletja. V pekarstvu uporabljajo higiensko neoporečno pitno vodo iz vodovoda, vendar morajo njeno kakovost stalno preverjati. Biti mora čista, brez vonja in barve, bogata s kisikom in brez patogenih bakterij. V vodi se topijo številni minerali, njeno trdoto pa določamo po vsebnosti Ca in Mg ter njunih soli (karbonati, sulfati). Kakovost vode je pomembna predvsem v testu, ki vsebuje pšenično moko z nizko stopnjo mletja. Minerali v vodi (predvsem karbonati in sulfati) pripomorejo k boljšim lastnostim glutena, preprečujejo sesedanje testa med fermentacijo, poboljša pa se tudi zadrževanje plinov v testu. Za pripravo kvašenega testa je najprimernejša voda srednje trdote. Mehka voda spremeni lastnosti lepka in poslabša lastnosti testa (Hrovat, 2000 a).

### 2.1.1.3 Kvas

Pekovski kvas so v glavnem kvasovke iz rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasovke so enocelični organizmi s premerom okoli 10 µm, kar pomeni, da so desetkrat večji od večine bakterij (Sluimer, 2005). Pekovski kvas ima optimalno temperaturo rasti med 28 in 32 °C in optimalno pH vrednost med 4 in 5. Za svoje delovanje potrebuje hranilne snovi, ki jih sestavljajo predvsem enostavni sladkorji, topne dušikove spojine ter mineralne snovi. Pri običajni proizvodnji kruha se dodaja od 1 do 6 % kvasa glede na maso moke (Spicher, 1996).

Pekovski kvas je na voljo v večjih oblikah:

- **Komprimiran kvas;** je najbolj uporabljena oblika kvasa, pakira se v zavitke po 2,5 kg, 0,5 kg in 42 g, vsebuje 28 - 32 % suhe snovi, pri 4 °C je obstojen 2 - 4 tedne.
- **Kvasno mleko (tekoči kvas);** vsebuje 18 % suhe snovi, obstojen je 1 dan. Kvasno mleko lahko pripeljejo direktno v pekarno, ga prečrpajo s črpalkami in natančno dozirajo.
- **Aktivni suhi kvas;** pridobivajo ga z liofilizacijo (postopek sušenja z zmrzovanjem). Vsebuje 92 - 96 % suhe snovi. Nastali granulati pakirajo v neprepustno embalažo in je obstojen več kot eno leto. Aktivni suhi kvas je treba pred uporabo rehidrirati v vodi na 35 - 43 °C.
- **Instant suhi kvas;** prednost te oblike kvasa je dobra topnost, ki omogoča dodajanje le-tega med sestavine zamesu testa brez predhodne rehidracije. Vsebuje 95 % suhe snovi in je vakumsko pakiran ter obstojen 22 mesecev (Caron, 1996).

Kakovosten kvas mora imeti odlične vzhajalne lastnosti, prenašati mora širok temperaturni razpon, različne pH vrednosti, prisotnost sladkorjev, maščob, konzervansov in hkrati mora dobro proizvajati aromatične snovi (Linko, 1997).

## 2.1.2 Načini zamesa testa

Način zamesa je odvisen od vrste izdelka, tehnološkega postopka izdelave in vrste ter kakovost surovin. Pri vseh postopkih je bistvena fermentacija, ki jo povzročajo kvasovke. Načini zamesa se razlikujejo po času, načinu in številu premesitev ter same tehnike priprave testa. Pri različnih načinih potekata razmnoževanje in rast kvasovk različno. Razlike se kažejo tudi v encimski razgradnji, kar privede do sprememb okusa in arome (Hrovat, 2000 b).

### 2.1.2.1 Direktni način – neposredni način zamesa (dodatek pekovskih kvasovk)

Pri direktnem zamesu, ki se najpogosteje uporablja pri proizvodnji belega kruha, se dodajajo pekovske kvasovke sočasno z drugimi surovinami, ki sestavljajo testo. Tako pripravljeno testo navadno vzhaja od 20 do 80 minut, odvisno od količine porabljenega kvasa (od 0,5 do 4 % glede na količino moke), temperatura vzhajanja (od 26 do 32 °C) in encimske aktivnosti moke (Spicher, 1996).

### 2.1.2.2 Indirektni način – posredni način zamesa (s kvasnim nastavkom)

Pri tem načinu pripravimo kvasni nastavek, ki ga zamesimo iz kvasa, dela moke in dela tekočine. Kvasovke fermentirajo moko 0,5 - 20 ur pri sobni temperaturi (22 - 28 °C). Ko se kvasovke dovolj namnožijo oz. ko je kvasni nastavek v celoti fermentiran, ga zmešamo v glavni zames (Spicher, 1996)..

### 2.1.2.3 Zames s kislim testom

Kislo testo predstavlja fermentacijo moke s strani mlečnokislinskih bakterij in kvasovk, ki so naravno prisotne v kislem testu ali dodane kot starter kulture. Ta način zamesa je sestavljen iz dveh faz; v prvi pripravimo kislo testo, ki ga v drugi fazi zamesimo s preostalim delom moke, vode in ostalimi sestavinami. Kislo testo lahko dobimo na več načinov:

- spontana fermentacija (zmešamo moko in vodo, omogočimo spontano namnoževanje avtohtone mikroflore moke
- osvežitev oz. namnoževanje starega kislega testa
- dodatek starter kultur

Količina kislega testa/kvasnega nastavka dodanega v glavni zames variira med 5 in 40 % (teže testa); nizke količine so značilne za kislata testa in višje za kvasne nastavke (Kulp, 2003).

Dodatek kislega testa pozitivno vpliva na vzhajalne lastnosti in izboljša senzorično kakovost končnega proizvoda (Corsetti, 2007).

### 2.1.3 Mikrobna populacija kislega testa

Kislo testo nastane v procesu, v katerem moka in voda fermentirata s pomočjo mikroorganizmov, komercialnih starter kultur in avtohtone mikroflore moke.

Sestava mikrobne populacije je odvisna od mikroflore uporabljenih surovin, higienskih razmer in je spremenljiva glede na tehnološke pogoje fermentacijskega procesa, vrste, izvora in pogoja skladiščenja moke. Prevladujoči mikroorganizmi v spontano fermentiranih kislih testih so homofermentativni laktobacili in pediokoki, ki so prisotni tako v pšenični kot v rženi moki, v koncentracijah od  $3 \times 10^8$  do  $3 \times 10^9$  CFU/g. Najpogostejše vrste mlečnokislinske bakterije v kislem testu so: *Lb. acidophilus*, *Lb. farciminis*, *Lb. delbrueckii* (obligativno homofermentativne), *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* (facultativno heterofermentativne), *Lb. brevis*, *Lb. sanfranciscensis* in *Lb. fermentum* (obligativno heterofermentativne) (Salovaara, 2004).

V kvasni mikroflori kislega testa je bilo izoliranih več kot 20 vrst kvasov. Prevladujejo pa predvsem kvasovke iz rodov *Saccharomyces* in *Candida*. *Saccharomyces cerevisiae* je zelo pogosta in pomembna za vzhajanje testa (Salim-ur-Rehman, 2006). Med pomembnejše štejemo tudi kvasovke: *Saccharomyces exiguus*, *Candida krusei*, *Pichia norvegensis*, *Hansenula anomal*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Torulopsis holmii* in *Torulopsis unisporus*. Na splošno je znano, da je optimalno razmerje med mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami 100:1 (Stolz, 2003).

Komercialni proces kislega testa se ne zanaša na naključno mikrofloro, uporabljajo komercialne starter kulture ali pa del starega kislega testa (kislo matico). Inokulacija starterja v testo povzroči porast števila mlečnokislinskih bakterij na  $10^7$  do  $10^8$  CFU/g, kar onemogoči delovanje naravno prisotnih mikrobov. Bakterije v kislem testu niso neodvisna skupina bakterij prisotnih samo v kislem testu, ampak jih lahko opišemo kot skupino posebno prilagojenih mlečnokislinskih bakterij, ki jih najdemo tudi v drugih okoljih. Najpomembnejša bakterija izolirana iz kislega testa spada v rod *Lactobacillus* (Stolz, 2003). Izolirani laktobacili so lahko obligativno homofermentativni in fakultativni ali obligativno heterofermentativni. Homofermentativni rodovi lahko fermentirajo heksoze in v glavnem proizvajajo mlečno kislino, medtem ko heterofermentativni rodovi poleg heksoz fermentirajo tudi pentoze ter proizvajajo mlečno kislino, očetno kislino in etanol. Nastanek produktov heterofermentativnih bakterij je odvisen od tipa rodu in procesnih pogojev proizvodnje kislega testa (Röcken in sod., 1992).

### 2.1.4 Interakcije med mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami v kislem testu

Sestava populacije mlečnokislinskih bakterij in kvasovk je v kislem testu zelo raznolika. Uporaba mešanih kultur ima več prednosti, ki se kažejo kot izboljšana aroma, tekstura in daljša svežost pekarskih izdelkov. Kvasovke v mešanih kulturah delujejo v glavnem kot vzhajalno sredstvo, medtem ko mlečnokislinske bakterije največ prispevajo k aromi kruha. V poizkusu, ki so ga izvedli z mešano kulturo komercialnega starterja *L. brevis* in *S. cerevisiae*, se pokaže zmanjšana rast kvasovk in produkcija etanola. Po drugi strani pa se v testu poveča količina glicerola (80 %) in očetne kisline (55 %). Produkcija mlečne kisline pa je ostala nespremenjena (Salim-ur-Rehman, 2006).

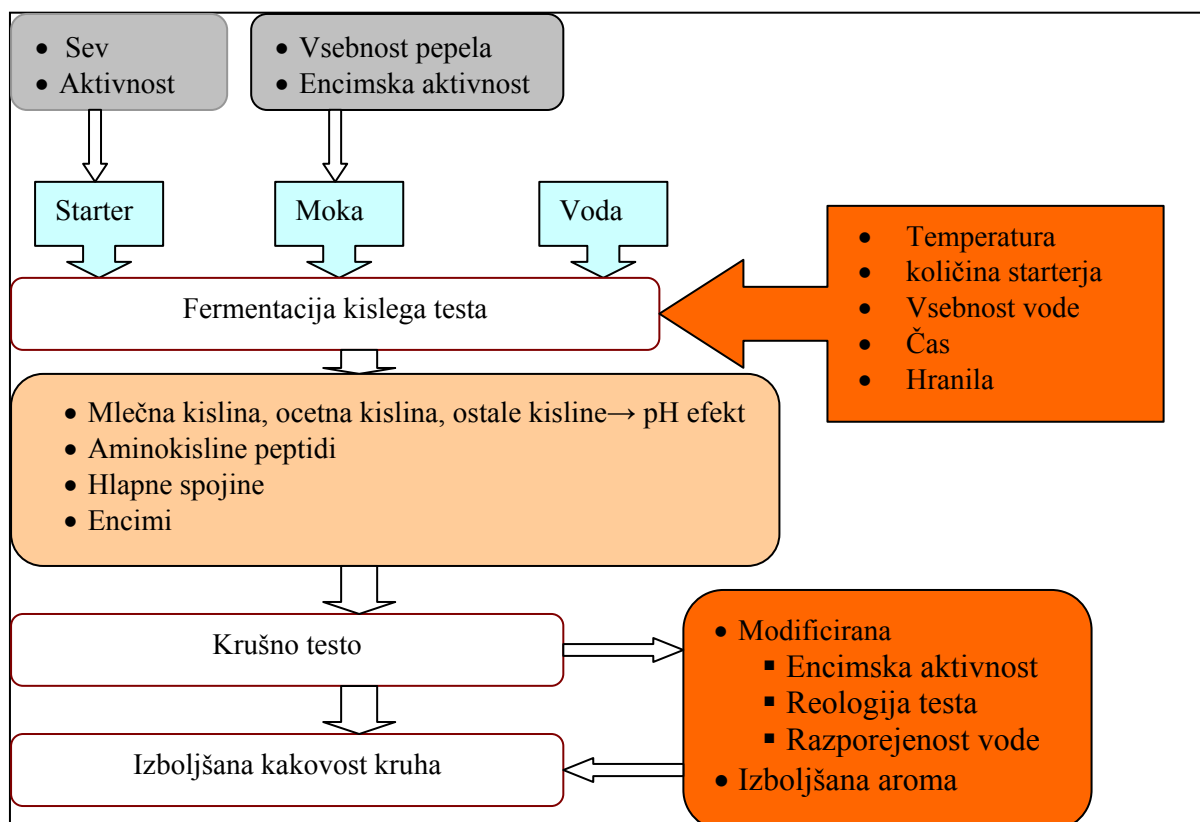


Mikroflora kislega testa je ponavadi sestavljena iz stabilne združbe mlečnokislinskih bakterij in kvasovk, predvsem zaradi njihovih rasti lastnosti. Interakcija mlečnokislinskih bakterij in kvasovk temelji na presnovi ogljikovih hidratov, aminokislin in produkciji CO<sub>2</sub>. Mlečnokislinske bakterije presnavljajo ogljikove hidrate v produkte kot so mlečna in očetna kislina. Na presnovo imajo velik vpliv kvasovke in vrste ogljikovih hidratov. Mlečnokislinske bakterije se množijo in proizvajajo mlečno ter očetno kislino počasneje v zmesi s kvasom, kot v čisti kulturi. Združba *Lb. sanfranciscensis* in *S. cerevisiae* je optimalna za produkcijo očetne kisline.

Tipična združba se kaže med *Lb. sanfranciscensis* in *S. exiguus* ali *C. humillis*. Interakcija teh mikroorganizmov temelji na dejstvu, da *Lb. sanfranciscensis* fermentira predvsem maltozo, kvasovkam, ki pa te ne morejo asimilirati, ostane glukoza. Pomanjkanje tekmovalnosti je ključnega pomena za stabilnost te združbe. Kvasovke kislega testa ne vplivajo na rast *Lb. sanfranciscensis*, ker je njihov omejevalni faktor pH vrednost (npr. *Lb. sanfranciscensis* ne rastejo pod pH 3,8). Rast omenjenih kvasovk je v prisotnosti mlečnokislinskih bakterij omejena zaradi kopičenja presnovnih produktov. Količina glukoze v moki omogočajo rast kvasovkam tekom fermentacije. Te in vse druge mikrobne interakcije vplivajo na sintezo hlapnih spojin, ki prispevajo k okusu in aromi proizvodov pripravljenih iz kislih test (Gobbetti, 1998; De Vuyst, 2005).

## 2.2 VPLIV KISLEGA TESTA NA KONČNI ZAMES KRUHA; BIOKEMIJSKE SPREMEMBE

Na postopek priprave kislega testa vpliva veliko dejavnikov; med najpomembnejše sodijo: sestava mikroflora, fermentativna in encimska aktivnost moke. Ti dejavniki delujejo med seboj interaktivno, saj vplivajo na procese, kot so tvorba kisline, produkcija hlapnih spojin in pretvorba ogljikovih in dušikovih spojin (Martínez-Anaya, 1996). Stopnja in intenzivnost teh pretvorb pogojuje kakovost kruha.



Slika 1: Fermentacija kislega testa in faktorji, ki vplivajo na njo (Katina, 2005)

### 2.1.1 Zakisanje testa

Fermentacija kislega testa temelji na mlečnokislinski in alkoholni fermentaciji, ki je odvisna od sestave mikroflore in fermentacijskih pogojev. Značilen pH kislega testa niha nekje med 3,6 in 3,8. Vsebnost mlečne kisline je med 600 in 800 mg/100 g kislega testa, za očetno kislino je ta vrednost nekoliko manjša, in sicer 80 do 160 mg/100 g kislega testa. Na drugi strani je pH vrednosti kvašenega testa višja in se giblje med 4,7 in 5,8 (Katina, 2005). Najodgovornejši mikroorganizmi za zakisanje testa so mlečnokislinske bakterije, medtem, ko je primarna naloga kvasovk vzhajanje testa (Corsetti, 2007).

Najpoglavitejši dejavniki, ki uravnavajo zakisanje, so fermentabilni ogljikovi hidrati, med katere štejemo saharozo, maltozo, glukozo, fruktozo in oligosaharide. V beli moki je vsebnost le teh majhna, nekje od 1,55 do 1,84 %. Vsebnost ogljikovih hidratov se na račun delovanja amilaz med procesom poveča, nastaja maltoza. Mlečnokislinske bakterije porabljajo različne sladkorje kot vir energije. Sposobne so fermentirati pentoze, heksoze, saharozo in maltozo. Posebnost je *Lb. sanfransiscensis*, kateri hidrolizira maltozo in akumulira glukozo v molarnem razmerju 1:1. Nekatere mlečnokislinske bakterije so fruktoza negativne, kar pomeni, da hitreje rastejo ob prisotnosti maltoze kot glukoze; npr. *Lb. plantarum* ima raje maltozo in glukozo kot fruktozo in slabo fermentira saharozo. Za nekatere heterofermentativne mlečnokislinske bakterije, kot so *Lb. sanfransiscensis*, *Lb. brevis* in *Lb. fermenti* ima kisik spodbujevalen učinek, ki preklopi metabolno pot etanola v metabolno pot kisline, kar poveča nastanek kisline (Martínez-Anaya, 2003).

Produkti kvasovk, ki nastanejo v anaerobnih pogojih, alkoholne fermentacije sta etanol in ogljikov dioksid. *S. cerevisiae* fermentira glukozo, fruktozo in saharozo podobno hitro, saj vsebuje encim invertazo, ki že med mešanjem testa hidrolizira saharozo na glukozo in fruktozo. Kvasovke (*Torulopsis holmii*), ki ne vsebujejo invertaze, ne morejo fermentirati saharoze. Maltozo fermentirajo v kasnejših stopnjah fermentacije, ko že porabijo večino glukoze in fruktoze (Kulp, 2003). Za kvasovke, *C. milleri* in *S. exiguus* je značilno, da ne fermentirajo maltoze.

Interakcija mlečnokislinskih bakterij in kvasovk je pomembna za metabolno aktivnost kislega testa. Martínez-Anaya (2003) dokazuje, da prisotnost kvasovk zmanjša produkcijo kisline. Ko nastopijo *Lb. sanfransicensis*, *Lb. brevislinderi* ali *Lb. plantarum* z maltozo negativno kvasovko *S. exiguus*, se laktobacili polastijo vse maltoze. To povzroči prirast bakterijskih celic in produkcijo kislin. Prisotnost *S. cerevisiae* v združbi povzroči hitro porabo maltoze in glukoze, kar zmanjša metabolizem bakterij in posledično produkcijo kislin.

Produkcija kislin je odvisna od tipa moke, količine vode v testu, časa in temperature fermentacije. Optimalna rastna temperatura laktobacilov je med 30 in 40 °C, kvasovk pa med 25 in 27 °C, odvisno od seva (Brummer in Lorenz, 1991; Lorenz in Brummer, 2003).

### 2.1.2 Proteoliza

Proteolitični encimi v kislem testu razgrajujejo žitne proteine, iz katerih nastajajo proste aminokisliline, ki služijo kot predhodniki vonja in okusa. Proteolitična razgradnja glutena, ki je odgovoren za reološke lastnosti testa, povzroči spremembo v glutenski mreži, ki ima lahko za posledico lepljivo testo (Katina, 2005; Arendt in sod., 2007).

Proteoliza v kislem testu poteka s strani žitnih in bakterijskih proteaz. Obstaja mnogo nasprotujočih mnenj, katere proteinaze so gonilna sila proteolize v kisljih testih. V najnovejših raziskavah avtorji ugotavljajo, da proteoliza v največji meri poteka s strani žitnih proteaz (Thiele in sod., 2002; 2003; Loponen in sod., 2004). Hidroliza gliadinina in glutenina nastopi med fermentacijo zaradi nizkega pH, ki aktivira žitne proteinaze (Thiele in sod., 2003). Žitne proteinaze so aktivne pri pH vrednosti 3,7, medtem ko pri vrednosti 5,5 ne kažejo nobene aktivnosti. Odvisne so od produkcije kislin s strani mlečnokislinskih bakterij, ki so odgovorne za ustvarjanje optimalnih razmer za njihovo delovanje (Thiele in sod., 2002).

Fermentacija kislega testa s pomočjo mlečnokislinskih bakterij vodi v povečano koncentracijo aminokislin v testu, medtem ko fermentacija testa s kvasovkami zniža koncentracijo aminokislin. Raven posameznih aminokislin je odvisna od pH testa, časa fermentacije in porabe aminokislin s strani mikroflora (Thiele in sod., 2002). Do kopičenja aminokislin pride samo pod pogojem, če je stopnja proteolize (tvorba aminokislin) večja od porabe aminokislin s strani mikroflora. Glutaminska kislina, izolevcin in valin so esencialne aminokisliline za rast *Lb. brevis* in *Lb. plantarum*. Kvasovke za rast porabljajo vse aminokisliline, razen lizina, cisteina in histidina, kar zahteva veliko količino aminokislin in nizko molekularnih peptidov med fermentacijo. Na začetku fermentacije je zaradi neprimerne pH vrednosti proteolitična aktivnost nizka; v tej stopnji so kvasovke v log fazi

rasti, kar vzbuja veliko zahtevo po viru dušika. Mlečnokislinske bakterije imajo dolgo lag fazo in v prvih 4-ih urah počasi razvijajo metabolno aktivnost. Po tem sklepamo, da pride do kopičenja aminokislin v kasnejših stopnjah fermentacije (Martínez-Anaya, 2003).

Proteolitična aktivnost je odvisna od procesnih pogojev in mikroflore kislega testa. Stopnja mletja moke in temperatura fermentacije imata pozitiven vpliv na raven aminokislin pri pšenično kislem testu. Prav tako pa na raven aminokislin vpliva vsebnost vode v testu; mehko testo vsebuje majhne količine aminokislin (Martínez-Anaya, 2003). Pozitiven vpliv sproščanja aminokislin pripisujejo tudi polnozrnatim moki, predvsem zaradi večje aktivnosti proteaz v zunanjih plasteh žitnega zrna (Loponen in sod., 2004).

### 2.1.3 Produkcija hlapnih spojin

Hlapne spojine nastajajo tako pri mlečnokislinski kot alkoholni fermentaciji, vendar so koncentracije teh spojin pri fermentaciji kvasovk mnogo večje (Hansen in Hansen, 1994; Meignen in sod., 2001). Vsak sev mlečnokislinskih bakterij proizvaja svoj profil hlapnih spojin. Značilnost homofermentativnih mlečnokislinskih bakterij je velika proizvodnja diacetila, acetaldehida in heksanala, medtem ko so za heterofermentativne seve značilni: etil acetat, alkoholi in aldehidi. Izoalkoholi (2-metil-1-propanol, 2,3-metil-1-butanol), aldehidi in etil acetat so značilne hlapne spojine, ki nastajajo pri fermentaciji kvasovk (Damiani in sod., 1996). Združba mlečnokislinskih bakterij in kvasovk povzroči sinergistično povečanje alkoholov v primerjavi s fermentacijo, kjer so prisotne samo kvasovke. Po drugi strani pa pride do velikega upada bakterijskih hlapnih spojin, etil acetata in karbonilov (Martínez-Anaya, 2003). Na primer, združba *Lb. brevis* ssp *linderi*, ali *Lb. plantarum* in *S. cerevisiae* poveča nastajanje produktov fermentacije kvasovk kot so; 1-propanol, 2-metil-propanol in 3-metilpropanol (Gobbetti in sod., 1995). Vse hlapne spojine ne vplivajo na končno aromo kruha, splošno je znano, da spojine, ki imajo visok 'dilution factor' (intenziteta senzorične zaznave določene hlapne spojine), pomembno vplivajo na končno aromo kruha (Schieberle, 1996). 3-metilbutanol in 2-feniletanol sta najpomembnejši spojini, ki nastaneta s strani fermentacije kvasovk (Gassenmeier in Schieberle, 1995). Czerny in Schieberle (2002) navajata, da so očetna, butanojska, fenilocetna, 2- in 3-metilbutanojska in pentanojska kislina ene najpomembnejših aromatičnih spojin, ki se tvorijo med fermentacijo kislega testa.

Nastajanje hlapnih spojin se poleg izbire starter kulture nadzira tudi z uravnavanjem fermentacijskih pogojev, kot so: čas in temperatura fermentacije, tip moke in konsistenca testa. Dvig temperature s 25 °C na 35 °C pri kisljih testih fermentiranih z mešanimi kulturami pospeši fermentacijo kvasovk. Tipični produkti, ki nastajajo pri 25 °C, so: etil acetat, očetna kislina in mlečna kislina, medtem ko so pri temperaturi 30 °C značilne: etanol, 2-metil-1-propanol in 3-metil-1-butanol. Pri temperaturi 35 °C se profil hlapnih spojin ni spremenil (Gobbetti in sod., 1995). V čvrstem testu hlapne spojine tvorijo mlečnokislinske bakterije, v mehkem pa so prednostne spojine etanol, etil acetat in izoalkoholi, za katere predvidevamo, da jih proizvajajo kvasovke. Moke z visoko vsebnostjo pepela povečajo vsebnost hlapnih spojin pri kisljih testih fermentiranih z mešanimi kulturami (Czerny in Schieberle, 2002). Predpostavka, da čas fermentacije vpliva na nastajanje hlapnih spojin, ni popolnoma raziskana, ne glede na to pa v glavnem domnevajo, da daljši čas fermentacije izboljša aromo končnega proizvoda. Gobbetti in sod.

(1995) ugotavljajo povečane ravni hlapnih spojin v kislem testu, ko se je čas fermentacije podaljšal s 3 na 9 ur, vendar pa se je količina hlapnih spojin po 24-ih urah fermentacije zmanjšala, najverjetneje, ker so hlapne spojine izparele iz testa. Schieberle (1996) ugotavlja, da se je med 16-urno fermentacijo kvasnega nastavka količina 3-metilbutanal in 2-feniletanol v prvih osmih urah povečala, v naslednjih osmih urah pa zmanjšala, kar pripisuje pomanjkanju aminokislinskih prekurzorjev.

### 2.1.3.1 Vpliv hlapnih snovi na aromo kruha

Aroma je ena najbolj cenjenih senzoričnih lastnosti, ki določujejo kakovost kruha. Razdelimo jo na aromo skorje in sredice. Tvori se tekom fermentacije testa in peke kruha in na splošno velja, da proces peke vpliva na aromo skorje kruha, medtem ko je fermentacija ključnega pomena za aromo sredice (Hansen in Schieberle, 2005). Sestavljena je iz mnogo hlapnih in nehlapnih spojin med katere uvrščamo mnoge alkohole, aldehide, ketone, kisline, estre, derivate etrov in furanov, ogljikovodike, ketone, laktone, pirizine, pirole in derivate žveplovih spojin. Nekatere potencialne spojine, ki vplivajo na aromo kruha, so podane v Preglednici 1 in 2.

**Preglednica 1: Nekatere potencialne aromatične spojine pšeničnega kruha (Schieberle, 1996; Hansen in Hansen, 1996; Katina, 2005)**

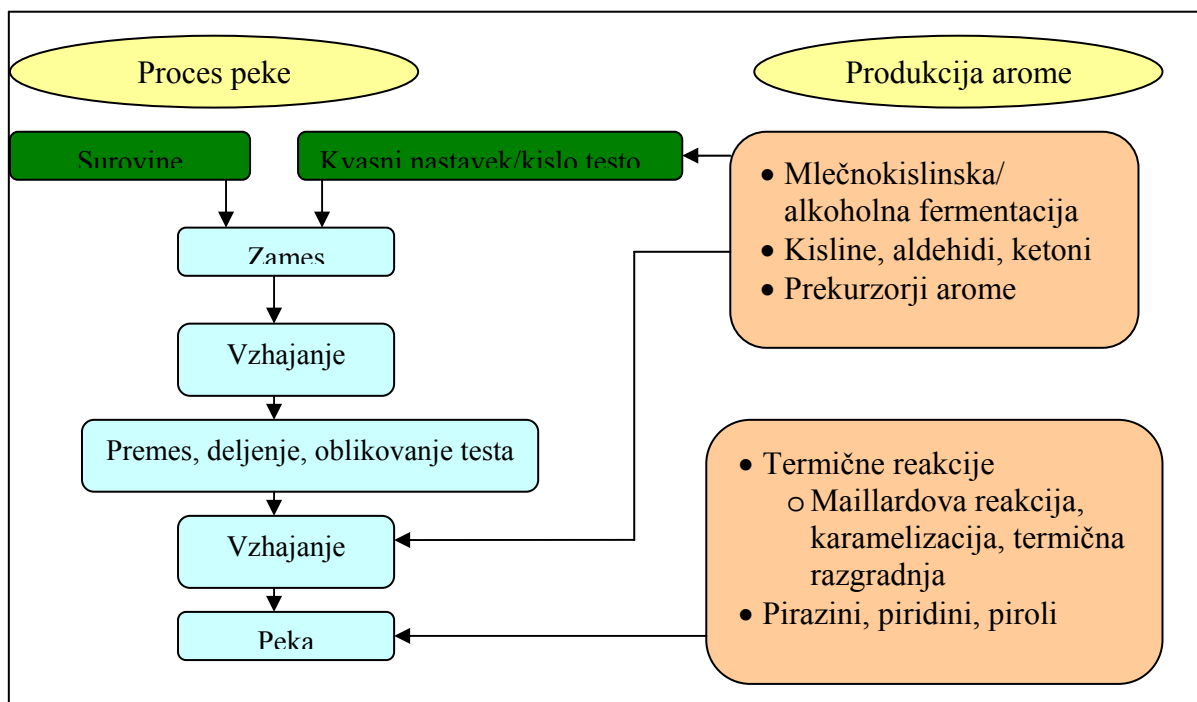
Spojina	Lokacija		Izvor arome
	Sredica	Skorja	
Ocetna kislina	X	X	Fermentacija
Metional	X	X	Peka, Streckerjeva razgradnja
Diacetil	X	X	Fermentacija
(E)-2-nonenal	X	X	Razgradnja lipidov
(E,E)-2,4 decadienal	X		Razgradnja lipidov
Fenilacetaldehid	X	X	Peka, Streckerjeva razgradnja
Acetaldehid	X		Fermentacija
2-metilpropanal	X		Steckerjeva razgradnja
3-metilbutanol	X	X	Peka, Streckerjeva razgradnja
3-metilbutanal		X	Peka, Streckerjeva razgradnja
2-metilbutanal		X	Peka, Streckerjeva razgradnja
Benziletanol	X		
2-feniletanol	X		
Etanol	X		Fermentacija
1-octen-3-one	X	X	Razgradnja lipidov
2-acetilpiridin		X	Peka, Maillardova reakcija
4-(Z)heptanal		X	Razgradnja lipidov
4-hidroksi-2,5,-dimetil-3(2h)furanon		X	Peka, Maillardova reakcija
2-acetil-1-pirolin		X	Peka, Maillardova reakcija

**Preglednica 2: Hlapne spojine in njihova značilna aroma (Kirchhoff, 2001; Czerny in Schieberle, 2002; Kulp, 2003)**

Spojina	Tip arome
3-metil butanal	Slad
2-metil butanal	Slad
Heksanal	Trava
2- metil propanal	Slad
Ocetna kislina	Kislo
(E)-2-nonenal	Maščobe
Butanojska kislina	Sladko, žarko maslo
fenilacetaldehide	Med
(E,E)-2,4-decadienal	Vosek, maščoba
2-Fenil etanol	Cvetlica
Etanol	Alkohol
Propanol	Zažgano
2-metil-1-propanal	Slad
Etil acetat	Eter, ananas
Heksil acetat	Hruški, grenko-sladko
3-metil butanol	Slad
2-acetil-1-pirolin	Praženje, pokovka
Metional	Kuhan krompir
Feniletil etanol	Posušena-ovenela roža
1-heksanol	Alkohol
3-hidroksi-2-butanon	Maslo
1-pentanol	Alkohol
Diacetil	Maslo

Nobene od naštetih spojin ne moremo označiti kot ključno za aromo kruha, pač pa delujejo sinergistično. Po drugi strani pa prisotnost določene spojine ne pomeni, da bo prispevala k aromi, saj mora koncentracija le te preseči prag zaznave, drugače jo druge spojine prevladajo (Meilgaard in sod., 1999).

Aroma kruha nastaja, ko je relativno nearomatična moka podvržena spremembam med procesom priprave kruha. Fermentacija ter peka sta glavni izvor arome kruha in sta ključnega pomena. Hlapne spojine nastajajo iz prekursorjev, prisotnih v moki in nastalih z encimatsko ali mehansko razgradnjo. Med najpomembnejše prekursorje uvrščamo sladkorje in aminokisliline (Katina 2005). Nastanek arome kruha med procesom proizvodnje je ilustrirana na Sliki 2.



Slika 2: Nastanek arome kruha med procesom proizvodnje (Katina, 2005)

Kvasovke med proizvodnjo kruha fermentirajo sladkorje, kar vodi v veliko število hlapnih spojin, za katere menijo, da so odgovorne za posebne značilnosti arome kruha. Kruh, narejen iz nefermentiranega testa, ima drugačno aromo od kruha pripravljene iz fermentiranega testa. Fermentacija je bistvenega pomena pri oblikovanju arome; naredili so kruh, pri katerem so kot vzhajalno sredstvo uporabili pecilni prašek, in ugotovili, da sta bila struktura kruha in čas pečenja normalna, medtem ko je bila aroma nesprejemljiva (Schieberle; 1989). Naredili so tudi primerjavo kruhov, pripravljenih s kemičnim vzhajalnim sredstvom in kruhov, pripravljenih s kvasom. Ugotovili so presenetljivo razliko v vsebnosti 2-acetil-1-pirolina. V kemično vzhajanem kruhu je zastopana kot manjša komponenta, medtem ko je v kvasnem kruhu to ena najpomembnejših spojin. 2-acetil-1-pirolin opredeljujejo kot eno najpomembnejših spojin, ki vplivajo na aromo skorje kruha in ustvari tipično aromo po pečenju. Poleg fermentacije sladkorjev so kvasovke odgovorne za pretvorbo prostih aminokislin v aromatične spojine kot so alkoholi (Corsetti, 2007). Ti alkoholi imajo en ogljik manj, kot določene aminokisliline, npr. valin, levcin in fenilalanin se pretvorijo v izobutanol, 3-metilbutanol in 2-feniletanol (Gassenmeier in Schieberle, 1995).

Med peko kruha termične reakcije (kot so karamelizacija in Maillardova reakcija) vplivajo na aromo in barvo skorje. Pojasnili so tudi pomembno vlogo pekovskih kvasovk kot vir prekurzorjev za nastajanje 2-acetil-1-pirolina in 2-acetiltetrahidropiridina (pomembna aromatična spojina skorje kruha). Ti spojini se tvorita v in zunaj kvasnih celic, kot razgradni produkti sladkorjev in aminokislin tekom Maillardove reakcije reagirajo med seboj. 2-acetil-1-pirolin nastane v reakciji med piruvaldehidom (nastaja v kvasnem metabolizmu sladkorjev) in pirolinom (produkt Streckerjeve razgradnje iz prolina ali ornitina) (Schieberle, 1990).

Vpliv kislega testa na aromo kruha temelji na treh dejavnikih:

- Nastanek kislin,
- nastanek prekurzorjev arome kot so aminokislina,
- nastanek hlapnih spojin.

Aroma kruha je odvisna od stopnje zakisanja, količine prostih aminokislin in pomembnih aromatičnih spojin kislega testa. Zakisanje testa je temeljnega pomena za aromo kruha; majhne koncentracije kisline izboljšajo aromo kruha, v velikih količinah pa povzročijo oster neprijeten vonj, ki prekrije celotno aromo kruha. Maksimalna količina kislin v pšeničnem kruhu, ki ne povzročajo kisle arome, je 0,35 % teže moke, kar ustreza pH vrednosti 4,9. Povečana koncentracija kislin stopnjuje kislino aromo kruha (Katina, 2005).

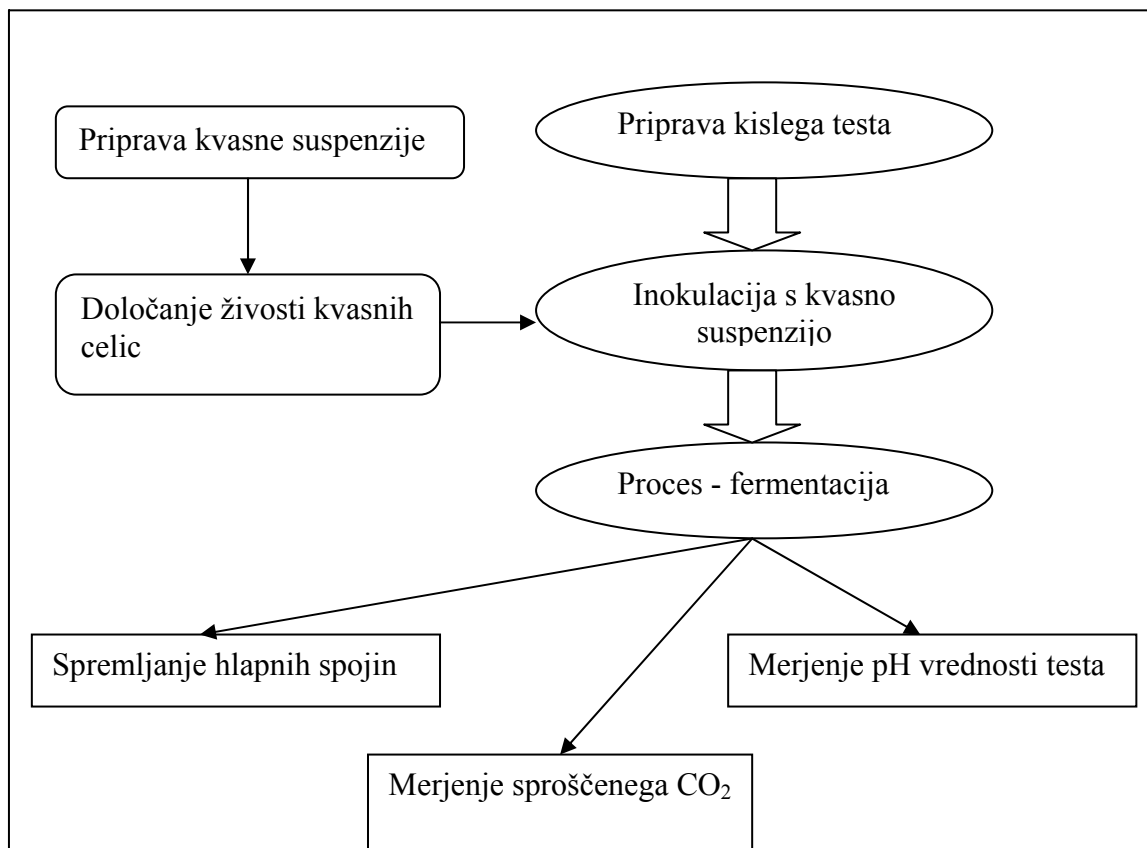
Velika količina prostih aminokislin je neposredno povezana s povečano intenziteto arome kruha, še posebej aromo po pečenju. Glavni dejavnik povečane arome po pečenju je nastajanje ornitina in prolina med fermentacijo kislega testa (Thiele in sod., 2002). V kvasnih nastavkih so ravni leucina in fenilalanina ključni dejavniki za nastanek 3-metilbutanola in 2-feniletanola, ki so odgovorni za aromatične note krušne sredice (Gassenmeier in Schieberle, 1995).

Nastajanje določenih hlapnih spojin v kislem testu/kvasnem nastavku, pomembno vpliva na senzorične lastnosti kruha. Kemično zakisanim testom, ki vsebujejo ustrezne količine aminokislina kislega testa se aroma kruha bistveno ne izboljša (Thiele in sod., 2002). To dokazuje, da ima tvorba izvornih hlapnih spojin pomembno vlogo. Nastajanje hlapnih spojin v kvasnih nastavkih je bilo prikazano s strani mnogih avtorjev (Gassenmeier in Schieberle, 1995; Hansen in Hansen, 1996; Czerny in Schieberle, 2002). Spojine, odgovorne za aromo kruha, nastajajo že v predvzhajalnem procesu. Skupno količino teh spojin v glavnem zamesu povečamo z uporabo kvasnega nastavka. Ne glede na to avtorji Brummer in Unbehend (1997); Lorenz in Brummer (2003) navajajo, da ima uporaba kvasnega nastavka le manjši vpliv na intenziteto krušne arome. Poročajo tudi, da podaljšana fermentacija povzroči zmanjšanje, npr. okusa po praženju v primerjavi s krajšim procesom (Zehentbauer in Grosch, 1998). Vsebnost ključnih spojin krušne sredice, 2-fenil etanola in 3-metil butanola, ki izhajajo iz kvasnega nastavka, se gibljeta med 14 in 48 %, odvisno od količine kvasovk in vode v nastavku. Glede na to, da kvasni nastavek vsebuje majhne količine kislin in aminokislin, je s strani hlapnih spojin njihov vpliv na aromo kruha zelo majhen (Gassenmeier in Schieberle, 1995).

Med procesom priprave kislega testa imajo pogoji fermentacije pomemben vpliv na senzorične lastnosti kruha. Vsebnost pepela moke je pomemben dejavnik, ki določa intenzivnost arome kruha. (Rouzaud in Martínez-Anaya, 1997). Moka z visoko vsebnostjo pepela poveča metabolno aktivnost kislega testa, nastajanje kislin, aminokislin in hlapnih spojin, kar poveča jakost arome kruha. Ne glede na to, so bili kruhi pripravljene iz moke z nizko vsebnostjo pepela boljše senzorične kakovosti. Namreč s strani potrošnika aroma po kislem ni vedno zaželena, zlasti v primeru povečane očetne kisline. Kot omenjeno, vpliv časa fermentacije kislega testa/kvasnega nastavka ni dobro raziskan, splošno znano je, da podaljšana fermentacija vodi v intenzivnejšo aromo v primerjavi s kruhom, ki je narejen s kratkim procesom proizvodnje (Katina, 2005).



### 3 MATERIALI IN METODE



Slika 3: Shema poskusa

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Priprava kislega testa

- pšenična moka tip 500 (Žito)
- bidestilirana voda

##### 3.1.2 Priprava kvasne suspenzije

- liofilizirane kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (saf-instant, Lesaffre)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) za pripravo 50 mM vodne raztopine (A)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) za pripravo 50 mM vodne raztopine (B)  
V(A) + V(B) ⇒ 50 mM kalijev fosfatni pufer (pH = 7,0)

##### 3.1.3 Določanje živosti kvasnih celic

###### 3.1.3.1 Aparature

- čitalec mikrotiterskih plošč Safire 2 (Tecan)
- centrifuga (Eppendorf)

### 3.1.3.2 Reagenti, raztopine

- komplet "LIVE/DEAD<sup>®</sup> Funga Light<sup>™</sup> Yeast Viability Kit" (Molecular Probes)
- PBS pufer

Priprava PBS pufra:

10x PBS pufer

- Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> : 1,09 g
- Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O: 0,42 g
- NaCl: 9 g
- ddH<sub>2</sub>O do 100 mL

pH smo uravnali s HCl ali NaOH na 7,2.

Za test smo uporabili 1x PBS pufer in ga sterilizirali s filtracijo

### 3.1.4 Spremljanje hlapnih spojin med fermentacijo

#### 3.1.4.1 Aparature

- Plinski kromatograf: 7890N (Agilent, ZDA)
- Kolona: SUPELCOWAX-10; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Supelco)
- Mikroekstrakcijska igla: 85 μm Carboxen/PDMS (Supelco)
- Detektor: 5975C (Agilent, ZDA)

#### 3.1.4.2 Reagenti, raztopine

- Delovni standard: 6-metil-5-hepten-2-on (Aldrich)

### 3.1.5 Merjenje pH vrednosti testa med fermentacijo

#### 3.1.5.1 Aparature

- pH meter: Testo 206-pH2 (Testo AG)

### 3.1.6 Merjenje sproščenega CO<sub>2</sub> med fermentacijo

#### 3.1.6.1 Aparature

- Elektronski merilnik pretoka: AFS 1430 in AFS 1400 ((Sensirion, Švica)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava kislega testa

V 200 g pšenične moke (tip 500) smo zatehtali 240 g bi-destilirane vode.

### 3.2.2 Priprava kvasne suspenzije

V stekleno 250 mL čašo smo zatehtali 20 g liofiliziranih kvasovk in 200 g 50 mM fosfatnega pufru (pH=7) ali 200 g vodovodne vode.

### 3.2.3 Določanje živosti kvasnih celic

Živost kvasnih celic smo preverjali v suspenziji, ki je bila pripravljena v pufru (50 mM fosfatni pufer) ali v vodi (vodovodna voda).

Uporabili smo komplet "LIVE/DEAD<sup>®</sup> Funga Light<sup>™</sup> Yeast Viability Kit" (Molecular Probes). Komplet vsebuje dve barvili: SYTO 9 in propidijev jodid (PJ). Ti barvili se razlikujeta po valovni dolžini vzbujanja in emisije. Barvilo SYTO 9 ima valovno dolžino vzbujanja 488 nm, emisije pa 530 nm, pri barvilu propidijev jodid pa je valovna dolžina vzbujanja 488nm, emisije pa 650 nm. Barvilo SYTO 9 detektira poškodovane in intaktne celice in prodre do nukleinskih kislin, s katerimi ustvari kompleks, ki flouescira, medtem ko pa propidijev jodid barva samo poškodovane celice, saj lahko prehaja le preko poškodovane membrane (Haugland, 2002).

Postopek je bil sestavljen iz sledečih korakov:

1. V 1,5-mL Eppendorf centrifugirko smo prenesli 1 mL kvasne suspenzije..
2. Centrifugirali smo 5 minut pri 14 000 obr./min.
3. Odstranili smo supernatant, sedimentu dodali 1 mL filtriranega PBS pufru in premešali.
4. Centrifugirali smo 5 minut pri 14 000 obr./min.
5. Odstranili smo supernatant, dodali 1 mL filtriranega PBS pufru in premešali.
6. Pripravili smo 1 mL celične suspenzije s koncentracijo  $1 \cdot 10^6$  celic/mL (razredčitve smo pripravili s PBS pufrom).
7. Dodali smo 1  $\mu$ l barvila SYTO 9 in 1 $\mu$ l barvila 2 PJ – delali smo v temi.
8. Premešali.
9. Vzorce smo prenesli za 30 minut na 37 °C.
10. Premešali smo in 200  $\mu$ l prenesli v jamico mikrotiterske ploščice.
11. Izmerili smo fluorescenco na čitalcu mikrotiterskih plošč Safire 2 (Tecan).

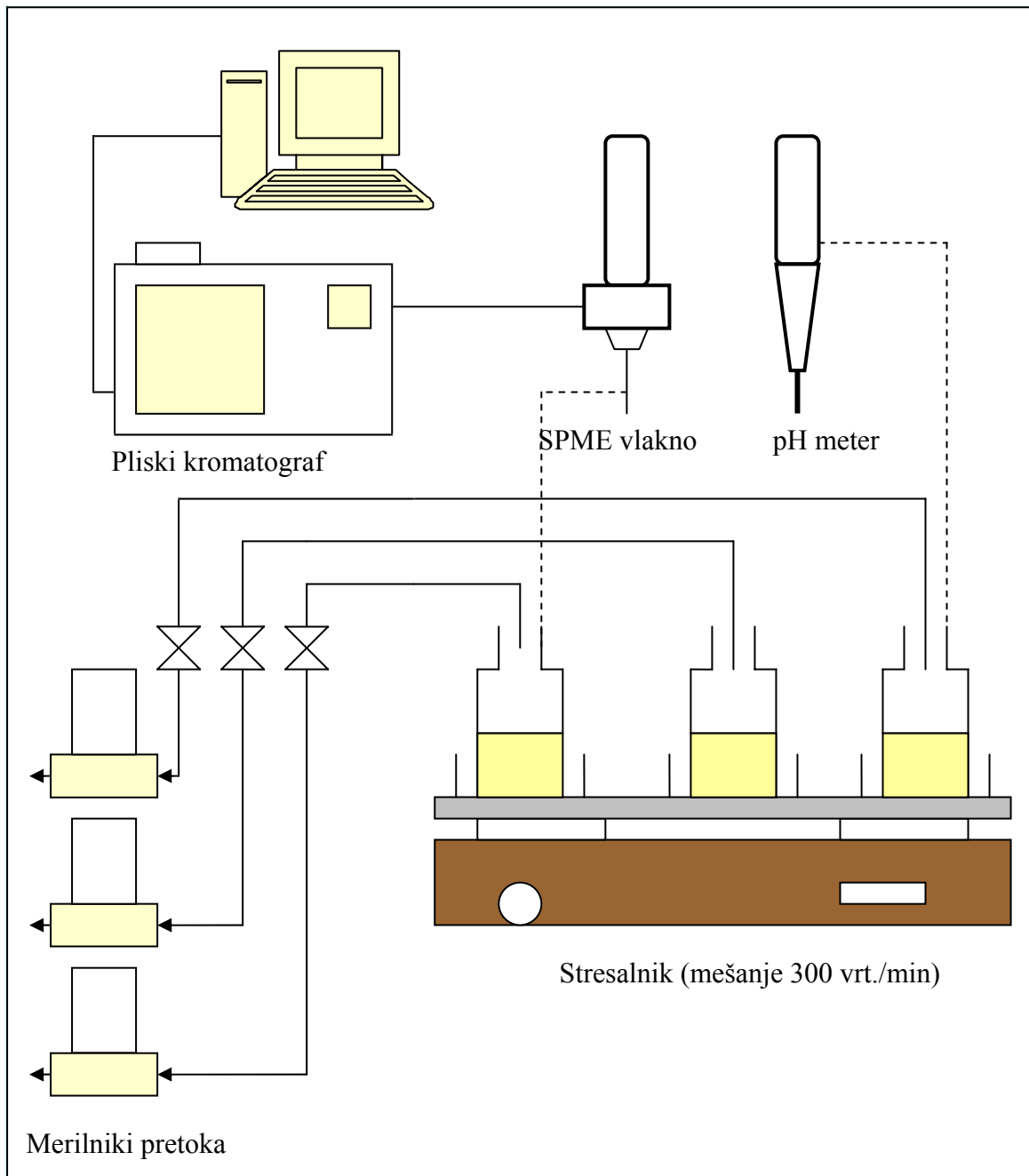
### 3.2.4 Inokulacija testa s kvasno suspenzijo

V fermentacijskih poskusih smo kislemu testu dodali različne količine (4 mL, 0,4 mL in 0,04 mL) kvasne suspenzije. Kot kontrolo smo uporabili mešanico moke in bi-destilirane vode brez dodatka kvasne suspenzije.

### 3.2.5 Fermentacija kislega testa

Sestavine (pšenična moka tip 500, bidestilirana voda in kvasna suspenzija) smo zatehtali v 500 mL čaše in jih temeljito premešali. Zmes smo prelili v litrske reagenčne steklenice, jih zamašili z gumijastimi zamaški in postavili na mešalo. Vse skupaj smo pustili da fermentira pri sobni temperaturi ( $23 \pm 2$  °C) do vrednosti pH  $\sim 4$ . Spremljali smo

sproščanje CO<sub>2</sub>, pH vrednost testa in koncentracijo hlapnih spojin (Slika 3). Poskus smo opravili v treh ponovitvah in rezultate podali kot povprečne vrednosti.



Slika 4: Shematični prikaz spremljanja fermentacij

### 3.2.6 Določanje hlapnih spojin kislega testa

#### 3.2.6.1 Princip mikroekstrakcije na igli

Ekstrakcijo in koncentriranje hlapnih spojin smo izvedli z mikroekstrakcijo na igli (SPME). Ekstrakcijska igla je prevlečena s stacionarno fazo, na katero se adsorbirajo hlapne spojine iz analiziranega vzorca. Čas in temperaturo ekstrakcije izberemo pred analizo vzorca. Po končani ekstrakciji iglo prenesemo v injektor plinskega kromatografa, kjer poteče desorpcija vzorca. Prednosti te metode so enostavnost, hitrost, neuporaba topil in cenovna ugodnost. Izbiramo lahko med adsorbenti različne polarnosti, kar omogoča selektivno ekstrakcijo vzorca.

- Parametri parameri mikroekstrakcije na igli
  - temperatura ekstrakcije: 25 °C;
  - čas ekstrakcije: 30 min;
  - tip mikroekstrakcijske igle: 85 µm Carboxen/PDMS (Supelco).
  
- Analitski pogoji plinske kromatografije (GC-MS)
  - Kolona: SUPELCOWAX-10; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Supelco);
    - začetna temperatura: 40 °C (1 min);
    - temperaturni gradient: 5 °C/min;
    - končna temperatura: 200 °C (1 min);
    - nosilni plin: helij 6,0 s pretokom 1 mL/min pri 40 °C.
  - Plinski kromatograf: 7890N (Agilent, ZDA).
  - Injektor: zaprt 2 min;
    - temperatura: 250 °C, čas desorpcije vlakna: 5 min.
  - Detektor: 5975C (Agilent, ZDA);
    - potek ionizacije molekul z elektroni energije 70 eV;
    - temperatura ionskega izvora 230 °C;
    - temperatura kvadropola 150 °C
    - masni spekter: full-scan mode (30-150 m/z)

#### 3.2.7 Merjenje pH vrednosti testa

Meritve smo opravili s prenosnim pH metrom Testo 206-pH2 (Testo AG). Merjenje je potekalo ročno, v časovnih intervalih, ki so se ujemali z mikroekstrakcijo.

#### 3.2.8 Merjenje sproščenega CO<sub>2</sub> med fermentacijo

Pretok sproščenega CO<sub>2</sub> smo merili z elektronskim merilnikom pretoka AFS 1430 in AFS 1400 (Sensirion, Švica). Merjenje je potekalo preko računalnika v časovnih intervalih (~ 3 min).

## 4 REZULTATI

### 4.1 VPLIV NAČINA IN ČASA REHIDRACIJE NA ŽIVOST KVASNIH CELIC

Vsebnost vode v liofiliziranih kvasovkah (približno 8 %) ne zadostuje za aktivno presnovo, zato je pred inokulacijo nujen proces rehidracije. Med rehidracijo so kvasne celice podvržene hipoosmotskemu šoku, kar pomeni, da voda zaradi prepustnosti membrane prehaja v celico in jim povrne aktivnost. Za preživetje in fiziološko stanje kvasovk so ključnega pomena sestava, osmotski tlak in temperatura rehidracijskega medija. Te lastnosti lahko spremenijo potek fermentacije; vplivajo zlasti na lag fazo rasti. Dolga lag faza predstavlja priložnost, da avtohtone kvasovke prevladajo (Soubeyrand in sod., 2006; Molinero, 2006).

Na podlagi določanja živosti kvasnih celic smo določili medij za rehidracijo liofiliziranega kvasa. Za medij smo uporabili vodovodno vodo in pa 50 mM fosfatni pufer (pH=7,0).

#### **Preglednica 3: Določanje živosti celic z merjenjem fluorescence (Po 30-ih in 90-ih minutah rehidracije)**

<b>Medij</b>	<b>F(30 min)</b>	<b>F(90 min)</b>
Vodovodna voda	1760	/
50 mM fosfatni pufer (pH = 7,0)	2041	/
Kvasna suspenzija (vodovodna voda)	40644	42201
Kvasna suspenzija (fosfatni pufer)	55932	62224

Na podlagi teh podatkov smo ugotovili, da je živost celic večja v fosfatnem pufru. Zato smo kot medij pri pripravi kvasne suspenzije uporabili fosfatni pufer.

### 4.2 SPREMLJANJE PRODUKCIJE HLAPNIH SPOJIN, pH VREDNOSTI IN PRETOKA SPROŠČENEGA CO<sub>2</sub> TEKOM FERMENTACIJE KISLEGA TESTA

Spremljali smo koncentracije 23-ih hlapnih spojin, pH vrednost in pretok sproščenega CO<sub>2</sub>. Hlapne spojine smo identificirali s pomočjo retenzijskih časov in masnih spektrov (NIST/EPA/NIH Mass spectral library, 2005). Vrednosti teh parametrov so odvisne od prisotnih mikroorganizmov v kislem testu.

**Preglednica 4: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo kislega testa brez dodatka kvasne suspenzije (kontrolna fermentacija)**

Ime spojine	Čas po začetku fermentacije (h)											
	0 h		5 h		10 h		22 h		29 h		S.D.	
	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.		
2-metil propanal	0,41	0,11	0,44	0,12	0,66	0,13	2,08	0,12	0,00	0,00	0,00	
Etil acetat	4,29	2,43	3,65	0,60	2,45	0,13	27,17	13,69	397,28	93,51	0,08	
2-metil butanal	0,16	0,14	0,12	0,10	0,28	0,02	0,20	0,06	0,10	1,25	1,75	
3-metil butanal	0,35	0,30	0,28	0,25	0,58	0,07	1,95	0,08	1934,03	71,76	14,76	
Etanol	81,91	41,58	61,93	6,73	51,94	0,90	1155,01	28,72	15,99	28,33	0,95	
Diacetil	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,11	6,36	0,56	4,42	0,37	0,18	
1-propanol	4,24	1,01	3,28	0,30	3,78	0,32	27,08	2,84	0,49	1,61	0,82	
Toluen	44,17	1,31	43,25	1,22	42,13	1,34	0,85	0,39	0,10	2,04	0,60	
Heksanal	5,14	2,28	4,51	0,63	3,90	0,04	1,90	0,39	1,27	8,46	0,41	
2-metil-1-propanol	2,02	0,92	1,48	0,13	1,41	0,13	5,87	0,53	4,38	0,29	0,31	
1-butanol-3-metil	0,24	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	1,63	0,33	1,58	0,31	11,33	
1-butanol	18,46	1,86	17,38	1,36	20,19	0,23	12,16	1,27	8,46	0,41	0,10	
1-penten-3-ol	4,46	1,64	4,58	0,37	6,62	0,42	17,42	2,01	14,41	0,10	0,15	
D-limonen	3,07	2,48	2,21	0,36	1,91	0,38	0,00	0,00	0,60	0,15	371,66	
3-metil-1-butanol	20,03	9,02	14,64	2,35	12,70	1,24	624,47	431,37	605,62	371,66	1,14	
1-pentanol	17,54	2,69	16,42	1,04	20,43	0,31	38,07	6,01	65,77	1,14	0,31	
Heksil acetat	0,09	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	3,11	0,38	2,75	0,31	310,03	
3-hidroksi-2-butanon	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	
1-heksanol	37,44	3,75	34,64	2,22	38,07	0,87	844	844	844	844	844	
1-okten-3-ol	1,74	0,16	1,62	0,04	1,89	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	
Ocetna kislina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	
Fenil etil etanol	0,57	0,77	0,45	0,19	0,00	0,00	0,25	0,04	0,52	0,29	0,29	
Delovni standard	983		983		983		983		983		983	

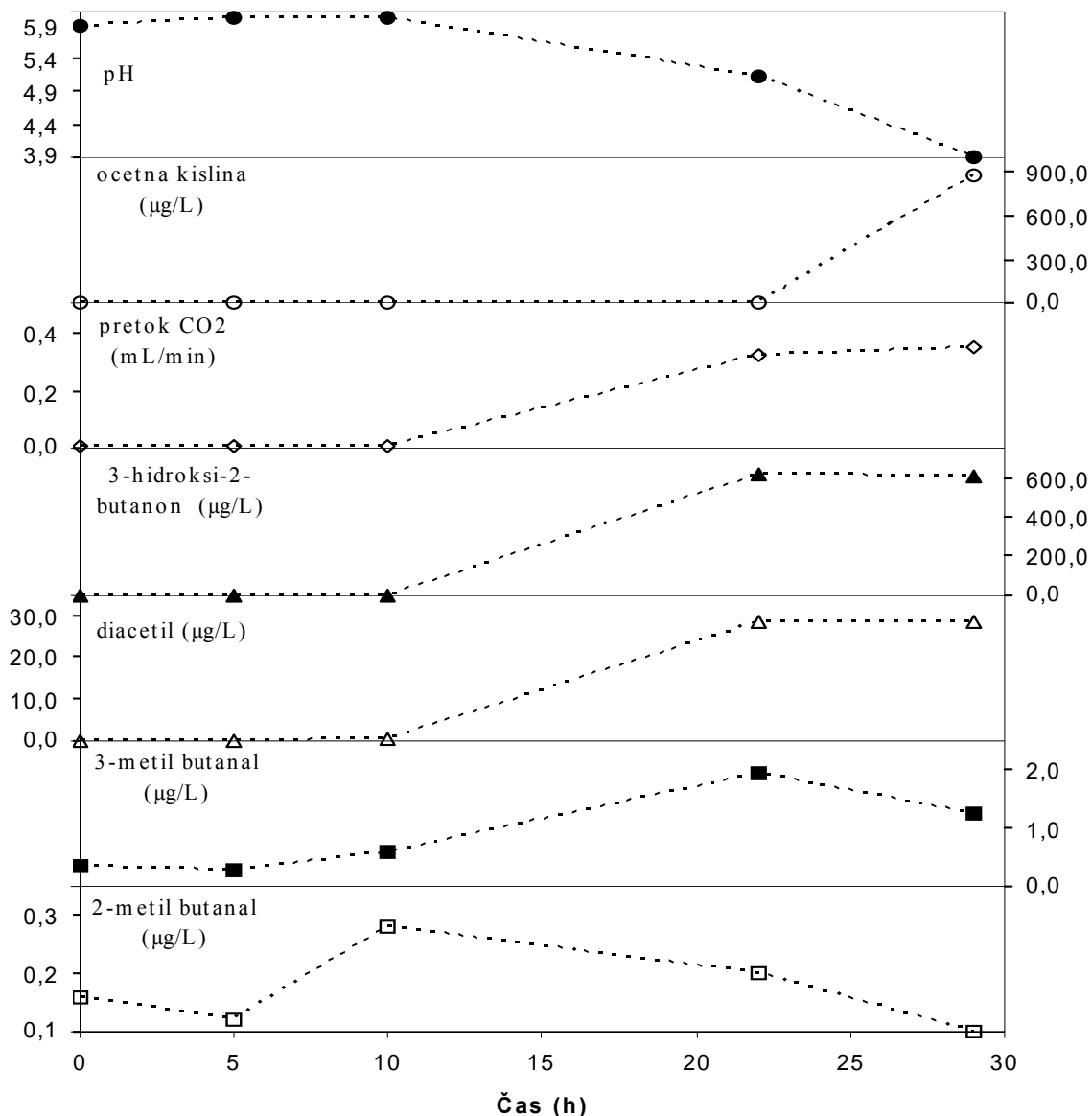
**Preglednica 5: Spremljanje pH vrednosti in pretoka sproščenega CO<sub>2</sub> med fermentacijo kislega testa brez dodatka kvasne suspenzije (kontrolna fermentacija)**

Čas po začetku fermentacije (h)	pH vrednost	S.D.	Pretok sproščenega CO <sub>2</sub> (mL/min)	S.D.
0	5,93	0,03	0,01	0,01
5	5,99	0,01	0,01	0,01
10	5,99	0,01	0,01	0,00
22	5,11	0,12	0,32	0,11
29	3,90	0,05	0,35	0,17

V preglednici 4 so podane meritve, vsebnosti hlapnih spojin pri spontani fermentaciji kislega testa. Na osnovi rezultatov ugotavljamo, da se koncentracije spojin etil acetata, etanola, diacetila, heksanala, 3-hidroksi-2-butanona, očetne kisline in 1-heksanola s časom povečajo. Za vse spojine je značilno, da so tipični produkti mlečnokislinskih bakterij.

Iz preglednice 5 je razviden šibak pretok CO<sub>2</sub>, katerega mlečnokislinske bakterije tvorijo v majhnih količinah. Hiter padec pH vrednosti je posledica nastajanja očetne kisline. Vse to kaže na prevlado mlečnokislinskih bakterij in posledično na mlečnokislinsko fermentacijo.





**Slika 5: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO<sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu brez dodane kvasne suspenzije (kontrolna fermentacija)**

Slika 5 prikazuje velike koncentracije 3-hidroksi-2-butanona in očetne kisline, kar kaže na delovanje mlečnokislinskih bakterij. pH vrednost pada sočasno z naraščanjem koncentracij očetne kisline, 3-hidroksi-2-butanona, diacetila in 3-metil butanala in pretokom sproščenega CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> se sprošča v majhnih količinah. Po tem lahko sklepamo, da v kislem testu prevladujejo heterofermentativne mlečnokislinske bakterije. Koncentracije 2-metil butanala in 3-metil butanala so nizke, te nastajajo pretežno s strani kvasovk.

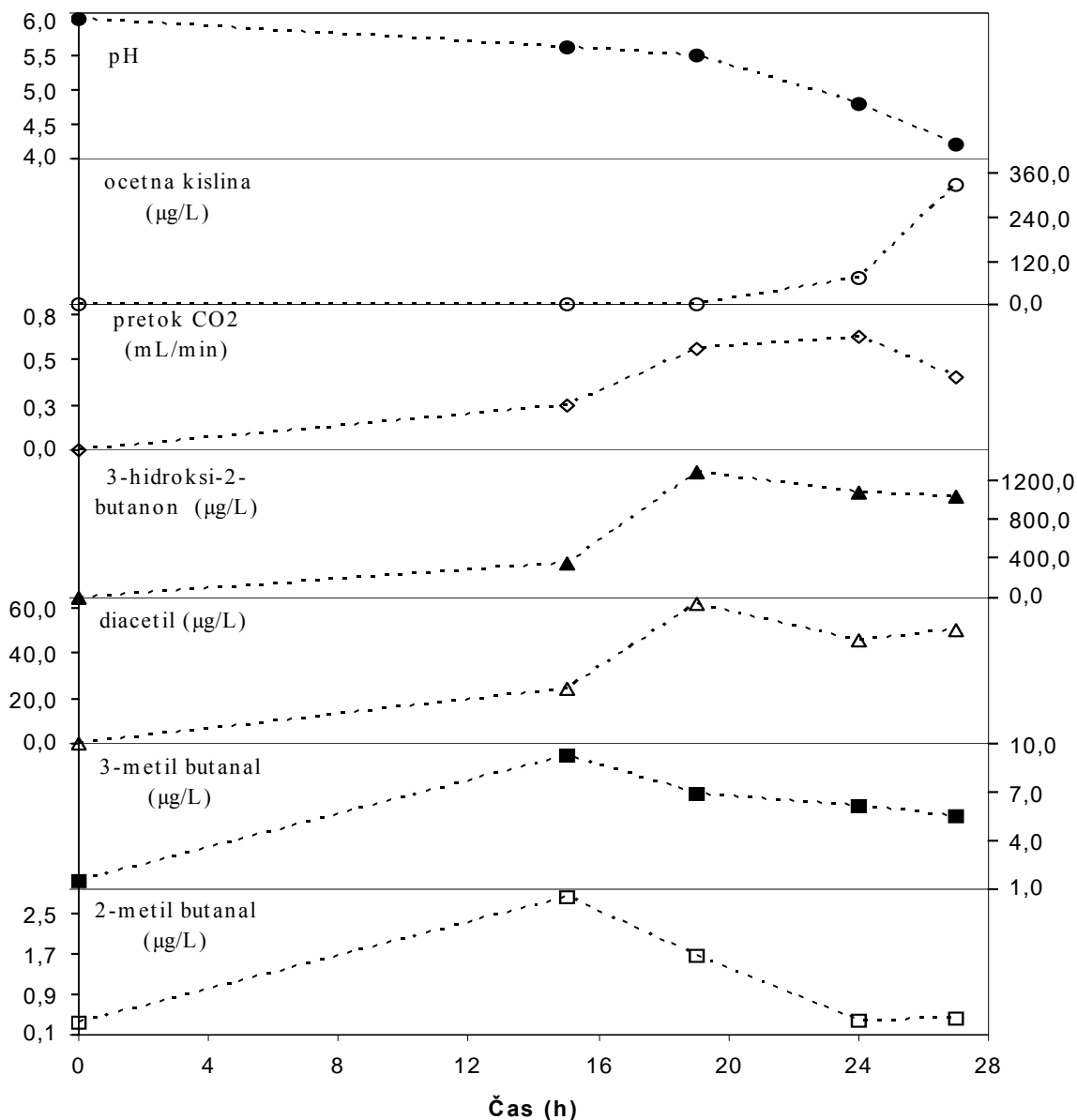
Preglednica 6: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,04 mL)

Ime spojine	Čas po začetku fermentacije (h)											
	0 h		15 h		19 h		24 h		27 h		S.D.	
	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.		
2-metil propanol	0,80	0,52	16,45	14,03	6,78	1,73	4,65	2,82	0,56	0,14		
Etil acetat	0,00	0,00	10,70	9,36	30,29	8,39	122,71	80,92	287,10	156,67		
2-metil butanal	0,36	0,21	2,85	2,44	1,66	0,17	0,37	0,12	0,41	0,24		
3-metil butanal	1,46	1,19	9,26	7,89	6,80	2,55	6,10	3,98	5,50	2,73		
Etanol	42,89	22,56	1200,69	1020,75	2119,86	205,23	2496,99	26,14	2647,40	154,15		
Diacetil	0,00	0,00	23,94	20,97	62,01	24,17	45,98	2,15	50,17	13,71		
1-propanol	3,68	0,82	21,95	15,51	35,55	7,37	36,49	3,13	34,67	4,15		
Toluen	42,57	2,12	39,52	17,16	26,96	2,94	21,96	2,44	21,83	2,58		
Heksanal	3,09	0,31	2,57	1,70	1,14	0,52	1,42	0,85	0,70	0,83		
2-metil-1-propanol	0,51	0,21	5,56	4,42	10,89	1,76	13,91	1,48	14,22	1,76		
1-butanol-3-metil	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,82	2,74	7,28	4,80		
1-butanol	8,34	1,67	9,99	0,96	10,21	2,41	9,09	2,56	9,32	2,50		
1-penten-3-ol	4,85	0,58	5,04	1,19	4,51	0,97	3,69	0,47	3,92	0,77		
D-limonen	1,49	0,15	1,64	0,58	1,11	0,42	1,11	0,19	1,40	0,12		
3-metil-1-butanol	4,07	0,93	55,85	44,87	106,61	21,58	137,69	42,44	148,47	40,72		
1-pentanol	14,14	1,32	15,21	3,83	14,12	3,17	12,47	0,69	13,94	1,71		
Heksil acetat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,08		
3-hidroksi-2-butanon	0,00	0,00	339,14	296,72	1278,35	530,61	1081,26	120,16	1031,92	505,45		
1-heksanol	26,11	1,77	38,25	2,07	52,31	11,48	53,59	0,76	66,01	6,53		
1-okten-3-ol	1,51	0,08	2,15	0,15	2,21	0,53	2,10	0,11	2,75	0,24		
Ocetna kislina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	74,71	64,79	329,56	291,06		
Fenil etil etanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68	0,52	0,89	0,36	1,98	0,24		
Delovni standard	991		991		991		991		991			

**Preglednica 7: Spremljanje pH vrednosti in pretoka CO<sub>2</sub> med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,04 mL)**

Čas po začetku fermentacije (h)	pH vrednost	S.D.	Pretok sproščenega CO <sub>2</sub> (mL/min)	S.D.
0	6,00	0,01	0,01	0,01
15	5,60	0,03	0,25	0,05
19	5,50	0,02	0,56	0,23
24	4,76	0,46	0,63	0,44
27	4,21	0,15	0,40	0,24

V preglednici 6 je razvidna povečana koncentracija 2-metil butanala, 3-metil butanala, etanola, 1-propanola, 3-metil-1-butanola, 3-hidroksi-2-butanona, ki jih med fermentacijo proizvajajo kvasovke. Iz preglednice je razvidno, da koncentracije nekaterih spojin v določenem času dosežejo maksimalno koncentracijo in proti koncu fermentacije začno upadati. To opazimo pri 2-metil butanalu, 3-metil butanalu in 1-propanolu. Pri fermentaciji kvasovk nastaja CO<sub>2</sub>, kar je razvidno tudi iz preglednice 7, saj ugotavljamo rahlo povečan pretok sproščenega CO<sub>2</sub>. Vrednosti pH so podobne kontrolni fermentaciji.



**Slika 6: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO<sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu z dodano kvasno suspenzijo (0,04 mL)**

V grafikonu (Slika 6) je razvidna povečana koncentracija 2-metil butanala in 3-metil butanala, prav tako se poveča pretok sproščenega CO<sub>2</sub>. Ta trend se pokaže po 12 urah fermentacije, kar nakazuje na vpliv delovanja kvasovk. V nadaljevanju fermentacije je razviden padec pH vrednosti in sorazmerno povečevanje koncentracije ocetne kisline. Nastajajo velike koncentracije 3-hidroksi-2-butanona in diacetila. Vse to kaže na združbo hetero- in homofermentativne mlečnokislinske bakterije. Zaradi relativno velike koncentracije ocetne kisline pripisujemo pomembno vlogo heterofermentativnim mlečnokislinskim bakterijam.

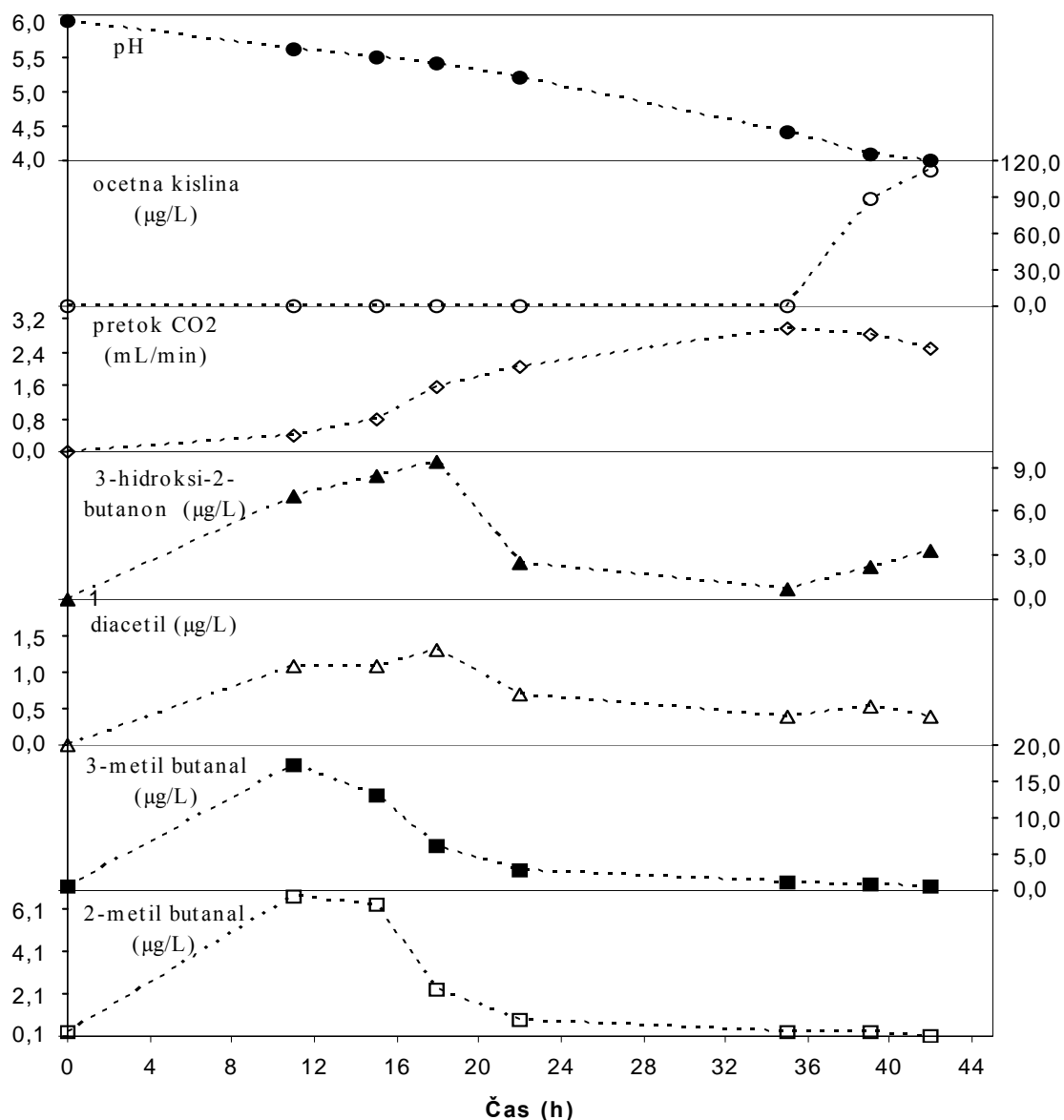
Preglednica 8: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,4 mL)

Ime spojine	Čas po začetku fermentacije (h)																							
	0 h		11 h		15 h		18 h		22 h		35 h		39 h		42 h									
	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.								
2-metil propanal	0,33	0,10	13,42	2,33	17,73	7,46	4,09	0,97	0,86	0,36	0,39	0,17	0,28	0,12	0,11	0,10								
Etil acetat	0,11	0,04	11,75	2,31	14,68	2,50	23,07	3,21	27,93	3,73	164,13	83,31	279,09	95,51	314,92	87,55								
2-metil butanal	0,26	0,03	6,72	1,75	6,36	2,65	2,33	0,15	0,88	0,34	0,26	0,09	0,26	0,05	0,14	0,03								
3-metil butanal	0,63	0,08	17,23	4,16	13,06	6,40	6,12	1,15	2,61	0,95	0,97	0,42	0,80	0,15	0,46	0,14								
Etanol	42,56	0,52	926,90	81,17	1110,56	81,11	1267,52	43,62	1409,68	52,83	2059,94	77,46	2210,85	41,12	2174,77	23,39								
Diacetil	0,00	0,00	1,07	0,30	1,07	0,38	1,29	0,37	0,68	0,06	0,37	0,10	0,51	0,15	0,37	0,11								
1-propanol	0,56	0,11	14,32	2,59	15,65	3,52	18,82	2,39	17,14	1,60	10,32	1,01	11,90	0,56	10,87	1,21								
Toluen	16,91	1,04	12,62	1,88	9,78	1,71	9,36	0,73	7,46	0,53	4,71	0,49	4,56	0,37	4,01	0,51								
Heksanal	4,15	0,22	1,70	0,27	0,86	0,21	0,70	0,18	0,34	0,14	0,35	0,21	0,28	0,16	0,20	0,09								
2-metil-1-propanol	0,00	0,00	2,95	0,90	7,61	1,60	12,67	1,23	13,06	1,91	15,91	1,24	20,22	0,86	19,19	1,34								
1-butanol-3-metil	0,00	0,00	0,25	0,06	0,58	0,06	1,18	0,19	1,91	0,37	38,64	22,65	74,05	30,02	88,83	30,81								
1-butanol	3,06	0,32	1,37	0,32	1,03	0,27	1,29	0,18	1,20	0,17	0,67	0,16	0,86	0,21	1,06	0,55								
1-penten-3-ol	1,24	0,10	1,58	0,35	1,16	0,20	1,52	0,18	1,45	0,42	0,94	0,61	0,94	0,37	1,11	0,32								
D-limonen	2,42	0,15	1,72	0,23	1,43	0,13	1,53	0,10	1,36	0,12	1,22	0,23	1,27	0,07	1,30	0,20								
3-metil-1-butanol	2,31	0,34	40,18	10,19	70,03	16,44	106,73	14,42	125,60	22,09	171,53	21,72	224,22	27,07	216,17	31,51								
1-pentanol	5,99	0,40	5,47	1,04	4,41	0,90	5,18	0,71	4,36	0,54	3,16	0,67	3,27	0,14	2,64	0,19								
Heksil acetat	0,14	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,50	0,34	0,90	0,37	1,18	0,39								
3-hidroksi-2-butanon	0,00	0,00	7,06	1,53	8,36	2,27	9,39	2,70	2,46	0,51	0,69	0,17	2,21	1,05	3,21	1,12								
1-heksanol	22,52	1,64	31,24	4,23	28,81	4,10	34,44	1,91	30,70	3,09	31,88	4,37	35,61	3,15	32,97	3,98								
1-okten-3-ol	1,68	0,11	2,66	0,44	2,30	0,29	2,79	0,15	2,41	0,24	3,21	0,48	3,55	0,28	3,40	0,24								
Oocetna kislina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	88,13	78,21	112,31	46,29								
Fenil etil etanol	0,00	0,00	2,37	0,18	9,07	0,31	24,29	4,50	44,23	8,01	133,54	15,20	170,43	5,46	176,21	37,50								
Delovni standard	948		948		948		948		948		890		890		890									

**Preglednica 9: Spremljanje pH vrednosti in pretoka CO<sub>2</sub> med fermentacijo testa z dodano kvasno suspenzijo (0,4 mL)**

Čas po začetku fermentacije (h)	pH vrednost	S.D.	Pretok sproščenega CO <sub>2</sub> (mL/min)	S.D.
0	5,96	0,03	0,01	0,00
11	5,58	0,02	0,42	0,15
15	5,49	0,04	0,79	0,32
18	5,42	0,08	1,56	0,55
22	5,24	0,05	2,04	0,74
35	4,39	0,25	2,96	1,28
39	4,10	0,11	2,82	1,31
42	3,96	0,09	2,50	0,48

Iz preglednice 8 je razviden vpliv dodane kvasne suspenzije na koncentracijo hlapnih spojin. V ospredje prihajajo hlapne spojine značilne za kislota testa fermentirana z dodatkom kvasovk; etanol, 2-metil butanal, 3-metil butanal, 3-metil-1-butanol, fenil etil etanol. Opazimo, da koncentracije 2-metil butanala in 3-metil butanala proti koncu fermentacije upadejo oz. izginejo. Pretok CO<sub>2</sub> je sorazmerno večji z dodatkom kvasne suspenzije, upadanje vrednost pH testa je počasnejše, glede na kontrolno fermentacijo.



**Slika 7: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO<sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu z dodano kvasno suspenzijo (0,4 mL)**

Na grafikonu (slika 7) so razvidne majhne koncentracije 3-hidroksi-2-butanona, ocetne kisline in diacetila. Koncentracije 3-metil butanala in 2-metil butanala naraščajo sorazmerno s povečevanjem pretoka sproščenega CO<sub>2</sub>. Povečan pretok sproščenega CO<sub>2</sub> je merilo fermentacije kvasovk. Med fermentacijo ob padcu pH vrednosti, ne določimo ocetne kisline. Po tem sklepamo, da nastaja mlečna kislina in potrdimo prisotnost homofermentativnih mlečnokislinskih bakterij. Na koncu nastane nekaj ocetne kisline vendar je te relativno malo.

**Preglednica 10: Spremljanje koncentracij hlapnih spojin med fermentacijo testa z dodane kvasne suspenzije (4 mL)**

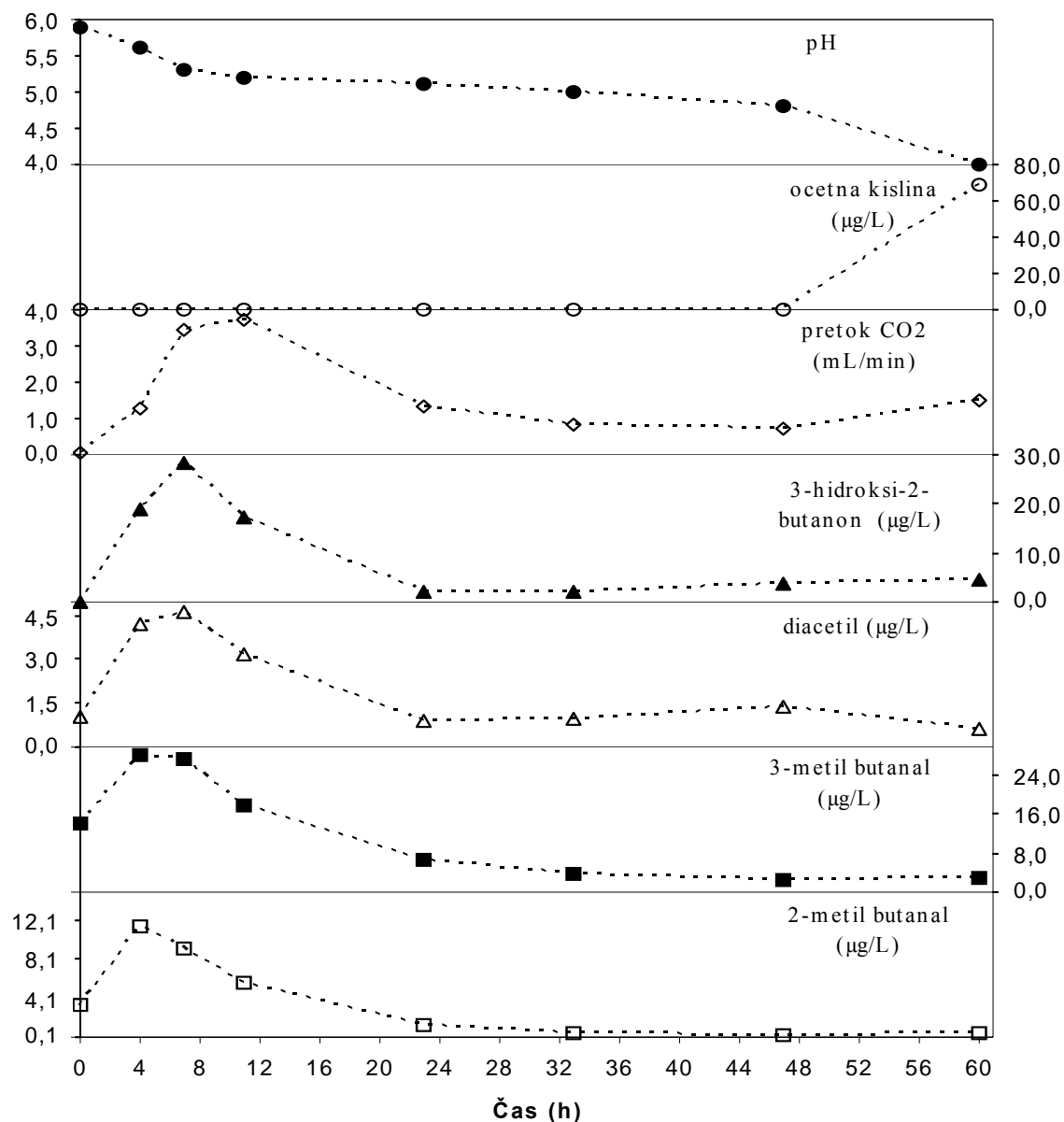
Ime spojine	Čas po začetku fermentacije (h)															
	0 h		4 h		7 h		11 h		23 h		33 h		47 h		60 h	
	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.	c(µg/L)	S.D.
2-metil propanol	18,03	2,60	75,70	0,39	17,92	2,10	10,50	1,66	2,43	0,75	0,77	0,64	0,54	0,30	0,93	0,58
Etil acetat	6,31	0,81	138,93	4,54	130,23	13,63	115,66	11,43	95,80	2,18	110,66	13,33	195,47	77,86	543,25	41,70
2-metil butanal	3,45	0,26	11,38	1,32	9,19	0,21	5,73	1,01	1,30	0,41	0,61	0,35	0,38	0,14	0,52	0,34
3-metil butanal	14,08	2,71	28,28	3,44	27,58	1,15	17,69	2,02	6,50	1,89	3,67	2,10	2,54	1,32	2,93	1,40
Etanol	1098,49	21,71	2403,56	52,43	3075,06	53,59	3284,21	120,70	3678,05	13,27	3723,08	59,51	3373,29	1402,44	4214,07	102,40
Diacetil	1,01	0,34	4,23	0,17	4,65	0,20	3,14	0,32	0,91	0,05	0,97	0,16	1,35	0,90	0,60	0,71
1-propanol	11,44	1,21	45,68	2,16	53,92	5,90	38,29	3,94	29,80	0,70	38,52	3,99	44,63	18,27	53,00	8,10
Toluen	36,34	1,52	23,38	1,01	19,16	1,17	14,75	0,64	11,09	0,60	9,07	0,30	7,10	2,23	6,89	0,47
Heksanal	3,10	0,35	1,26	0,11	0,73	0,11	0,43	0,18	8,64	0,11	6,40	5,51	0,15	0,10	0,38	0,15
2-metil-1-propanol	8,82	2,88	31,68	1,56	43,75	4,19	44,72	4,38	61,20	0,74	65,90	4,01	63,37	23,81	73,44	8,52
1-butanol-3-metil	0,06	0,06	1,70	0,15	3,19	0,19	6,43	0,39	8,82	0,32	11,96	0,92	32,60	12,54	136,95	20,03
1-butanol	5,94	0,10	2,84	0,14	2,87	0,28	2,28	0,25	1,71	0,08	1,73	0,17	1,66	0,63	1,73	0,11
1-penten-3-ol	2,14	0,03	1,61	0,17	1,33	0,18	1,46	0,51	0,33	0,02	0,35	0,08	0,58	0,34	1,16	0,26
D-limonen	1,45	0,27	0,98	0,03	0,98	0,25	0,84	0,02	0,63	0,03	0,65	0,09	0,69	0,31	0,77	0,06
3-metil-1-butanol	50,31	4,28	188,11	9,32	413,08	35,49	544,76	39,51	669,95	9,59	657,13	30,78	587,67	217,53	678,24	65,42
1-pentanol	9,99	0,09	8,00	0,42	7,70	0,28	5,58	0,46	6,08	0,27	5,47	0,35	4,21	1,03	4,38	0,45
Heksil acetat	0,11	0,03	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,46	0,02
3-hidroksi-2-butanon	0,00	0,00	19,09	1,97	28,57	3,04	17,13	3,21	2,07	1,02	1,87	0,25	3,57	1,93	4,32	4,02
1-heksanol	28,26	2,24	32,13	1,52	35,51	1,14	32,03	2,48	32,55	1,54	29,87	1,36	28,51	8,94	32,80	2,74
1-okten-3-ol	0,82	0,15	0,81	0,07	1,00	0,05	1,07	0,13	1,12	0,07	1,26	0,16	1,37	0,57	1,83	0,29
Oocetna kislina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	69,56	60,99
Fenil etil etanol	0,00	0,00	0,77	0,21	25,60	0,23	81,05	12,56	132,01	3,61	124,00	13,08	130,56	39,24	190,20	18,77
Delovni standard	885		885		885		885		885		885		913		913	



**Preglednica 11: Spremljanje pH vrednosti in pretoka CO<sub>2</sub> med fermentacijo testa z dodane kvasne suspenzije (4 mL)**

Čas po začetku fermentacije (h)	pH vrednost	S.D.	Pretok sproščenega CO <sub>2</sub> (mL/min)	S.D.
0	5,93	0,01	0,06	0,01
4	5,58	0,08	1,31	0,29
7	5,26	0,02	3,44	0,76
11	5,16	0,02	3,73	0,71
23	5,05	0,01	1,36	1,07
33	4,99	0,02	0,83	0,67
47	4,76	0,14	0,72	0,79
60	3,94	0,03	1,52	0,99

V preglednici 10 je razvidna povečana koncentracije spojin kot so: 2-metil butanal, 3-metil butanal, etanol, 1-propanol, heksanal, 2-metil-1-propanol, 1-butanol-3-metil acetat, 3-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, fenil etil, etanol, kar je pokazatelj metabolne aktivnosti kvasovk. Proti koncu fermentacije opazimo upad koncentracij 2-metil butanala, 3-metil butanala in diacetila. Povečana aktivnost se kaže tudi v velikem pretoku sproščenega CO<sub>2</sub>. Padec pH vrednosti se obnaša podobno kot v testu z dodatkom 0,4 mL kvasne suspenzije. V tem primeru težko govorimo o kislem testu, saj so produkti in količine le teh tipične za kvašena testa.



**Slika 8: Odnos med pH vrednostjo, pretokom sproščenega CO<sub>2</sub> in koncentracijami hlapnih spojin v testu z dodano kvasno suspenzijo (4 mL)**

V grafikonu (Slika 8) je viden vpliv kvasovk, ki se kaže v velikem pretoku sproščenega CO<sub>2</sub>, koncentracijah 3-metil butanala in 2-metil butanala in počasnem padcu pH vrednosti. Podobno kot v prejšnjem primeru ob padcu pH vrednosti ne določimo očetne kisline. Za padeč je odgovorna mlečna kislina, produkt homofermentativnih mlečnokislinskih bakterij.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil preučiti, kako dodatek kvasa, vpliva na sestavo in koncentracijo hlapnih spojin v spontano kisanih testih. Z različno količino dodane kvasne suspenzije smo skušali povečati število in koncentracijo zelenih hlapnih spojin. Med fermentacijo smo spremljali sestavo in koncentracije hlapnih spojin, sočasno smo izmerili tudi pH vrednost testa in pretok sproščenega CO<sub>2</sub>. V analizo smo vključili 23 tipičnih hlapnih spojin, ki so prisotne v sami moki in pa spojin, ki nastajajo tekom fermentacije kot produkt mlečnokislinske in alkoholne fermentacije. Te spojine imajo velik vpliv na aromo kruha in posledično kakovost končnega izdelka.

V testu, katerega fermentacija je potekala brez dodanega testa (kontrolna fermentacija), so nastajale spojine, ki so produkti, značilni za mlečnokislinske bakterije. Seveda so bile v mikroflori prisotne tudi kvasovke, vendar je bilo njihovo število tako majhno, da so mlečnokislinske bakterije hitro prevladale. Začeli so se tvoriti predvsem produkti mlečnokislinske fermentacije. Ugotovili smo nastanek velike količine etil acetata, etanola, diacetila, 3-hidroksi-2-butanona in očetne kisline, katera pogosto s svojo neprijetno ostro kislno aromo prekrije okus kruha. V optimalnih količinah je ta nepogrešljiva komponenta krušne arome kruhov pripravljenih iz kisljih test (Katina, 2005). Nastanek organskih kislin je vzrok padanja vrednosti pH v kisljih testih in je bil razviden tudi v našem primeru. Sorazmerno s padanjem pH vrednosti je nastajala velika količina očetne kisline. Po tem smo sklepali, da je prišlo do prevlade heterofermentativnih bakterij. Aktivnost mlečnokislinskih bakterij je bila razvidna tudi po pretoku CO<sub>2</sub>, saj je njihova značilnost majhna produkcija sproščenega CO<sub>2</sub>, kar smo ugotovili tudi v našem primeru.

Iz preglednice 7 je razvidno, da že minimalen dodatek kvasa vpliva na pretok CO<sub>2</sub> in na koncentracije hlapnih spojin. Ugotovili smo povečane koncentracije 2-metil butanala, 3-metil butanala, etanola, 1-propanola, 3-metil-1-butanola, 3-hidroksi-2-butanona, ki jih med fermentacijo proizvajajo kvasovke. V tem testu je najbolj izstopala koncentracija 3-hidroksi-2-butanona, ki je v tako veliki koncentraciji nismo zasledili v nobenem drugem testu. Ta spojina je odgovorna za aromo po maslu in je zelo zaželeno. Ugotovili smo, da so nekatere koncentracije spojin v določenem času dosegle maksimalno koncentracijo in proti koncu fermentacije začele upadati. To smo opazili pri 2-metil butanalu, 3-metil butanalu in 1-propanolu. V tem primeru smo opazili podoben trend padanja pH vrednosti in nastanka očetne kisline, kot v kontrolni fermentaciji.

Iz preglednice 8 pa je bil razviden občutnejši vpliv kvasovk na koncentracijo hlapnih spojin. V ospredje so prihajale hlapne spojine, značilne za kislja testa fermentirana z dodatkom kvasovk; etanol, 2-metil butanal, 3-metil butanal, 1-butanol-3-metil, fenil etil etanol. Opazili smo, da so koncentracije 2-metil butanala in 3-metil butanala proti koncu fermentacije upadle oz. izginile. Pretok sproščenega CO<sub>2</sub> se je sorazmerno z večjim dodatkom kvasa povečeval, pH vrednost testa pa je upadala veliko počasneje. V tem primeru ob upadu pH vrednosti so nastajale zanemarljive količine očetne kisline. Za padec pH vrednosti je bila odgovorna mlečna kislina, produkt homofermentativnih

mlečnokislinskih bakterij. Produkti mlečnokislinske fermentacije so prihajali manj do izraza in se do neke mere zmanjšali, kar je kazalo na slabšo aktivnost mlečnokislinskih bakterij.

V preglednici 9 je razvidna še povečana koncentracija spojin kot so: etanol, 1-propanol, heksanal, 2-metil-1-propanol, 1-butanol-3-metil acetat, 3-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, feniletil etanol, kar je pokazatelj velike aktivnosti kvasovk. Povečana aktivnost se je kazala tudi v povečanem pretoku sproščenega CO<sub>2</sub>. Padec pH vrednosti in zanemarljiv nastanek očetne kisline je bil podoben fermentaciji z dodatkom 0,4 mL kvasne suspenzije, kar je nakazovalo na delovanje homofermentativnih mlečnokislinskih bakterij. Tudi v tem primeru smo ob koncu fermentacije opazili zmanjšanje koncentracij 2-metil butanala, 3-metil butanala in diacetila. Do tega je prišlo, ker so večina hlapnih spojin, ki smo jih določili, vmesni produkti metabolizma mlečnokislinskih bakterij in kvasovk. To pomeni, da poleg nastanka omenjenih spojin sočasno poteka tudi razgradnja ali nadaljnja sinteza novih spojin. V kolikor se hitrost sinteze spojine zniža, se to pozna tudi na koncentraciji soodvisnih metabolitov kislega testa. Za tovrstne spojine je značilno, da so odvisne od metabolne aktivnosti mikroorganizmov; njihova koncentracija lahko narašča, pada in ponovno narašča med procesom fermentacije.

Dodatek kvasa v kislem testu ima velik vpliv na količino nastalih hlapnih spojin, njihovo sestavo in nastanek CO<sub>2</sub>. Vsi ti parametri direktno vplivajo na kakovost končnega izdelka. Hlapne spojine vplivajo na aromo kruha, medtem ko nastanek CO<sub>2</sub> pozitivno vpliva na volumen in rahlost kruha. Pri fermentacijah brez dodanega kvasa (kontrolna fermentacija) in z 0,04 mL dodane kvasne suspenzije so bile značilne velike koncentracije hlapnih spojin, ki jih proizvajajo mlečnokislinske bakterije. Hansen in sod. (1989) med najpomembnejše hlapne spojine uvrščajo očetno kislino (po kislem), diacetil (po maslu), 3-hidroksi-2-butanon (po maslu), naštete spojine so prevladovale tudi v našem primeru. V kvašenih testih ugotavljamo povečano količino 2- in 3-metil butanala, katera sta odgovorna za aromo slada in karamelno noto krušne skorje. Ob koncu fermentacije se povečata koncentraciji 3-metilbutanola in fenil etil etanola, katere proizvajajo kvasovke in sta po ugotovitvah Maloneya in Foya (2003) odgovorni za kvasno aromo sredice.

V kvašenih testih smo ugotovili, da je optimalna tvorba določene spojina odvisna od časa in količine dodanega kvasa. Na primer največja količina 3-metilbutanala, katerega Grosch in Schieberle (1997) uvrščata med pomembnejše spojine odgovorne za aromo kruha, je nastala v testu, kateremu smo dodali 4 mL kvasne suspenzije, pri 4 urah fermentacije. Proti koncu fermentacije je začela koncentracija upadati. Iz tega sledi, da je treba za optimalen nastanek hlapnih spojin prilagajati procesne pogoje (temperatura, čas fermentacije, hranila) mikroorganizmom, ki so odgovorni za tvorbo teh spojin in količino starter kulture. Za testo s 4 mL dodane kvasne suspenzije smo ugotovili visoke koncentracije hlapnih spojin, značilnih za kvašena testa. V tem primeru ne moremo več govoriti o kislem testu.

Glede na ugotovitve in rezultate smo sklepali, da je optimalno testo z vidika arome zmerno zakisano in vsebuje zadostne količine določenih hlapnih spojin. Glede na to tezo je optimalen dodatek kvasne suspenzije med 0,04 mL in 0,4 mL. Testo, kateremu smo dodali 0,04 mL kvasne suspenzije je imelo optimalno sestavo hlapnih spojin pri 24 urah

fermentacije. Ta tip kislega testa je bil zmerno zakisan in je vseboval zadovoljivo vsebnost hlapnih spojin. Testo z 0,4 mL dodane kvasne suspenzije je imelo optimalno sestavo pri 39 urah fermentacije in se odlikovalo z visoko koncentracijo hlapnih spojin in nizko vsebnostjo kislin.

Potrdili smo hipotezo, da dodatek kvasovk vpliva na sestavo in količino hlapnih snovi. Ponovljivost postopka priprave kislega testa je bila slaba, vendar je ostala tendenca med različno dodanimi koncentracijami kvasne suspenzije.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovi kemijskih analiz, dobljenih rezultatov in razprave lahko sklepamo:

- Dodatek različnih količin kvasne suspenzije vpliva na količino in sestavo hlapnih spojin nastalih med fermentacijo, in sicer količina hlapnih spojin se poveča.
- Večji kot je dodatek kvasne suspenzije, večja je hitrost produkcije CO<sub>2</sub> in počasneje poteka zakisanje testa med fermentacijo, kar posledično vodi do izgube lastnosti kislega testa.
- Večje količine hlapnih spojin vodijo do bolj aromatičnih kruhov in posledično do kvalitetnejših kruhov.
- Količina in sestava hlapnih spojin je odvisna od časa fermentacije in prisotnosti mikroorganizmov.
- Testo brez dodane kvasne suspenzije se odlikuje po povečanih koncentracijah 3-hidroksi-2-butanona, diacetila, očetne kisline.
- Kvasovke povečajo koncentracije etanola, 1-propanola, heksanala, 2-metil-1-propanola, 1-butanol-3-metil acetata, 3-metil-1-butanola, 3-metil-1-butanola, fenil etil etanola.
- Optimalen dodatek kvasne suspenzije se giblje med 0,4 in 0,04 mL.

## 6 POVZETEK

Pekarski izdelki, pripravljene iz kislega testa, se odlikujejo po prijetni aromi in intenzivnemu okusu, zato je uporaba kislega testa eden od poglobitvenih načinov izboljšave v tehnologiji pripravljanja pekarskih izdelkov. V tem diplomskem delu smo poskusili kislemu testu izboljšati kakovost s strani hlapnih spojin z majhnimi dodatki kvasa. Hlapne snovi kislega testa se preko fermentacije in pečenja v veliki meri prenesejo na končni izdelek in so v korelaciji s kakovostjo kruha. Fermentacija testa vpliva na aromo sredice kruha.

Fermentacija kislega testa služi za tvorbo hlapnih spojin in plinov, kar vpliva na aromo in teksturo kruha. Tak učinek kislega testa je rezultat skupnega delovanja žitu lastnih encimov ter pri fermentaciji udeleženih mlečno kislinskih bakterij in kvasovk. Specifična sestava mikroflore kislega testa je odvisna od dodanih sestavin, starter kulture in pogojev vodenja samega procesa. Fermentacija testa vpliva na aromo sredice kruha.

Kisla testa smo pripravili iz vode, moke ter dodatka kvasne suspenzije (liofilizirana kultura *S. cerevisiae*). Testom smo dodajali suspenzijo kvasa v različnih volumnih: 4 mL; 0,4 mL; 0,04 mL in brez dodatka kvasne suspenzije. Fermentacija je potekala pri sobni temperaturi ( $23 \pm 2$  °C).

Namen našega dela je bil preučiti vpliv kvasne suspenzije na nastajanje hlapnih spojin, ki nastajajo med fermentacijo. S pomočjo fizikalno-kemijskih analiz smo spremljali koncentracijo hlapnih spojin, pH vrednosti in pretoka sproščenega CO<sub>2</sub>. Kisla testa z dodano kvasno suspenzijo so vsebovala velike koncentracije etanola, 2-metil butanala, 3-metil butanala, 1-butanol-3-metila, fenil etil etanola 3-hidroksi-2-butanona. Očetne kisline je nastalo v majhnih količinah, po čem sklepamo na delovanje kvasovk in homofermentativnih mlečnokislinskih bakterij. Testo brez dodane kvasne suspenzije je vsebovalo velike koncentracije etil acetata, diacetila, očetne kisline. To nakazuje na delovanje heterofermentativnih mlečnokislinskih bakterij.

S pomočjo analiz smo dognali, da je z vidika arome optimalen dodatek kvasne suspenzije med 0,4 in 0,04 mL. V teh primerih se tvori dovolj hlapnih spojin in testo še vedno vsebuje lastnosti kislega testa. Iz tega lahko zaključimo, da dodatek kvasa v določenih količinah pozitivno vpliva na kakovost pekarskih izdelkov, pripravljenih iz kislih test.

## 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

Bashuk W., Thachuk R. 1991. Gluten proteins. V: *Advances in cereal science and technology*. Vol. 5, Pomeranz Y. (ed). St. Paul, American Association of Cereal Chemists: 57-89

Belitz H.-D., Grosch W. 1999 *Carbohydrates*. V: *Food chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin Springer-Verlag : 313-317

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

Brummer J.-M., Unbehend G. 1997. Wheat sponge doughs and bread quality. *Getreide, Mehl und Brot*, 51, 6: 345-349

Caron C. 1995. Commercial production of baker's yeast and wine yeast. V: *Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise*. Vol. 9. Enzymes, biomass, food and feed. 2<sup>nd</sup> ed. Reed G., Nagodawithana T.W. (eds.). Weinheim, VCH : 335-344

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

Czerny M., Schieberle P. 2002. Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white flour-identification and quantitative changes during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,23: 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

Maloney D.H., Foy J.J. 2003. *Yeast fermentations V: Handbook of dough fermentations*. Kulp K., Lorenz K. (eds.). New York, Marcel Dekker Inc.: 43-63

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

Gassenmeier K., Schieberle P. 1995. Potent aromatic compounds in the crumb of wheat bread (French-type)-influence of pre-ferments and studies on the formation of key odorants during dough processing. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 201: 241-248

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

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

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

Gänzle A., Ehmann W. Hammes P. 1998. Modelling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response of process parameters of sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 7: 2616-2623

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

Hansen Å., Hansen B. 1996. Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 202, 3: 244-249

Hansen Å., Lund B., Lewis M.J. 1989. Flavour of sourdough rye bread crumb. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 22, : 141-144

Hansen Å., 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

Hansen B., Hansen Å. 1994. Volatile compounds in wheat sourdoughs produced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 198: 202-209

Haugland R.P. 2002. Nucleic acid detection and genomics technology. V: Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 9<sup>th</sup> ed. Spence M.T.Z., Johnson I.D. (eds.) Eugene, Molecular Probes: 265-352

Hrovat M. 2000 a. Surovine v pekarstvu in slaščičarstvu. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 24, 28

Hrovat M. 2000 b. Tehnološke osnove proizvodnje kruha. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 10-16

Hoseney R.C. 1994. Principles of cereal science and technology. 2<sup>nd</sup> ed. St. Paul, American Association of Cereal Chemists: 56-62

Katina K. 2005. Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. Espoo, VTT Technical Research Centre of Finland: 92 str. (VTT Publications; 569)

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



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 Inc.: 97-143

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

Loponen J., Mikola M., Katina K., Sontag-Strohm T., Salovaara H. 2004. Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations. Cereal Chemistry, 81, 1: 87-90

Lorenz K., Brummer J.-M. 2003. Preferments and sourdoughs in German breads V: Handbook of dough fermentations. Kulp K., Lorenz K. (eds.). New York, Marcel Dekker Inc.: 247-267

Martínez-Anaya M.A. 2003. Associations and interactions of micro-organisms in dough fermentations: effects on dough and bread characteristics. V: Handbook of dough fermentations. K. Kulp, K. Lorenz (eds.). New York, Marcel Dekker Inc.: 63-195

Martínez-Anaya M.A. 1996. Carbohydrate and nitrogen related components in wheat sourdough processes: review. Advances in Food Science, 18, 5/6: 185-200

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

Massaux C., Sindic M., Lenartz J., Sinnaeve G., Bodson B., Falisse A., Dardenne P., Deroanne C. 2008. Variations in physicochemical and functional properties of starches extracted from European soft wheat: The importance to preserve the varietal identity. Carbohydrate Polymers, 71: 32-41

Meilgaard M., Civille G.V., Carr B.T. 1999. Sensory evaluation techniques. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 387 str.

Meignen B., Onno B., Gelinas P., Infantes M., Guilos S., Cahagnier B. 2001. Optimisation of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. Food Microbiology, 18: 239-245

Molinero M.N. 2006. Biochemistry and physiology of rehydration and adaptation of active dry wine yeast for winemaking. Thesis. Toragona., Universitat Rovira i Virgili, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia: 38-51

Plestenjak A. 2004. Tehnologija poljščin. Zapiski s predavanj. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Rouzaud O., Martínez-Anaya M. 1997. Relationship between biochemical and quality-related characteristics of breads, resulting from the interactions of flour, microbial starter and the type of process. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 204: 321-326

Röcken W., Rick M., Reinkemeier M. 1992. Controlled production of acetic acid in wheat sourdoughs. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 195: 259-253

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

Salovaara H. 2004. Lactic acid bacteria in cereal-based products. V: Microbiological and functional aspects. 3<sup>rd</sup> ed. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 431-451

Schieberle P. 1989. Formation of 2-acetyl-1-pyrroline and other important flavour compounds in wheat bread crust. *ACS Symposium Series*, 409: 268-275

Schieberle P. 1996. Intense aroma compounds-useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma. *Advances in Food Science*, 18: 237-244

Schieberle P. 1990. The role of free amino acids present in yeast as precursors of the odorants 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine in wheat bread crust. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 191, 39: 206-209

Sluimer P. 2005. Principles of breadmaking. St. Paul, American Association of Cereal Chemists: 17-69

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

Spicher G., Brümmer J.-M. 1996. Baked goods. V: Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise. Vol 9 Enzymes, biomass, food and feed. 2<sup>nd</sup> ed. Reed G., Nagodawithana T.W. (eds.). Weinheim, VCH: 250-306

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

Thiele C., Gänzle G., Vogel R.F. 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. *Cereal Chemistry*, 79: 45-51

Thiele C., Gänzle G. in Vogel R.F. 2003. Fluorescence labeling of wheat proteins for determination of gluten hydrolysis and depolymerization during dough processing and sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 9: 2745-2752

Zehentbauer G., Grosch W. 1998. Crust aroma of baguettes-I. Key odorants of baguettes prepared in two different ways. *Journal of Cereal Science*, 28: 81-92

## **ZAHVALA**

Za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju doc. dr. Andreju Plestenjaku s Katedre za tehnologijo rastlinskih živil na Biotehniški fakulteti in recenzentki doc. dr. Poloni Jamnik.

Za pomoč pri praktični izvedbi diplomske naloge se zahvaljujem gospe Sonji Čerpič in doc. dr. Emilu Zlatiču s Katedre za tehnologijo rastlinskih živil na Biotehniški fakulteti.

Za pomoč pri iskanju in oblikovanju virov se zahvaljujem univ. dipl. ing. Ivici Hočevar in univ. dipl. bibl. Barbari Slemenik z Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Na koncu se iskreno zahvaljujem prijateljem, predvsem pa staršema za moralno, psihično in finančno pomoč v vseh letih študija.

Najbolj iskreno pa se zahvaljujem moji dragi Saši, ki mi je potrpežljivo stala ob strani tudi v najbolj težkih trenutkih.