

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Luka KRIŽMAN

**VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA
MIKROBIOLOŠKE, KEMIJSKE IN SENZORIČNE
LASTNOSTI BREZGLUTENSKEGA AJDOVEGA
KRUHA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Luka KRIŽMAN

**VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA MIKROBIOLOŠKE,
KEMIJSKE IN SENZORIČNE LASTNOSTI BREZGLUTENSKEGA
AJDOVEGA KRUHA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF THE ADDITION OF CAROB FLOUR ON
MICROBIOLOGICAL, CHEMICAL, AND SENSORY PROPERTIES OF
GLUTEN-FREE BUCKWHEAT BREAD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina, za somentorja prof. dr. Peter Raspor in za recenzenta prof. dr. Rajko Vidrih.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Luka Križman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 664.644.7:633.12:641.1:579.67(043)=163.6
KG brezglutenski kruh/ajda/ajdov kruh/rožičeva moka/ *Saccharomyces boulardii*/mikrobiološka stabilnost/kemijska sestava/tehnološke lastnosti/senzorične lastnosti/
AV KRIŽMAN, Luka
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ RASPOR, Peter (somentor)/ VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2016
IN VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA MIKROBIOLOŠKE, KEMIJSKE IN SENZORIČNE LASTNOSTI BREZGLUTENSKEGA AJDOVEGA KRUHA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 64 str., 13 pregl., 21 sl., 14 pril., 108 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V zadnjih letih se je zaradi povečanja zabeleženih primerov bolezni in intoleranc, povezanih s pšeničnim glutenom, pojavila potreba po zagotovitvi prehransko bogatega in senzorično sprejemljivega brezglutenskega kruha. Ena od možnih rešitev je izbira surovin med psevdo žiti. Veliko zanimanje se je med drugim pokazalo za uporabo ajde. Namen diplomskega dela je bil narediti ajdov brezglutenski kruh z dodatkom rožičeve moke. V delu smo preverjali vpliv dodatka rožičeve moke na mikrobiološko stabilnost, prehranske lastnosti in senzorične lastnosti ajdovega brezglutenskega kruha. Za statistično primerjavo smo analizirali tudi ajdov kruh brez dodatka rožiča. Ugotovili smo, da dodatek rožičeve moke zavira rast bakterij *Bacillus subtilis*, spor aerobnih bakterij in plesni, nima pa inhibitornega učinka na rast kvasovk. Prav tako smo ugotovili, da dodatek rožičeve moke pozitivno vpliva na nekatere senzorične lastnosti ajdovega kruha, saj so imeli kruhi z dodatkom rožičeve moke boljši izgled, zaradi hidrokoloidov rožičeve moke boljše sposobnosti vzhajanja in po peki zaradi stabilnejše mrežne strukture tudi boljšo zračnost. Enak dodatek rožičeve moke pa je negativno vplival na trdoto sredice. Dodatek rožičeve moke je izboljšal tudi prehranske lastnosti ajdovega kruha. Ugotovili smo, da se je z dodatkom rožičeve moke povečal odstotek prehranske vlaknine ter skupna vsebnost polifenolnih spojin. Študija kaže na pozitivne vplive dodatka rožičeve moke na izboljšanje mikrobiološke stabilnosti in nekatere senzorične lastnosti ajdovega brezglutenskega kruha.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 664.644.7:633.12:641.1:579.67(043)=163.6
CX gluten free bread/buckwheat/buckwheat bread/carob flour/ *Saccharomyces boulardii*/microbiological stability /nutritional value/
AU KRIŽMAN, Luka
AA SMOLEMOŽINA, Sonja (supervisor)/ RASPOR, Peter (co-advisor)/ VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Univerza v Ljubljani, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2016
TI THE INFLUENCE OF THE ADDITION OF CAROB FLOUR ON MICROBIOLOGICAL, CHEMICAL, AND SENSORY PROPERTIES OF GLUTEN-FREE BUCKWHEAT BREAD
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 64 p., 13 tab., 21 fig., 14 ann., 108ref.
LA sl
AL sl/en
AB In recent years there has been a great increase of reported cases of the disease and intolerances related to wheat gluten. A great need emerged to ensure nutritionally rich and sensory acceptable gluten free bread. At the same time, the global food industry is looking towards the use of pseudo cereals, among them one of the most interesting is buckwheat. The purpose of the thesis was to create buckwheat gluten-free bread with addition of carob. In the present work we tested the influence of the carob flour addition on the microbiological stability, rheological, nutritional, and sensory properties of gluten-free bread. For statistic comparison we also analyzed buckwheat bread without carob flour addition. The tests showed, that carob flour addition inhibited the growth of *Bacillus subtilis*, as well as other aerobic sporogenic bacteria, and molds. However, it has not have any inhibitory effect on the growth of yeasts. We also concluded, that the addition of carob flour improves some sensory properties of the buckwheat bread. The samples with higher carob content had, due to the hydrocoloids in the carob flour, better rising abilities and also due to more stable structure better airiness. On the other hand, the addition of carob flour had a negative effect on the firmness of the buckwheat bread. The addition of carob flour also improved nutritional properties of buckwheat bread. The results showed that the addition of carob flour increased content of dietary fiber and polyphenols. In general, the addition of carob flour improves most of quality attributes of buckwheat bread.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJDELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 CELIAKIJA	3
2.1.1 Preobčutljivost na gluten (non-celiac gluten intolerance)	3
2.1.2 Preprečevanje in zdravljenje	4
2.2.1 Definicija kruha	5
2.2.2 Gluten	5
2.2.2.1 Sestava glutena	5
2.2.2.2 Reološke lastnosti glutena	6
2.2.3 Tehnološki postopki pri peki kruha	6
2.2.3.1 Zames testa	6
2.2.3.2 Fermentacija testa	7
2.2.3.3 Peka kruha	7
2.2.4 Senzorične lastnosti kruha	7
2.2.4.1 Volumen kruha	7
2.2.4.2 Barva sredice	8
2.2.4.3 Okus	8
2.2.5 Mikrobiološka stabilnost in trajnost kruha	8
2.2.5.1 Mikrobiološka stabilnost kruha	9
2.2.5.2 Staranje kruha	10
2.3 BREZGLUTENSKI KRUH	10
2.3.1 Glavne sestavine in tehnologija pri izdelavi brezglutenskega kruha	11
2.3.2 Psevdo žita	12
2.4 AJDA	13
2.4.1 Klasifikacija	14
2.4.2 Kemijska sestava ajdove moke	14
2.4.2.1 Ogljikovi hidrati	14
2.4.2.2 Beljakovine	14
2.4.2.3 Maščobe	15
2.4.2.4 Prehranska vlaknina	15

2.4.2.5 Polifenoli in flavonoidi.....	15
2.4.2.6 Fagopirin	16
2.4.3 Pecilne lastnosti ajdove moke.....	16
2.5 ROŽIČ	17
2.5.1 Klasifikacija in uporaba	17
2.5.2 Kemijska sestava.....	17
2.5.2.1 Sladkorji, prehranska vlaknina in organske kisline.....	17
2.5.2.2 Beljakovine in aminokislinska sestava.....	17
2.5.2.3 Minerali	18
2.5.2.4 Polifenoli	18
2.6 PRIPRAVA STARTERSKE KULTURE	18
3. MATERIALI IN METODE DELA	20
3.1 HODOGRAM POSKUSA	20
3.2 MATERIALI	20
3.2.1 Mikroorganizmi	21
3.2.2 Mikrobiološka gojišča.....	21
3.2.2.1 Agar BCA (<i>Bacillus cereus</i> agar).....	21
3.2.2.2 Agar DRBC	21
3.2.2.3 Agar PCA	21
3.2.2.4 Tekoče gojišče YPD.....	22
3.2.2.5 Trdno gojišče YPD.....	22
3.2.3 Reagenti	22
3.2.3.1 Fiziološka raztopina	22
3.2.3.2 Reagent FRAP	23
3.2.4 Oprema	23
3.2.5 Pripomočki.....	24
3.2.6 Vzorci	24
3.3 METODE.....	25
3.3.1 Proizvodnja kvasne biomase (<i>S. boulardii</i>).....	25
3.3.2 Senzorična analiza	26
3.3.3 Vzorčenje	26
3.3.4 Določanje mikrobiološke stabilnosti kruha	26
3.3.4.1 Priprava vzorcev za mikrobiološko analizo	26
3.3.4.2 Vizualno spremljanje pojava plesni	26
3.3.4.3 Priprava matične raztopine in ostalih razredčitev	27
3.3.4.4 Spremljanje mikrobiološke rasti na selektivnih gojiščih DRBC in BCA	27
3.3.4.5 Določanje spor aerobnih bakterij	27
3.3.5 Instrumentalne analize kruha.....	27
3.3.5.1 Določanje barve sredice	27
3.3.5.2 Določanje trdote sredice	28
3.3.5.3 Priprava zračno suhega vzorca (za določanje vsebnosti vlaknin)	28
3.3.6 Kemijske analize kruha	28
3.3.6.1 Določanje vsebnosti polifenolov	28

3.3.6.2 Določanje vsebnosti prehranske vlaknine (modificirana encimsko-gravimetrična metoda po Proskyju).....	29
3.3.6.3 Določanje antioksidativnega potenciala	30
4. REZULTATI	32
4.1 REZULTATI	PREDPOSKUSA
.....	32
4.2 GLAVNI	POSKUS
.....	33
4.2.1 Vizualna primerjava rezin kruha po peki	33
4.2.2 Senzorično ocenjevanje kruha po obrazcu GZS	36
4.2.3 Instrumentalne metode.....	36
4.2.3.1 Določanje barve.....	36
4.2.3.2 Določanje trdote sredice kruha	38
4.2.4 Mikrobiološka stabilnost kruha.....	39
4.2.4.1 Vizualno spremjanje pojava plesni	39
4.2.4.2 Spremljanje mikrobiološke rasti bakterije <i>Bacillus subtilis</i> na selektivnem mikrobiološkem gojišču BCA (<i>Bacillus cereus</i> agar).....	40
4.2.4.3 Spremljanje mikrobiološke rasti kvasovk in plesni na selektivnem gojišču DRBC	41
4.2.4.4 Določanje prisotnosti spor aerobnih bakterij	42
4.2.5 Kemijska analiza	43
4.2.5.1 Določanje vsebnosti prehranske vlaknine	43
4.2.5.2 Določanje vsebnosti polifenolov	44
4.2.5.3 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo Folin-Ciocalteu	46
4.2.5.4 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo DPPH.....	47
5 RAZPRAVA	48
5.1 VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA MIKROBIOLOŠKO OBSTOJNOST AJDOVEGA KRUHA	48
5.1.1 Vizualno spremjanje pojava plesni na rezinah kruha.....	48
5.1.2 Spremljanje rasti bakterije <i>Bacillus subtilis</i>	48
5.1.3 Spremljanje mikrobiološke rasti kvasovk	49
5.1.4 Določanje prisotnosti spor aerobnih bakterij	49
5.2 VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA VSEBNOSTI PREHRANSKE VLAKNINEIN POLIFENOLNIH SPOJIN	49
5.2.1 Določanje vsebnosti prehranske vlaknine	49
5.2.2 Določanje vsebnosti polifenolnih spojin.....	50
5.2.3 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo Folin-Ciocalteu in DPPH..	50
5.3 VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA SENZORIČNE LASTNOSTI AJDOVEGA KRUHA	50
5.3.1 Senzorično ocenjevanje kruha po obrazcu GZS	51
5.3.2 Vizualna primerjava rezin kruha po peki	51
5.3.3 Določanje barve sredice.....	51

6 SKLEPI	53
7 POVZETEK.....	54
8 VIRI.....	55
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Hodogram poskusa.....	20
Slika 2: Bioreaktor za proizvodnjo kvasne biomase	25
Slika 3: Primerjava rezin kruha (levo vzorec C, desno vzorec B).	33
Slika 4: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 5R levo, vzorec 10R na sredini in vzorec K na desni).	33
Slika 5: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec K levo, vzorec 15R desno).	34
Slika 6: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 30R levo, vzorec 20R na sredini, vzorec K desno)	34
Slika 7: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 20Ro10 levo, vzorec K desno).....	34
Slika 8: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 20Ro20 levo, vzorec 20Ro40 v sredini, vzorec K desno).....	35
Slika 9: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 30Ro10 levo, vzorec K desno).....	35
Slika 10: Prikaz povprečij vrednosti L^* , a^* in b^* , izmerjenih na sredici rezin kruhov	37
Slika 11: Povprečna trdota vzorcev kruha.....	38
Slika 12: Vizualno spremljanje pojava plesni, predstavljeno po točkovnem sistemu, ki predstavlja stopnjo kontaminacije.	39
Slika 13: Ocena stopnje kontaminacije kruhov z bakterijo <i>Bacillus subtilis</i>	41
Slika 14: Ocena stopnje kontaminacije kruha s kvasovkami in plesnimi.	42
Slika 15: Ocena stopnje kontaminacije kruha s sporami aerobnih bakterij.	43
Slika 16: Vsebnost topne, netopne in skupne prehranske vlaknine v vzorcih kruha.	43
Slika 17: Vsebnost hidroksibenzojske, ferulne, protokatehuične, vanilinske in kavne kislina v vzorcih kruha.	44
Slika 18: Vsebnost katehina, kvarcetina, rutina, apigenina, luteolina in kaempferola v vzorcih kruha.	45
Slika 19: Vsebnost viteksina, apigenina 7G in orientina v vzorcih kruha.	45
Slika 20: Antioksidativni potencial vzorcev kruha po metodi Folin-Ciocalteu.	46
Slika 21: Antioksidativni potencial vzorcev kruha po metodi DPPH*	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Tip moke in hidrokoloidov, uporabljenih pri izdelavi brezglutenskega kruha (Povzeto po Mir in sod., 2016).....	11
Preglednica 2: Kemijska sestava semen amaranta, kvinoje in ajde (Povzeto po Alvarez-Jubete in sod., 2009). Podatki so podani kot odstotek suhe teže ± standardna deviacija.	13
Preglednica 3: Vsebnost nekaterih mineralov v semenih amaranta, kvinoje in ajde (Povzeto po Alvarez-Jubete in sod., 2009). Podatki so podani v mg/g suhe teže ± standardna deviacija. .	13
Preglednica 4: Vsebnost polifenolov, flavonoidov in antioksidativni potencial pšenične in ajdove moke (povzeto po Constantini in sod., 2014).....	16
Preglednica 5: Reagenti.....	22
Preglednica 6: Oprema	23
Preglednica 7: Pripomočki	24
Preglednica 8: Vzorci kruha s pripadajočimi recepturami	25
Preglednica 9: Povečanje trdote (%) med svežimi in dan starimi vzorci kruha.....	39
Preglednica 10: Točkovni sistem za opredelitev stopnje mikrobiološke kontaminacije vzorcev	39
Preglednica 11: Ocena stopnje kontaminacije kruhov z bakterijo <i>Bacillus subtilis</i>	40
Preglednica 12: Ocena stopnje kontaminacije kruhov s kvasovkami in plesnimi.	41
Preglednica 13: Ocena stopnje kontaminacije kruha s sporami aerobnih bakterij.....	42

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rezultati vizualnega spremeljanja rasti plesni na rezinah kruha
Priloga B: Rast plesni in kvasovk na gojišču DRBC
Priloga C: Rast bakterij *Bacillus subtilis* na gojišču BCA.
Priloga D: Prisotnost spor anaerobnih bakterijna gojišču PCA
Priloga E: Določanje barve sredice ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke
Priloga F: Določanje trdote sredice kruha sredice ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke
Priloga G: Določanje prehranske vlaknine ajdovega kruha z različnimi dodatki rožičeve moke
Priloga H: Enačbe umeritvenih krivulj standardov polifenolov
Priloga I: Vsebnost polifenolov v ajdovem brezglutenskem kruhu z različnim dodatkom rožičeve moke
Priloga J: Umeritvena krivulja za določanje antioksidativne vrednosti ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke po metodi Folin-Ciociltau
Priloga K: Antioksidativni potencial ajdovega kruha z različnimi dodatki rožičeve moke (metoda po Folinu)
Priloga L: Umeritvena krivulja za določanje antioksidativne aktivnosti ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke po metodi s pomočjo radikala DPPH*
Priloga M: Antioksidativni potencial ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke (DPPH* metoda)
Priloga N: Obrazec za ocenjevanje kruha Gospodarske zbornice Slovenije

1 UVOD

Živimo v svetu neskončnih možnosti izbir. Tako je tudi pri izbiri hrane. V praktično vsaki trgovini lahko kupimo stvari, ki so bile pred nekaj leti še nedosegljive. Poleg vseh teh možnosti pa narašča tudi število s prehrano povezanih bolezni, kot so alergije in razne preobčutljivosti na določena živila. Mednje spada tudi celiakija, avtoimunska bolezen, ki jo sproža imunski odziv telesa na gluten, kar vodi tudi do napada imunskega sistema na lastne črevesne celice.

Pšenica je po podatkih FAOSTAT-a s približno 720 milijoni ton letne proizvodnje oz. potrošnje druga najpomembnejša poljščina in prispeva k pokrivanju približno 20 % vseh energijskih potreb v prehrani človeka. Poleg kruha in drugih pekovskih izdelkov je prisotna še v številnih drugih predelanih živilih rastlinskega in živalskega porekla. To je pripeljalo do dejstva, da pšenico vsebuje več kot 30 % industrijsko predelanih živil na policah trgovin, uporaba pa še narašča (Atchison in sod., 2010; Trafoon, 2013; Smole Možina in sod., 2015). Mnogi strokovnjaki pa ocenjujejo, da se to odraža tudi v povečevanju zdravstvenih težav, povezanih z občutljivostjo na gluten. Tako ljudem, ki so na brezglutensko dieto vezani celo življenje, ostane nenehna skrb za vsakodnevni jedilnik in zahtevno kombiniranje živil, da lahko zagotovijo potreben energijski vnos in predvsem vnos hranil. Posegajo tudi po industrijsko pripravljenih brezglutenskih izdelkih. Med izdelki, ki jih ljudje želijo oz. morajo izločiti in zamenjati z brezglutenskimi različicami, je kruh brez dvoma najpomembnejši.

Obstaja že veliko vrst brezglutenskega kruha. Živilska industrija jih v nenehnem iskanju novih receptur, ki bi testu učinkovito odstranile gluten, obenem pa kruh ohranile okusen in prehransko bogat, uvaja vsak dan. Ti izdelki so komercialno dostopni že povsed. Problem nastane, ker so ti kruhi pogosto sestavljeni iz čistih škrobov, ki vsebujejo malo prehransko bogatih snovi, senzorično ne dosegajo želenih rezultatov, tehnološko pa so neučinkoviti.

Z vse večjim številom ljudi, ki so bodisi intolerantni na gluten, imajo celiakijo ali pa se glutenu izogibajo iz prepričanja, da je škodljiv, je na trgu naraslo povpraševanje po breglutenskih kruhih. Ti naj bi imeli tehnološke značilnosti, podobne konvencionalnemu kruhu, poleg tega pa naj bi bili še prehransko bogati in senzorično sprejemljivi za vse – ne le kot nujno zlo za ljudi, ki iščejo še tako slab približek slastnemu kruhu, ki so se mu morali odpovedati.

V svetu narašča zanimanje za psevdoo žita, ki so prehransko zelo bogate surovine. Imajo še eno zelo pomembno lastnost – ne vsebujejo glutena. Med njimi je še posebej zanimiva ajda, ki je bila skozi zgodovino na našem prostoru tradicionalno živilo in je še vedno priljubljena v naši tradicionalni prehrani (ajdovi žganci, ajdova kaša itd.). Zaradi visoke vsebnosti beljakovin, polifenolnih spojin in kompleksnih ogljikovih hidratov je zelo bogat vir hranil. Z vse boljšo tehnologijo in vedno novimi znanji lahko predstavlja osnovo prehransko bogatega in senzorično zanimivega brezglutenskega kruha. Brezglutenski dodatki lahko izboljšajo tudi problematične tehnološke lastnosti brezglutenskega ajdovega kruha, zato smo v diplomski nalogi s tem namenom preizkusili dodatek rožičeve moke.

1.1 CILJ DELA

Cilj diplomskega dela je bil analiza brezglutenskega ajdovega kruha z dodatkom rožičeve moke. Ugotoviti smo žeeli reološke, senzorične in kemijske lastnosti kruhov brez dodatkov in kruhov z različnimi deleži dodane rožičeve moke. Ugotoviti smo žeeli tudi vpliv na mikrobiološko stabilnost tako pripravljenega kruha.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Hipoteza 1: Dodatek rožičeve moke bo zaradi vsebnosti polifenolnih spojin izboljšal mikrobiološko obstojnost kruha.
- Hipoteza 2: Dodatek rožičeve moke bo povečal vsebnost prehranske vlaknine in polifenolnih spojin v kruhu, s tem pa tudi antioksidativni potencial kruha.
- Hipoteza 3: Vsebnost hidrokoloidov rožičeve moke bo omogočila senzorično sprejemljive lastnosti brezglutenskega ajdovega kruha.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELIAKIJA

Celiakija ali glutenska enteropatija je gastrointestinalna avtoimunska bolezen, ki prizadene predvsem začetni del tankega črevesja in je posledica gensko pogojene intolerance na peptide, ki se sprostijo pri presnovi žitnega glutenja (Gujral in Rosell, 2004). Telo tvori protitelesa proti žitnim beljakovinam in tudi proti lastnemu tkivu (Orel, 2000). V hrani prisoten gluten bolnikom povzroča vnetje in poškodbo mukoznega sloja tankega črevesja, zato je sluznica tankega črevesja pri celiakiji hudo poškodovana. Zmanjša se število črevesnih resic in površina, sposobna absorpcije hrane. Poleg tega pride do motenj delovanja drugih celic v tankem črevesju, slabšega izločanja prebavnih sokov in s tem tudi slabšega vsrkavanja hrani. Hrana se tako ne prebavi dovolj in zaradi tega tudi ne porabi v celoti (Brecelj, 2002).

Omenjene poškodbe povzroča gluten – mešanica proteinov, ki jih najdemo v pšenici, sestavljena iz gliadinov in gluteninov. Druga žita, kot sta ječmen in rž, so sestavljena predvsem iz hordeinov in sekalinov, ki so ravno tako lahko odgovorni za enteropatijo pri celiakiji. Žita, kot so pšenica, rž, ječmen ter oves, vsebujejo prolamine, zato so za bolnike s celiakijo toksična (Gujral in Rosell, 2004).

Bolezen se lahko pojavi že v otroštvu ali pa se razvije šele pri odraslih osebah. Najbolj pogosti simptomi, ki se pojavljajo pri celiakiji, so ponavljajoča se abdominalna bolečina, napihnjenost, diareja, stalna slabost in bruhanje, kronično zaprtje, vetrovi, anoreksija, motnje v rasti, dermatitis herpetiformis (vezikularni srbeč izpuščaj), razjede v ustih, rahitis, osteoporiza, anemija, podaljšana adolescenza, utrujenost, šibkost itd. (Orel, 2000).

Patogeneza celiakije je kompleksna in vključuje tako genske kot tudi okoljske dejavnike. Genetika je zelo pomembna, vendar moramo vedeti, da genska predispozicija še ne pomeni, da se bo bolezen zagotovo razvila. Pri kavkaški populaciji je nosilcev gena kar 30–35 %, vendar se le 2–5 % primerov razvije v celiakijo. Dokazano je bilo, da so čas vključitve glutenja v prehrano novorojenčkov (zgodaj, pred 17. tednom in pozno, po 30. tednu), porod s carskim rezom, odsotnost dojenja in imunogensko ozadje tisti dejavniki, ki lahko vplivajo na nastop celiakije (Leivers in sod., 2014).

2.1.1 Preobčutljivost na gluten (non-celiac gluten intolerance)

Preobčutljivost na gluten je nov sindrom intolerance na gluten. Prva poročanja o tej bolezni segajo trideset let nazaj, vendar so bili šele nedavno potrjeni številni primeri odraslih, katerih simptomi so izginili z odvzemom glutenja z jedilnika, osebe pa niso trpele za celiakijo ali alergijo na pšenico (Cooper in sod., 1981). O prvih primerih preobčutljivosti na gluten pri otrocih se je poročalo šele leta 2012 (Mastrototaro in sod., 2012).

Preobčutljivost na gluten je lahko diagnosticirana pri pacientih z intoleranco na gluten, ki ne

razvijejo protiteles, tipičnih za celiakijo ali alergijo na pšenico. Prav tako nimajo za celiakijo tipičnih razjed na dvanajstniku. S popolnim umikom glutena z jedilnika simptomi v celoti izginejo (Sapone in sod., 2012; Biesiekierski in sod., 2013).

Razširjenost med populacijo je še vedno neznana, saj pacienti povečini sami postavijo diagnozo in sami preidejo na brezglutensko dieto, brez posvetovanja z zdravniki. Nekateri avtorji menijo, da je preobčutljivost na gluten bolj razširjena kot celiakija in alergija na pšenico, predvidene številke naj bi se gibale med 0,6 % in 6 % (Catassi in sod., 2013). Po nekaterih ocenah pa ta populacija narašča že vse od leta 2004, s povprečno letno stopnjo 25–30 % in po grobih ocenah zajema že 6–10 % celotne populacije (Gilissen in sod., 2012). Simptomi so podobni simptomom sindroma razdražljivega črevesja; to so glavoboli, bolečine v sklepih in mišicah, krči v mišicah, odrevenelost okončin, kronična utrujenost, zamegljen um, izguba teže, anemija, abdominalne bolečine, slabost, napihnjenost, driska, zaprtje, utrujenost. Vsi našteti simptomi lahko vodijo do vedenjskih težav, kot sta motnja v pozornosti in depresija. Intraintestinalni simptomi so veliko pogostejši kot ekstraintestinalni (Francavilla in sod., 2013).

2.1.2 Preprečevanje in zdravljenje

Edina rešitev za zdravljenje celiakije in preobčutljivosti na gluten je uvedba doživljenjske brezglutenske diete, pri kateri se je treba v popolnosti izogibati pšenici, ječmenu in rži ter vsem derivatom teh žit. Absorpcijska funkcija se tako lahko vrne, mukozni sloj se obnovi, šele nato izginejo ostali simptomi. Zadnje čase pa se poraja vedno večja skrb za bolnike, obolele za celiakijo, ki so na brezglutenski dieti. Zaradi diete se namreč izboljša absorpcija hranil. Bolniki, zaradi slabe absorptivnosti vajeni na visok energijski vnos hranil, lahko pridobijo prekomerno težo, ki v nadaljevanju lahko privede do obolenja za metaboličnim sindromom, diabetesom tipa II, obstaja pa tudi nevarnost pojava srčno-žilnih bolezni (Guh in sod., 2009).

Veliko težavo za bolnike predstavlja tudi slaba ponudba brezglutenskih izdelkov, ki so običajno še slabega okusa. Težava je tudi v tem, da imajo surovine, uporabljene za izdelavo brezglutenskih izdelkov, kot sta na primer krompir in riž, slabo biološko sestavo in nezadovoljive prehranske vrednosti. Zaradi vsega navedenega je razvoj novih izdelkov na tem področju še posebej aktualen. Ko govorimo o ajdovem kruhu, gre za poseben izziv povezovanja tradicionalnega in inovativnega razvoja novih izdelkov, za katere vlada veliko zanimanje, tako na razvojno-raziskovalnem področju kot tudi na trgu (Smole Možina in sod., 2015).

2.2 TEHNOLOGIJA IZDELAVE KRUHA

2.2.1 Definicija kruha

Kruh je pekovski izdelek, izdelan z mesenjem, oblikovanjem, vzhajanjem in peko testa, zamesenega iz žit in mlevskih izdelkov, vode oziroma druge ustrezne tekočine, pekovskega kvasa ali drugih sredstev za vzhajanje, dovoljenih aditivov ter drugih surovin, ki ustrezajo predpisani minimalni kakovosti.

Glede na surovine in način izdelave kruh razvrščamo kot sledi (Pravilnik ..., 2003):

- pšenični kruh (pšenični bel, pšenični polbel, pšenični črn in pšenični polnozrnati kruh);
- rženi kruh (rženi in rženi polnozrnati);
- kruh iz drugih krušnih žit (npr. ajdov, pirin, ovsen ...);
- mešani kruh (kruh iz mešanice pšenične, ržene, ječmenove, ovsene, ajdove, koruzne, prosene, sojine ali polnozrnate moke, drobljenca ali kosmičev ter podobnih izdelkov drugih poljščin);
- kruh posebnih vrst (mlečni, maščobni, kruh s semenami, kruh s suhim sadjem, kruh z dodanimi vlakninami, brezglutenski ...).

2.2.2 Gluten

Kvaliteto kruha določa kvaliteta moke, natančneje količina beljakovin v moki. Med njimi je najpomembnejši gluten, saj edinstveno vpliva na fizikalne lastnosti testa pri mešanju moke z vodo. Gluten v testu oblikuje mrežo, ki zadržuje CO₂ v svoji 3-D strukturi, s čimer omogoča vzhajanje testa, ki postane rahlo, mehko in elastično. Karakteristike te strukture so direktno povezane z mešanjem, ki okrepi hidratacijo glutena in tudi interakcijo z drugimi kemijskimi komponentami moke (Katalenič in Balenovič, 1999).

2.2.2.1 Sestava glutena

Gluten je beljakovina, ki se ob izpostavitvi moke vodi in mehanski obdelavi oblikuje iz dveh v vodi netopnih beljakovin. Je prvi izolirani rastlinski protein, dobimo ga ob spiranju moke z vodo. Nastane lepljiva masa, ki jo sestavlja beljakovini gliadin in glutenin. Izolirana masa je sestavljena iz dveh tretjin vode in tretjine suhe snovi, ki vsebuje 90 % beljakovin in lipidov, ostalih 10 % tvorijo druge spojine. Proteine glutena delimo na gliadin (prolamin, topen v 70-% alkoholu) in na glutenin (netopen v alkoholu, topen v kislinah in bazah). Gluten, ki je najbolj optimalen pri peki kruha, mora vsebovati omenjeni beljakovini v razmerju 1:1. Gliadini so rezervni proteini endosperma pšeničnega zrna, predstavljajo heterogeno zmes molekularnih enot, ki se med seboj povezujejo z disulfidnimi vezmi do mase 140 000 daltonov (Graveland, 1988). Nizkomolekularne gliadine ločimo na osnovi elektroforetske mobilnosti v kislem mediju na alfa, beta, gama in omega gliadine v razmerju 25 %, 30 %, 30 %, 25 %. Vse komponente gliadinov vsebujejo okrog 30 % glutaminske kislinske kisline, 10 %

prolina in hidrofobnih ostankov ter nizko vsebnost lizina. Aminokislinska sestava določa topnost beljakovin gliadina (Khan, 1982). Enako kot gliadini so tudi glutenini rezervni proteini endosperma pšeničnega zrna. So visokomolekularni polimeri, sestavljeni iz manjših podenot, povezanih s kovalentnimi in nekovalentnimi vezmi (Daussant in Mosse, 1983). Vloga glutenina je direktno povezana s tehnološkimi lastnostmi testa v času njegovega nastajanja (razvoj, zames in fermentacija), medtem ko lahko gliadin zaradi svojih različnih sestav (položaj SH skupin) deluje kot oteževalni dejavnik pri polimerizaciji glutenskih enot, kar vpliva na viskoelastične lastnosti glutena (Katalenič in Balenovič, 1999).

2.2.2.2 Reološke lastnosti glutena

Glutenini torej tvorijo osnovno mrežo glutena, gliadini pa zapolnjujejo prazna mesta v tej mreži in delujejo kot intermediati med molekulami glutena. Voda se zaradi nizkega deleža polarnih aminokislin iz sistema izloči, kar omogoča ohranjanje stabilnosti nastalega tridimenzionalnega konstrukta. Nastali agregati nabreknejo in privzamejo viskoelastične lastnosti, ki jih proteini v nativni obliki nimajo. Nastali gluten ima lastnosti, ki omogočajo oblikovanje pekovskih in tudi drugih izdelkov iz moke, kot so sposobnosti zadrževanja vode in plinov, elastičnost ter raztegljivost (Graveland, 1988).

2.2.3 Tehnološki postopki pri peki kruha

Tehnološki postopki pri peki kruha so:

- priprava surovin,
- zames testa (direktni in indirektni),
- fermentacija testa,
- premes testa,
- deljenje in okroglo oblikovanje testa,
- zaključna fermentacija,
- peka testa,
- hlajenje in skladiščenje pečenega kruha.

2.2.3.1 Zames testa

Poznamo direktni in indirektni zames testa. Pri direktnem zamesu testo zamesimo iz moke, vode, soli in kvasa. Vse sestavine dodamo hkrati. Po zamesu začne v testu potekati proces fermentacije. Kvasovke med fermentacijo sproščajo CO₂, ki vpliva na teksturo in volumen testa. Kvasovke med fermentacijo proizvajajo tudi etanol in višje alkohole, ki vplivajo na aromo kruha. Večina konvencionalnih kruhov je narejenih po tej metodi (Plestenjak, 2008). Pri indirektnem zamesu testo fermentiramo z dodatkom kislega testa. Priprava kislega testa je prva faza indirektnega zamesa. Pripravimo ga tako, da v fermentor dodamo del moke, vodo in poljubno startersko kulturo (mlečnokislinske bakterije, kvasovke) ter počakamo, da se izbrane kulture namnožijo. V drugi fazи naredimo glavni zames. Testo zamesimo iz preostale vode in moke ter pripravljenega kislega testa (Zobel in Kulp, 1996).

2.2.3.2 Fermentacija testa

Ne glede na to, ali pripravljamo direkten ali indirekten zames, sledi proces fermentacije. Fermentacija poteka kot proces, ki je direktno povezan s sproščanjem stranskih metabolitov dodanih kvasovk, predvsem je to CO₂. S tem pride do povečevanja volumna, saj se nastali plin nalaga v plinske mehurčke beljakovinskih struktur. Sloji lepka v beljakovinskem ogrodju se z nabrekanjem tanjšajo, v primeru predolge fermentacije lahko pride do zloma testa – ogrodje poči in ni več sposobno zadrževati nastalega plina. Fermentacija navadno poteka pri temperaturi med 28 in 35 °C in relativni vlažnosti prostora med 75 in 90 %. Visoka relativna vlaga preprečuje nastanek skorje in lepljenje testa. Fermentacija je zaključena, ko temperatura peke postane letalna za kvasno biomaso (Böhm in Komercički, 2004).

2.2.3.3 Peka kruha

Pri peki testa temperatura narašča od 30 do 250 °C na zunanji plasti kruha (temperatura pečice) in pod 100 °C v sredici (vsebnost vode omejuje maksimalno temperaturo). Zaradi tega prihaja do irreverzibilnih reakcij, predvsem denaturacije beljakovin in zaklejitve škroba. Z naraščanjem temperature pada sposobnost vezave vode na beljakovinsko ogrodje, s tem se niža hidratiranost beljakovin. Denaturirana beljakovina na koncu koagulira in fiksira med fermentacijo nastale pore. Med peko prihaja tudi do interakcij med gliadini in lipidi, ki tvorijo lipoproteine, ti pa pozitivno vplivajo na volumen in kvaliteto končnega izdelka (Schofield in sod., 1984; Davies, 1986; Ablett in sod., 1986; Dreese in sod., 1988).

Mehkoba in nežnost sredice sta povečini odvisni od interakcij med zaklejenim škrobom in lipidi ter dodanimi emulgatorji. Kompleksi, ki se tvorijo med naštetimi sestavinami, omogočajo kasnejšo zaklejitev škroba, s tem pa podaljšanje časa razvoja volumna zračnih komor pred dokončno fiksacijo. Lastnosti skorje so v veliki meri odvisne od Maillardove reakcije, ki steče med aminokislinami in proteinimi ter z encimsko razgradnjijo nastalimi sladkorji in škrobnimi dekstrini (Baker in Ponte, 1987). Karamelizacija nastalih kompleksov Maillardove reakcije povzroča nastanek želene arome, okusa in barve (Chang, 2006).

2.2.4 Senzorične lastnosti kruha

Kruh, kakršnega si želimo, ima nežno in mehko sredico ter hrustljavo skorjo. Na mehkobo sredice vpliva veliko dejavnikov, kot so volumen kruha, količina lipidov in emulgatorjev, prisotnost hemiceluloz, celuloz itd. Lahko rečemo, da so za mehkobo sredice pomembne vse sestavine, ki so dodane pri samem zamesu (Cegnar, 1991).

2.2.4.1 Volumen kruha

Volumen kruha določajo kvaliteta moke, tehnološki postopki, aktivnost kvasa, dodatek aditivov ter ravnanje s kruhom po peki. Kvaliteta moke odločilno vpliva na volumen. Količina glutena vpliva na sposobnost vpijanja vode. Če je lepek slab, postane kruh drobljiv, volumen pa majhen. Fermentabilni sladkorji predstavljajo hrano za kvasovke, torej njihova nizka

vsebnost povzroča nizek dvig testa pri fermentaciji. To lahko odpravimo z dodatkom sladkorja pri zamesu pred fermentacijo. Pomanjkanje sladkorja je povečini povezano z nizko vsebnostjo amilolitičnih encimov, tako da lahko količino sladkorjev povečamo tudi z dodatkom encimov. Majhen volumen dajejo tudi moke s preveliko količino pektolitičnih encimov, saj je v takem primeru razgradnja škroba prevelika. To se navadno zgodi pri moki z velikim deležem poškodovanih škrobnih zrnec. Na volumen kruha pomembno vpliva tudi kvas. Majhen volumen je lahko posledica premajhne količine dodanega kvasa ali slabe aktivnosti kvasa. Slaba aktivnost kvasa je lahko posledica prevelike količine aditivov, ki slabijo njegovo aktivnost (NaCl , maščobe in sladkorji), lahko pa je posledica starega kvasa. Tudi tehnološki postopki, zlasti intenziteta mešanja in čas fermentacije, pomembno vplivajo na volumen kruha. Zaradi premajhne intenzitete mešanja se sestavine ne premešajo dobro, glutenska mreža ni dovolj kakovostna, volumen je majhen. Prav tako lahko prevelika intenziteta mešanja privede do slabšega volumna zaradi oslabljenih medmolekulskih vezi oziroma zloma testa. Prekratek čas fermentacije vodi do premajhnega dviga testa, pri začetni fazи pečenja (nizek dvig temperature) je tako sekundarna fermentacija preburna, kar lahko privede do razpok v kruhu. Predolg čas fermentacije, ravno tako kot preveč intenzivno mešanje, privede do zloma testa. Po peki kruh vsebuje še veliko vodnih in alkoholnih hlapov, hitro ohlajanje privede do neželenih senzoričnih in vizualnih lastnosti. Kruh je primeren za transport in prodajo, ko se ohladi na sobno temperaturo (Cauvain, 2003).

2.2.4.2 Barva sredice

Barva kruha je pomemben aspekt izdelka, ki odločilno vpliva na kupčevu odločitev o nakupu. V času trendov prehranjevanja z manj rafiniranimi izdelki nam veliko pove o vrsti kruha, veliko lahko pove tudi o okusu in reoloških lastnostih, saj je barva v večini pogojena z izbiro moke, ki jo uporabljamo. Barva je lahko tudi pokazatelj kvara neobdelanih surovin, nanjo vpliva tudi vsebnost vode v moki (Jurga, 1993).

2.2.4.3 Okus

Senzorične lastnosti so odvisne od prav vseh postopkov v pridelavi kruha ter surovin, ki vstopajo v proces. Na okus poglavito vpliva izbira moke, priprava testa s kislim nastavkom ali z dodatkom kvasa, direkten ali indirekten zames, količina aditivov in vrsta aditivov. Na okus lahko močno vpliva tudi sekundarna kontaminacija surovin, izjemno pomembna je tudi stopnja pečenja in ravnjanje s kruhom po peki. Vsak tehnološki postopek igra pomembno vlogo pri okusu (Renčelj in sod., 1993).

2.2.5 Mikrobiološka stabilnost in trajnost kruha

Mikrobiološka stabilnost in trajnost kruha sta povezani s kontaminacijo kruha z mikroorganizmi in fizikalno-kemijskimi reakcijami, ki povzročajo staranje kruha.

2.2.5.1 Mikrobiološka stabilnost kruha

Najbolj pogosti mikrobiološki kontaminenti kruha so plesni ter bakterije rodu *Bacillus*, ki povzročajo mikrobiološki kvar, imenovan nitkavost. Poleg omenjenih so občasni kontaminenti kruha tudi nekateri sevi kvasovk.

Do kontaminacije kruha s plesnimi vedno pride po peki. Kruh po peki zaradi termične obdelave ne vsebuje plesni in njihovih spor (Ponte in Tsen, 1987). Po peki pride do kontaminacije kruha s plesnimi zaradi spor, prisotnih v zraku, ter navzkrižne kontaminacije ob ravnjanju s kruhom po peki (hlajenje, rezanje, pakiranje in skladiščenje). Ker je skorja kruha precej suha, se plesni ne bodo razvile v atmosferi, ki vsebuje manj kot 90 % relativne vlažnosti. Do rasti plesni na površini kruha pa pogosto pride v atmosferah z višjo relativno vlažnostjo, še posebej, če je kruh skladiščen v ovoju, zaradi katerega se na površini kruha še lažje kondenzira vlaga. Do kontaminacije sredice povečini pride med razrezom kruha, saj se plesni, ki so prisotne na skorji, z rezanjem prenesejo na sredico. Zaradi tega so najbolj izpostavljeni kontaminaciji vnaprej narezani pakirani kruhi, saj ovoj embalaže preprečuje izhajanje vlage, vlagi podvržena sredica pa je idealen medij za razvoj kvasovk (Cauvain in Young, 2000).

Najpogosteji kvarljivci kruha med plesnimi so plesni rodu *Penicillium spp.*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucorales*, *Rhizopus* in *Neurospora* (Saranraj in Geetha, 2011). Poleg samega kvara so nekatere plesni problematične, ker proizvajajo mikotoksine, ki lahko povzročajo veliko tveganje za zdravje potrošnikov. Mikotoksini so problematični, saj so zelo odporni in lahko preživijo povišane temperature med peko kruha. Če do kontaminacije žit oziroma drugih materialov s plesnimi, ki tvorijo mikotoksine, pride pred termično obdelavo, lahko takšen izdelek predstavlja potencialno tveganje za zdravje potrošnikov (Silliker, 1980).

Nitkavost povzročajo bakterije rodu *Bacillus*. Med njimi je najpogosteji povzročitelj nitkavosti vrsta *Bacillus subtilis*, vendar z omenjenim kvarom povezujemo tudi druge bakterije rodu *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. megaterium* in *B. cereus*). Do nitkavosti najpogosteje pride v poletnih mesecih, saj višje temperature nudijo ugodno okolje za razvoj omenjene bakterije. Izvor bakterij so surovi materiali in pekovska oprema. V samem testu pred peko ne prihaja do dodatnega razmnoževanja bakterij. Spore bakterij *Bacillus* lahko preživijo temperature termične obdelave med peko, še posebej, če temperatura sredice ne doseže vsaj 100 °C. Iz spor zrastle bakterije izločajo proteolitične in amilolitične encime, ki razgrajujejo gluten in škrob. Najprej pride do neprijetnega vonja kruha, nato do rumeno rjavih diskoloracij, na koncu pa do zmehčanja skorje, lepljivosti in nitkavosti (Fraizer in Westhoff, 1978). Kontaminacijo s sporami bakterij rodu *Bacillus* najlažje preprečujemo z dobro sanitacijo opreme in prostorov ter dobro proizvodno prakso, ali pa uporabimo kemijske konzervanse, kot je propionat, ki prav tako preprečuje kvar z omenjenimi bakterijami (Saranraj in Geetha, 2011).

Do kontaminacije kruha s kvasovkami pride med ravnjanjem s kruhom po peki. Kontaminacija je vidna kot rast kolonij na površini kruha. Najbolj pogosti kontaminenti so divje kvasovke

rodu *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* in *Pichia*. Zaradi hitre rasti in boljše odpornosti je najbolj problematična *Pichia butonii*, znana tudi kot kredasta kvasovka (Legan in Voysey, 1981). Ker do kontaminacije povečini prihaja preko nečiste pekovske opreme, dobra proizvodna praksa zmanjšuje možnosti kontaminacije s kvasovkami (Saranraj in Geetha, 2011).

Preprečitev mikrobioloških kontaminacij najlažje dosežemo z dobro sanitacijo prostorov ter dobro proizvodno prakso. Prav tako mikrobiološki kvar lahko preprečujemo z zamrzovanjem izdelkov, znižanjem vodne aktivnosti v izdelkih, uporabo kislega nastavka za zames testa ter naravnimi in kemijskimi konzervansi (Saranraj in Geetha, 2011).

2.2.5.2 Staranje kruha

Staranje kruha je posledica retrogradacije škroba in nekaterih drugih fizikalno-kemijskih dogodkov, ki povzročajo izgubo prožnosti in drobljivost sredice, mehčanje skorje ter izgubo svežine okusa in arome kruha (Gray in Bemiller, 2003).

Proces retrogradacije se začne z ohlajanjem kruha po zaključeni peki. Pri retrogradaciji se amiloza in amilopektin povrneta v svojo nativno kristalinično obliko, kar pomeni izgubo vode, s čimer sredica izgubi svojo elastičnost, pridobi pa trdoto (Miles in sod., 1985). Retrogradacija je najbolj izrazita pri temperaturah okrog 0 °C. Staranje skorje je najbolj povezano z vezavo vode. Skorja ni več krhka in trdna, ampak postane mehka in elastična (Lionetto in sod., 2006). Med skladiščenjem kruha pride do dehidracije ter izgube plastičnosti in fleksibilnosti glutenske mreže, kar tudi prispeva k staranju kruha. Posledice kemijskih sprememb glutena so podobne tistim pri retrogradaciji (Eliasson, 1983).

Na mehkobo in staranje sredice odločilno vplivajo tudi način zamesa (indirektni zames podaljša trajnost kruha), način peke, temperatura peke, uporabljeni surovini, aditivi (emulgatorji, maščoba, hidrokoloidi itd.) ter shranjevanje kruha po peki (temperatura skladiščenja, uporaba embalaž z modificirano atmosfero itd.) (Lionetto in sod., 2006).

2.3 BREZGLUTENSKI KRUH

Brezglutenski kruh je kruh, pri katerem se, enako kot pri kruhih z glutenom, pri oblikovanju testa vzpostavi tridimenzionalno ogrodje, zaradi katerega lahko kruh vzhaja, ne vsebuje pa beljakovin glutena. Velika večina pekovskih izdelkov za izdelavo uporablja pšenično moko in druge moke, ki vsebujejo gluten. Gluten ima namreč edinstveno lastnost. Po mešanju in polni hidrataciji glutenini, ki testu zagotavljajo elastičnost in moč, in gliadini, ki testu zagotavljajo viskoznost, medsebojno reagirajo in s tem tvorijo močno viskoelastično mrežo. Gluten je torej osnovni gradnik, ki kruhu nudi primerne reološke lastnosti in zagotavlja vzhajanje, s tem pa tudi nežnost in zračnost samega izdelka (Mariotti in sod, 2009). Jasno je, da zamenjava tega osnovnega gradnika v pekarstvu pomeni velik tehnološki izziv.

2.3.1 Glavne sestavine in tehnologija pri izdelavi brezglutenskega kruha

Obstajajo brezglutenski pekovski izdelki iz številnih sestavin, najbolj zastopani pa so izdelki iz riževe moke, krompirjevega in koruznega škroba, čičerikine, grahove, sojine, ajdove in kvinojine moke ter drugih sestavin. Za tvorbo mrežne strukture, ki kruhu omogoča vzhajanje, se uporablja različne hidrokoloide (preglednica 1) (Mir in sod., 2016; BeMiller, 2008).

Preglednica 1: Tip moke in hidrokoloidov, uporabljenih pri izdelavi brezglutenskega kruha (povzeto po Mir in sod., 2016)

Tip moke	Hidrokoloid
riževa	hidroksipropilmetil celuloza
Čičerikina moka iz zemeljskih mandljev, koruzni škrob	ksantan gumi
riževa, koruzna, koruzni škrob	cress seed gum (gumi semen kreše), ksantan gumi
moka iz rjavega riža	ksantan gumi, guar gumi, gumi iz zrn rožičevca, metilceluloza, karboksimetil celuloza, hidroksipropilmetil celuloza
riževa, koruzni škrob	karboksimetil celuloza, ksantan gumi
ajdova	hidroksipropilmetil celuloza
riževa, koruzna, ajdova	hidroksipropilmetil celuloza, ksantan gumi
kostanjeva, moka iz chie	guar gumi, hidroksipropilmetil celuloza
riževa, koruzni škrob, krompirjev škrob	ksantan gumi, guar gumi
kostanjeva, riževa	ksantan gumi, guar gumi
riževa, koruzna, sojina	karboksimetil celuloza, ksantan gumi
riževa, koruzna, sojina	karagenan, alginati, ksantan gumi, karboksimetil celuloza
maniokina	ksantan gumi
riževa, krompirjev škrob	ksantan gumi, hidroksipropilmetil celuloza
riževa, koruzni škrob	karboksimetil celuloza, pektini, agar, ksantan gumi, β -glukan
riževa, koruzni škrob, krompirjev škrob	ksantan gumi
riževa	ksantan gumi, hidroksipropilmetil celuloza
riževa, krompirjev škrob	hidroksipropilmetil celuloza
moka iz sirka	ksantan gumi
riževa, krompirjev škrob	hidroksipropilmetil celuloza, karboksimetil celuloza, guar gumi
riževa, koruzni škrob, maniokina moka	ksantan gumi

Hidrokoloidi morajo imeti dobro sposobnost vezave vode, ki pa se mora med postopkom pečenja sprostiti, da lahko pride do zaklejitve škroba. Pri oblikovanju testa brezglutenskih pekarskih izdelkov se veliko uporablja guar gumi in moka iz endosperma rožičevih semen (ang. *locust bean gum*). Obe sestavini rastline skladiščijo v obliki polisaharida galaktomanana, ki je sestavljen iz manoze in galaktoze (Hribar in Gobec, 1999). Za

hidrokoloida je značilno, da okoli molekule tvorita hidratno opno, ki ima sposobnost tvorbe bolj viskozne raztopine (Jud in Brümer, 1990). Poleg omenjenih se v pekarstvu veliko uporablja tudi celuloza v vseh svojih modificiranih oblikah. Posebej veliko je uporabljena hidroksipropilmetylceluloza (HPMC). Uporablajo se tudi naravne gume, kot so ksantan gumi, gumi iz zrn rožičevca (LBG), guar gumi, alginati, agar, pektini in drugi (Mir in sod., 2016).

Reološke lastnosti testa se torej oblikujejo z nabrekanjem hidrokoloidov. Hkratna uporaba dveh hidrokoloidov da boljše rezultate kot uporaba samo enega. Jud in Brümmer (1990) sta ugotovila, da zelo dobre tehnološke lastnosti dobimo ob sočasni uporabi guar gumija (topen pri nizkih temperaturah) in uporabe LBG (topen pri višjih temperaturah). Lastnosti galaktomanana, ki je topen pri višjih temperaturah, se začnejo izražati šele po koncu pečenja, do takrat ima samo sposobnosti zgoščevanja. Pozno nastala viskoznost testa tako pozitivno vpliva na viskoelastične lastnosti kruha in tvorbo skorje.

Proizvodnja brezglutenskega kruha poteka zelo podobno proizvodnji pšeničnega kruha. Uporabljata se indirekten in direkten zames, vendar je ravno tako kot pri proizvodnji pšeničnega kruha največkrat uporabljen direktni zames. Ena od razlik med zamesom pšeničnega in brezglutenskega kruha je, da iz brezglutenskega testa zaradi velike viskoznosti ne moremo oblikovati hlebcev ali štruc. Vzhajanje, peka in shranjevanje potekajo enako kot pri ostalem kruhu (Jud in Brümer, 1997).

2.3.2 Psevdo žita

Veliko najbolj uporabljenih mok za izdelavo brezglutenskega kruha je s prehranskega vidika revnih, zato pomembna postajajo psevdo žita. Psevdo žita so rastline, ki jih vzugajamo kot poljščine za proizvodnjo škrobnih zrn, ki so primerna za človeško prehrano. Med psevdo žita ne spadajo rastline, ki že spadajo v katero od drugih skupin, kot so žita (*Gramineae*) in stročnice (*Leguminosae*), ali rastlin, gojenih zaradi oljnih semen ali oreščkov. Najpogosteje se med psevdo žiti omenja amarant, ajdo in kvinoja (Alvarez-Jubete in sod., 2010). Omenjena psevdo žita imajo glede na svojo sestavo in v primerjavi s pšenico dobre hranične vrednosti (Preglednica 2). Imajo visoko vsebnost beljakovin z dobro aminokislinsko sestavo, saj večino beljakovin v semenih teh rastlin tvorijo globulini in albumini. Imajo višjo biološko vrednost v primerjavi z drugimi običajnimi žiti in zelo podobno aminokislinsko sestavo kot živalske beljakovine (Bressani, 1994; Drzewiecki in sod, 2003). Amarant, kvinoja in ajda ravno tako vsebujejo veliko prehranske vlaknine, nenasičenih maščobnih kislin, polifenolov in veliko počasi prebavljivih ogljikovih hidratov (Alvarez-Jubete in sod., 2009). Zaradi teh lastnosti imajo nizek glikemični indeks, kar je zelo pomembno za bolnike s celiakijo, saj naj bi bili bolj podvrženi obolenju za diabetesom tipa I (Berti in sod., 2004; Škrabanja in sod., 2001).

Preglednica 2: Kemijska sestava semen amaranta, kvinoje in ajde (povzeto po Alvarez-Jubete in sod., 2009). Podatki so podani kot odstotek suhe teže ± standardna deviacija.

Zrno	Proteini	Maščobe	Škrob	Prehranska vlaknina	Pepeł
Amarant	16, 5 ± 0, 3	5, 7 ± 0, 3	61, 4 ± 0, 8	20, 6 ± 1, 1	2, 8 ± 0, 0
Kvinoja	14, 5 ± 0, 3	5, 2 ± 0, 1	64, 2 ± 1, 3	14, 2 ± 0, 6	2, 7 ± 0, 0
Ajda	12, 5 ± 0, 3	2, 1 ± 0, 1	58, 9 ± 1, 3	29, 5 ± 1, 2	2, 1 ± 0, 0

Omenjena psevdo žita lahko vplivajo na regulacijo holesterola v krvi, kar pomaga pri preprečevanju pojava srčno-žilnih bolezni. Prav tako so amarant, kvinoja in ajda, poleg tega da imajo dobro sestavo makrohranil, bogati glede vsebnosti vitamina B in E, vsebujejo tudi veliko več mineralov kot npr. pšenica (Bruni in sod., 2001; Berghofer in Schoenlechner, 2002; Bonafaccia in sod., 2003; Alvarez-Jubete in sod., 2009).

Preglednica 3: Vsebnost nekaterih mineralov v semenih amaranta, kvinoje in ajde (povzeto po Alvarez-Jubete in sod., 2009). Podatki so podani v mg/g suhe teže ± standardna deviacija.

Zrno	Ca	Mg	Zn	Fe
Amarant	180, 1 ± 6, 1	279, 2 ± 1, 1	1, 6 ± 0, 0	9, 2 ± 0, 2
Kvinoja	32, 9 ± 3, 3	206, 8 ± 6, 4	1, 8 ± 0, 0	5, 5 ± 0, 5
Ajda	60, 9 ± 3, 3	203, 4 ± 8, 8	1, 0 ± 0, 0	4, 7 ± 0, 1
Pšenica	34, 8 ± 0, 0	96, 4 ± 3, 7	1, 2 ± 0, 1	3, 3 ± 0, 1

Psevdo žita so komercialno še vedno manj pomembna surovina na svetovnem tržišču. V preteklosti so sicer v marsikateri svetovni regiji predstavljala enega od stebrov vsakodnevne prehrane, saj so nekatera zelo hvaležna za vzgojo v zahtevnih pogojih. Zaradi tega in zelo dobrih prehranskih lastnosti postajajo tudi danes zanimivi nadomestki za »klasična« žita, predvsem v prehrani ljudi, ki so alergični na tradicionalna žita, kot je pšenica (Fletcher, 2016).

Zaradi svoje razširjenosti skozi zgodovino in dobre biološke vrednosti je eno bolj zanimivih psevdo žit ajda. Ima visoko vsebnost flavonoidov in polifenolov (Watanabe in sod., 1997), je eden najboljših beljakovinskih virov med rastlinami (Wei in sod., 1995), je zelo zanimiv vir prehranske vlaknine (Bonafaccia in sod., 2003). Poleg tega dokazano izboljšuje glukozno toleranco, preprečevala naj bi tudi pojav diabetesa med odraslimi. Ker vsebuje veliko kompleksnih ogljikovih hidratov in neprebavljivega škroba, se zelo počasi presnavlja (Edwardson, 1996).

2.4 AJDA

Ajda je poljščina, ki se uporablja po celiem svetu in je priznana kot dober vir prehransko dragocenih beljakovin, maščob, prehranske vlaknine in mineralov. Zaradi kombinacije še drugih na zdravje pozitivno delujočih sestavin, kot so flavonoidi, fagopirin ter ajdini steroli, v svetu že nekaj časa vlada veliko zanimanje za to rastlino (Ikeda, 2002; Kreft in Škrabanja, 2002; Li in Zhang, 2001).

2.4.1 Klasifikacija

Ajda je dvokaličnica in spada v družino dresnovk (*Polygonaceae*). Večina ostalih žit je enokaličnic, uvrščene so v družino trav. Kljub botaničnim razlikam pa jo v kmetijstvu, trgovini in predelavi zaradi podobne poti pridelovanja, predelovanja in uporabe pogosto uvrščamo v skupino žit. Ajda kot žito zaradi oblike socvetja spada v skupino s prosom, sirkom in rižem. Najbolj uporaben del ajde so njena semena. Z luščenjem pridobivamo ajdovo kašo, z mletjem pa ajdovo moko, otoče pridobimo z odstranitvijo semenskega ovoja (Kreft, 1995).

2.4.2 Kemijska sestava ajdove moke

Ajdovo moko sestavlja 60–70 % ogljikovih hidratov, 10–12 % beljakovin, 5–8 % vlaknin, 2 % maščob, 2 % mineralnih snovi, 1 % fitinske kislina ter nekaj polifenolov, vitaminov in drugih snovi. Sestava je odvisna od sorte, stopnje zrelosti, klimatskih razmer, tipa zemlje, načina pridelave in vrste gojenja (Kreft in sod., 1999; Constantini in sod., 2014).

2.4.2.1 Ogljikovi hidrati

Večino ogljikovih hidratov v ajdovi moki predstavlja škrob (59–70 %), sestavljen iz amiloze in amilopektina, katerih razmerje je 1 : 3,2. Ajdovo seme vsebuje tudi nekaj rezistentnega škroba, ki ga prebavni encimi ne morejo razgraditi, a zaradi tega deluje kot prehranska vlaknina. Po končni encimski razgradnji rezistentni škrob ne razпадa na glukozne podenote, ampak kot končni produkt nastaneta maslena kislina, ki preprečuje nastanek raka na debelem črevesju, in propionska kislina, ki omogoča uravnavanje sladkorja v telesu (Kreft, 1999).

2.4.2.2 Beljakovine

Ajdine beljakovine imajo visoko biološko vrednost (razmerje med količino uskladiščenega in skupno količino prebavljenega in absorbiranega dušika pri presnovi beljakovin). Ajdova moka vsebuje okrog 12 % beljakovin, podobno kot pšenica, vendar obstaja razlika v beljakovinski sestavi. Ajda je namreč bolj bogata z albumini in globulinami ter vsebuje manj prolaminov in glutelinov kot pšenica. Prav tako ne vsebuje neprebavljivega glutena, zaradi česar imajo ajdine beljakovine tudi tako dobro biološko vrednost (93) (Bonafaccia in sod., 2003; Kreft 1995; Constantini in sod., 2014). Primerjavo razmerij med albuminom, globulinom, prolaminom in glutelinom so opravili Bonafaccia in sod. (1994) pri analizi petih vzorcev ajde iz različnih delov Italije. Določili so 44,1 % globulinov, 22,5 % glutelinov, 18,4 % albuminov, 0,7 % prolaminov in 14,1 % netopnega proteinskega ostanka. Določili so tudi povprečno vrednost lizina, ki je znašala 6,5–7 %. Albumini imajo visoko vsebnost aminokislin histidina, treonina, valina, izolevcina, levcina in lizina, globulini pa metionina in lizina (Xiaona in sod., 2006).

Visoka biološka vrednost ajde je povezana z dobro uravnoveženo aminokislinsko sestavo in visoko vsebnostjo arginina in lizina, ki ga ima ajda največ med vsemi živili. Ugotovljeno je

bilo, da ima uživanje ajdinih beljakovin blagodejne učinke na zdravljenje človeških kroničnih obolenj, nižanje krvnega holesterola, preprečevanja nastajanja žolčnih kamnov (Tomotake in sod., 2000). Pri ljudeh, ki uživajo ajdo, je bila ugotovljena tudi manjša razširjenost hipoglikemije in pri diabetikih boljša glukozna toleranca (Zhang in sod., 2007).

2.4.2.3 Maščobe

Ajdova moka vsebuje 1,5–3,7 % maščob. Oluščena zrna vsebujejo povprečno 2,1–2,6 % maščob v suhi snovi. Največ (81–85 %) je nevtralnih maščob, 8–11 % je fosfolipidov in 3–5 % glikolipidov. Glavne maščobne kisline v ajdi so palmitinska (16 : 0), stearinska (18 : 0), oleinska (18 : 1), linolna (18 : 2), linolenska (18 : 3), arahidinska (20 : 0), behenska (22 : 0) in lignocerična maščobna kislina (24 : 0). Najbolj zastopane maščobne kisline v večini žit so tiste z verigo 16–18 ogljikovih atomov, kisline z daljšimi verigami pa so prisotne v manjših količinah ali jih sploh ni. V ajdi predstavljajo 8 % vseh skupnih maščobnih kislin (Mazza, 1993; Constantini in sod., 2014).

Ajda zaradi vsebnosti maščobnih kislin ni primerna za daljše skladiščenje. Po daljšem skladiščenju prihaja do hidrolize in oksidacije maščob. Zmanjšuje se vsebnost trigliceridov, povečuje pa vsebnost prostih maščobnih kislin. Ta proces se odraža z neprijetnim vonjem in okusom moke. Dobro kakovost ohranja do dva meseca po mletju (Przybylski in sod., 1995).

2.4.2.4 Prehranska vlaknina

Največ vlaknin je v luski, plevi in alevronski plasti. Topne vlaknine predstavljajo rezistentni škrob, gume, pektinske snovi in beta glukani. Prehranske vlaknine znižujejo tveganje za nastanek srčnih obolenj, raka na danki in debelem črevesju. Znižujejo količino žolčnih kislin in količino holesterola v krvi. Prehranske vlaknine znižujejo koncentracijo topnih ogljikovih hidratov (ajda jih ima samo 48,7 %), zato imajo živila iz ajde nižji glikemični indeks in so primerna za diabetike (Steadman in sod., 2001; Roberfroid, 1993). Neoluščeno zrno ajde vsebuje 12,7 % surovih vlaknin, medtem ko jih ajdova moka vsebuje 6,5 % (Javornik in sod., 1981; Steadman in sod., 2001). Ajdovi otrobi vsebujejo 7,7–9,2 % topnih vlaknin, medtem ko jih pšenični otrobi vsebujejo 4,3 % (Steadman in sod., 2001).

2.4.2.5 Polifenoli in flavonoidi

Ajda je bogata s polifenolnimi spojinami, vsebuje šest flavonoidov – rutin, orientin, viteksin, kvercetin, izoviteksin in orientin. Kvercetin je zaradi svoje efektivne antioksidativne aktivnosti in dobre absorpcije iz hrane najbolj raziskovan flavonoid. Obstaja predvsem v glikoliziranih oblikah, kakršna je npr. rutin (kvercetin-3-rutinozid). Ponekod se rutin v medicini uporablja za zmanjšanje krhkosti kapilar, kar je povezano z nekaterimi hemoragičnimi boleznimi in hipertenzijo pri ljudeh (Yildzogle-Ari in sod., 1991). Rutin je med antioksidativnimi sestavinami v ajdi priznan kot najbolj varovalen za zdravje, dokazane so bile njegove protivnetne in antikarcinogene lastnosti (Liu in sod., 2008).

Preglednica 4: Vsebnost polifenolov, flavonoidov in antioksidativni potencial pšenične in ajdove moke (povzeto po Constantini in sod., 2014)

	Skupna vsebnost polifenolov	Skupna vsebnost flavonoidov	Antioksidativni potencial	
	(mg GAE/g)	(mg RE/g)	FRAP (mmol Fe ²⁺ + E/g)	ORAC (mmol GAE/g)
Pšenična moka	9,6 ± 0,1	0,80 ± 0,05	0,30 ± 0,01	2,6 ± 1,1
Ajdova moka	29,3 ± 0,5	1,0 ± 0,2	9,1 ± 1,6	139,3 ± 33,4

Količina fenolov med peko kruha se spreminja, še posebej količina rutina in kvercetina. Vogrinčič in sodelavci (2010) so pri poskusu za peko uporabili dve vrsti moke – pri prvem vzorcu čisto moko tatarske ajde, pri drugem pa mešanico moke tatarske ajde in bele moke. Ob dodajanju vode moki se je vsebnost rutina zmanjšala, količina kvercetina pa naraščala. Med peko se je količina rutina dodatno zmanjšala, vsebnosti kvercetina so ostale nespremenjene. Vsebnost rutina pri uporabi moke iz navadne ajde je bila po peki 0,47 mg/g, kvercetina pa 4,83 mg/g.

2.4.2.6 Fagopirin

Fagopirini so kompleksne organske spojine z naftodiantronskim aromatskim skeletom. Največ fagopirinov se nahaja v cvetovih ajde. Ob večjih količinah konzumiranega fagopirina pride do občutljivosti na svetlobo. Ta pojav se imenuje fagopirizem. Podobne znake so kazale tudi živali, ki so bile krmljene z zeljo ajde in nato izpostavljene sončni svetlobi. Fagopirin se pri ajdi pojavlja tudi v steblih in listih, v zrnu ga praktično ni, zato ajdova moka s tega vidika ni problematična (Kreft in sod., 2008; Eguchi in sod., 2009).

2.4.3 Pecilne lastnosti ajdove moke

Ajdova moka ne vsebuje glutena ali glutenu podobnih beljakovin, ki bi omogočale nastanek beljakovinskega ogrodja, ki bi kruhu omogočalo normalno vzhajanje testa in fiksacijo strukture samega kruha. Navadno se ajdova moka uporablja kot dodatek za obogatenje prehransko revnih mešanic za peko kruha. Odsotnost glutena v ajdovi moki ima velik vpliv na senzorične in reološke lastnosti kruha. Med vzhajanjem nastali CO₂ se ne more vezati, saj se v testu zaradi odsotnosti glutena ne more oblikovati mrežna struktura, ki v pšeničnem testu nase veže nastali CO₂. Zaradi tega ima ajdov kruh precej nižji volumen in zato tudi slabšo rahlost sredice (Houben in sod., 2012). Možna rešitev za izboljšanje senzoričnih in reoloških značilnosti je uporaba hidrokoloidov, ki v testu oblikujejo podobne mrežne strukture kot gluten. Kruhi imajo tako večji volumen in boljše senzorične lastnosti (Kang in sod., 1996).

2.5 ROŽIČ

2.5.1 Klasifikacija in uporaba

Rožič (*Ceratonia siliqua* L.) je eno bolj uporabnih avtohtonih mediteranskih dreves. Rožičevi stroki so se tradicionalno uporabljali za človeško in živalsko hrano (Craig in Nguyen, 1984). V preteklosti so se rožičevi stroki veliko uporabljali v prehrani, še posebej kot posladek ali v izjemnih okoliščinah (npr. v vojnah). Rožičev plod sestavlja semena in strok. Dandanes se rožič oz. njegova semena največ uporablja za proizvodnjo polisaharida LBG (angl. *locust bean gum*). To je galaktomanan, ki je uporaben kot stabilizator in zgoščevalec v živilski in farmacevtski industriji. Iz rožičevega stroka se prideluje kaša oz. nadalje rožičeva moka, ki se v živilski industriji uporablja kot manj kalorični nadomestek kakava (za razliko od kakava ne vsebuje kofeina in teobromina) (Craig in Nguyen, 1984).

Rožičeva kaša, odvisno od podnebja in vrste, vsebuje kar 40–60 % ogljikovih hidratov nizke molekularne teže, predvsem saharoze (Marakis, 1996; Calixto in Canellas, 1982), od tega približno 14 % reducirajočih sladkorjev. Rožičev strok vsebuje 7 % beljakovin, minerale v sledovih ter velike količine prehranskih vlaknin in polifenolov. Prehranske vlaknine imajo veliko fizioloških učinkov, predvsem pri izboljševanju prebave ter uravnavanju ravni krvnega holesterola in sladkorja (Wolever in Jenkins, 1993; Anderson in sod., 1999). Prehranske vlaknine naj bi ščitile tudi pred rakom na prebavilih (Whiteley in Klurfeld, 2000; Bingham in sod., 2003). Poleg prehranskih vlaknin na zdravje ugodno vplivajo tudi polifenoli, ki delujejo antioksidativno (Rice-Evans in sod., 1995), antimutageno (Yamagishi in sod., 2000) in antikarcinogeno (Mukhtar in sod., 1992).

2.5.2 Kemijska sestava

2.5.2.1 Sladkorji, prehranska vlaknina in organske kisline

Etanolni izvlečki rožičevega stroka vsebujejo tri glavne sladkorje: saharozo (437,3 mg/g suhe teže), glukozo (395,3 mg/g suhe snovi) in fruktozo (42,3 mg/g suhe snovi). Skupno ti trije sladkorji predstavljajo 87,54 % skupne suhe snovi. Velik delež rožičevega stroka predstavlja prehranska vlaknina (Tsatsaragkou in sod., 2012). V stroku je tudi 2,4 mg/g suhe snovi. Citronske kisline in askorbinske kisline ni v območju zaznavnih vrednosti. Vsebnosti sladkorja v sadežu lahko precej nihajo glede na sorto, fiziološko zrelost, sezono obiranja, podnebje in pogoje skladiščenja (Ayaz in sod., 2007).

2.5.2.2 Beljakovine in aminokislinska sestava

Rožičev strok vsebuje med 1 in 5 % beljakovin v suhi snovi (povprečje med 2 in 3 %) (Avallone in sod., 1997). Enako kot količina sladkorjev je tudi količina beljakovin pogojena z vrsto ter podnebnimi dejavniki, zato ni čudno, da so drugi avtorji določili tudi drugačne količine beljakovin, npr. Morton (1987) je določil 4,5 % beljakovin v suhi snovi. Beljakovinam v rožičevih strokih je bilo določenih 18 aminokislinskih. Asparaginska kislina

(asparaginska kislina + asparagin), alanin, glutaminska kislina (glutaminska kislina + glutamin), levcin in valin skupaj predstavlja 57 % suhe mase beljakovin. Od tega levcin in valin predstavlja 18,25 g/100 g suhe mase beljakovin, preostale tri že omenjene aminokisline 9,1–10,6 g/100 g suhe mase beljakovin, cistein ima od vseh najmanjšo koncentracijo, ki znaša 0,8 g/100 g suhe mase beljakovin (Ayaz in sod., 2007).

2.5.2.3 Minerali

Rožič vsebuje 1–6 % mineralov (Ayaz in sod., 2007). Vsebuje štiri minerale, ki spadajo med makrominerale (Ca, P, K in Mg), ter štiri mikrominerale (Fe, Cu, Mn in Zn). Med prvimi prevladuje kalij, a rožičev strok vsebuje tudi večje količine kalcija. Količina fosforja in magnezija je znatno nižja. Med mikrominerali prevladujeta železo in mangan, čeprav tudi vsebnosti cinka in bakra nista zanemarljivi.

2.5.2.4 Polifenoli

Rožičeva moka vsebuje veliko polifenolov (Avallone in sod., 1997), posebej kondenziranih taninov (Ayaz in sod., 2007). Rožičeva moka vsebuje 71,03–2428,84 mg/100 g skupnih polifenolov (Durazzo in sod., 2014).

2.5.2.5 Pecilne lastnosti rožičeve moke

O pecilnih lastnostih rožičeve moke v pekarski industriji ni bilo narejenih veliko raziskav, zato so podatki nejasni. Rožičeva moka vsebuje veliko prehranske vlaknine in hidrokoloidov, ki pozitivno vplivajo na senzorične lastnosti brezglutenskega kruha. Tsatsaragkou in sod. (2012) so dodatek rožičeve moke uporabili pri proizvodnji riževega brezglutenskega kruha. Dodatek rožičeve moke je imel negativen vpliv na vsebnost vlage v kruhu, saj je prehranska vlaknina v rožičevi moki vezala prosto vodo. Elastičnost kruha je bila slabša, se je pa pokazal pozitiven vpliv na poroznost sredice in volumen kruha.

2.6 PRIPRAVA STARTERSKE KULTURE

Najbolj pogosto uporabljeni kvasovki za fermentacijo kruha je *Saccharomyces cerevisiae*. V prodaji jo lahko najdemo v treh aktivnih oblikah. Kompresirani kvas je najbolj aktiven in najbolj izenačene kakovosti. Primeren je za vse pekovsko pecivo, uporabljamo ga 2,5–8 %, odvisno od vrste moke. Aktivni suhi kvas vsebuje 6–8 % vode in 40–45 % proteinov. Pred uporabo ga je treba rehidrirati v vodi s temperaturo 41–45 °C od 5 do 10 minut. Ravno tako kot kompresirani kvas je uporaben za vse izdelke v pekarstvu. Obstaja še instant aktivni suhi kvas, ki vsebuje 4–6 % vode in 38–60 % proteinov. Prednost instant aktivnega suhega kvasa je, da se dobro meša s sestavinami in ne potrebuje predhodne rehidracije (Batič in Raspot, 1994).

V zadnjih letih se je v svetu povečal vsesplošni interes za izboljšavo zdravja in preventivo pred boleznimi z uporabo funkcionalne hrane, ki vsebuje probiotične bakterije. Trenutna

definicija probiotikov s strani FAO/WHO pravi, da so probiotiki »... živi mikroorganizmi, ki dodani v zadostnih količinah delujejo zdravju blagodejno na gostitelja.« (FAO/WHO, 2002). V pekarstvu se uporablja veliko probiotičnih bakterij, kot so *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* in *Leuconostoc* (Jensen, 1998), ki se jih zaradi njihove metabolne aktivnosti (mlečnokislinska fermentacija, proteoliza ...) uporablja pri indirektnem zamesu testa s kislim nastavkom. Poleg ugodnega vpliva na vzhajanje testa zaradi svojih metabolitov delujejo antimikrobnno na druge bakterije in pozitivno vplivajo na senzorične lastnosti kruha (Pokorn, 2001).

V pekarstvu pa še ni bilo uporabljeni probiotične kvasovke, ki bi lahko združila zdravju prijazne lastnosti probiotika z učinkovitostjo klasične kvasovke. Raziskava na Katedri za biotehnologijo na Biotehnični fakulteti Univerze v Ljubljani je potrdila, da se lahko probiotična kvasovka *Saccharomyces boulardii* v tehnološkem smislu enakovredno kosa s klasično uporabljeni kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, saj po senzoričnih ocenah (poroznost, volumen, barva, okus itd.) ni bilo bistvene razlike med kruhi, fermentiranimi s kvasovko *S. boulardii*, in kruhi, fermentiranimi s kvasovko *S. cerevisiae* (Griz, 2015).

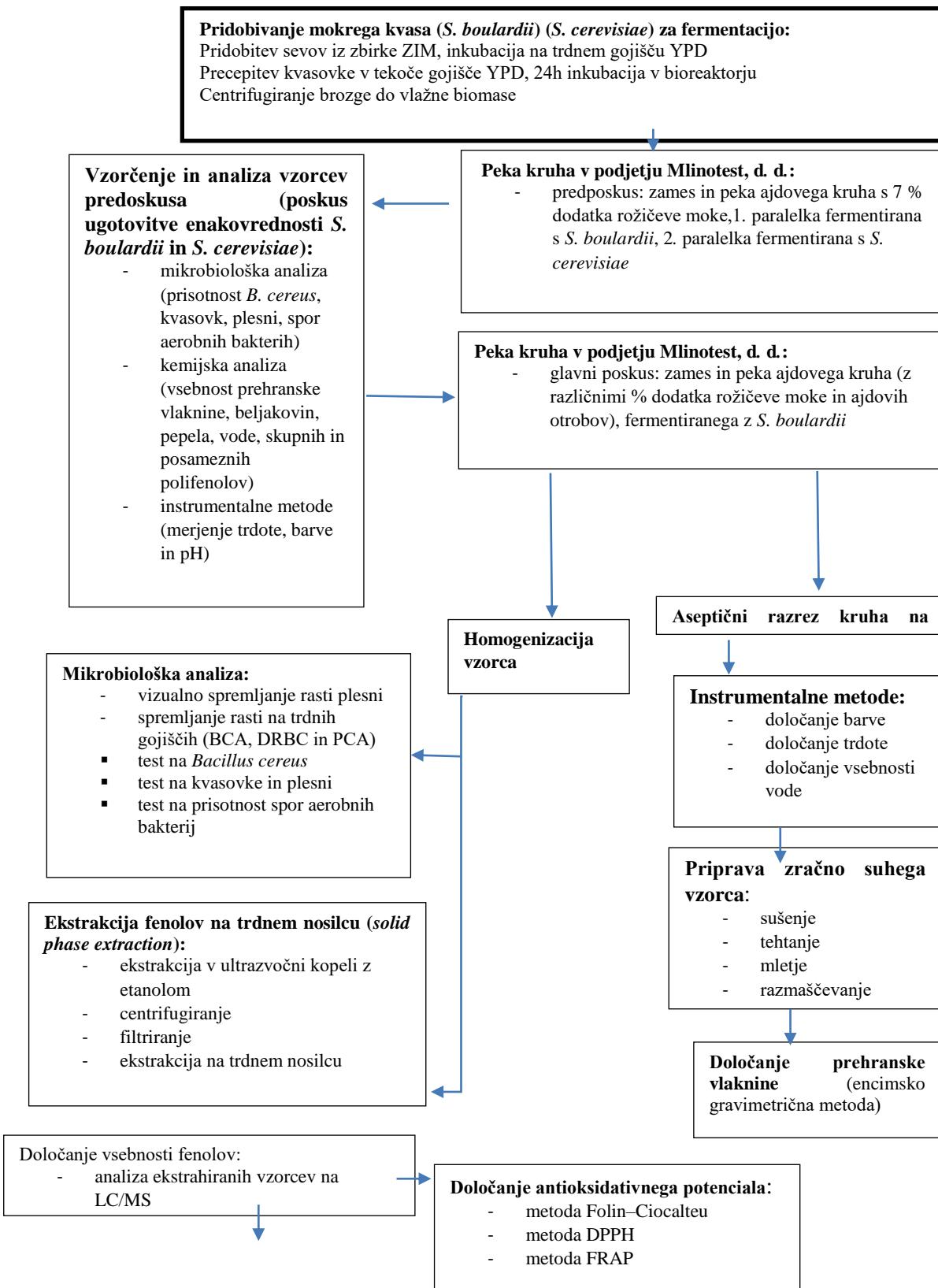
Saccharomyces boulardii so termotolerantne kvasovke, ki rastejo pri nenavadno visokih temperaturah do 37 °C. Celice *S. boulardii* imajo ovalno obliko, dolžino 10 µm in širino 5 µm. Tvorijo debelo celično steno, ki lahko predstavlja do 30 % celotne teže suhe celice, s 85 % polisaharidov in 15 % proteinov. Polisaharidi sestojijo iz 80–90 % glukoze, 10–20 % ostankov manoze in 1–2 % N-acetylglukozamina (Lesage in Bussey, 2006). Rastejo v aerobnih in anaerobnih pogojih. *S. boulardii* za fermentacijo najraje porablja glukozo, pa tudi druge monosaharide, oligosaharide, etanol, acetat, glicerol, piruvat in laktat. Glukoza se presnavlja preko glikolitične poti. *S. boulardii* pri presnovi prednost pred dihanjem daje fermentaciji. Pri fermentaciji nastaja etanol. Nefermentabilni viri ogljika morajo vstopiti v glukoneogenezo (Dickinson in Schweizer, 1999).

Saccharomyces boulardii je podobna *Saccharomyces cerevisiae*, zaradi česar je dolgo veljalo, da je sevovar omenjene kvasovke (McFarland in Bernasconi, 1993). Čeprav taksonomija ni znanstveno potrjena, so *S. boulardii* sorodne, vendar različne od *Saccharomyces cerevisiae* v več taksonomskih metabolnih in genetskih lastnostih (Malgoire in sod., 2005).

S. boulardii se uporablja za preventivo in zdravljenje diareje ter bolezni razdraženega črevesja. V primeru infektivne diareje, dajanje kvasovk *S. boulardii* živalim nudi zaščito pred črevesnimi lezijami, ki jih povzročajo številni diarejni patogeni (Pothoulakis, 2009). Iz prebavnega trakta jih odstranijo protiglivična sredstva (Bergogne-Bérénin, 1995), odporne pa so proti antibiotikom. *Saccharomyces boulardii* v prebavnem traktu sprošča encime, proteine in druge dejavnike, s katerimi izboljšuje gostiteljevo imunsko obrambo, prebavo in absorpcijo hranil (Buts in De Keyser, 2006).

3. MATERIALI IN METODE DELA

3.1 HODOGRAM POSKUSA



Slika 1: Hodogram poskusa

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizmi

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili probiotično kvasovko *Saccharomyces boulardii* ZIM 2263 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Sev smo revitalizirali na trdnem gojišču YPD. Kvasovke smo nato 48 ur inkubirali na temperaturi 28 °C.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Agar BCA (*Bacillus cereus* agar)

Je kromogeno selektivno gojišče za ugotavljanje prisotnosti vrst *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis*. Tvorijo modre kolonije s temnejšo cono.

Sestava: 10 g/l D-manitola, 1 g/l peptona, 10 g/l natrijevega piruvata, 2 g/l natrijevega klorida, 0,1 g/l magnezijevega sulfata, 0,25 g/l kalijevega dihidrogen fosfata, 2,5 g/l dinatrijevega hidrogen fosfata, 0,12 g/l bromotimol modro, 15 g/l agarja.

Priprava: V 470 ml destilirane vode smo zatehtali 20,5 g suhega gojišča BCA in ga avtoklavirali 20 minut na 120 °C. Nato smo vzorec ohladili na 60 °C in mu v laminariju aseptično dodali eno vialo *Bacillus cereus antimicrobial* suplementa, ki smo ga zmešali s 5 ml sterilne destilirane vode in 25 ml emulzije rumenjaka. Gojišče smo na koncu aseptično razlili v petrijevke ter ga čez noč pustili v laminariju, da se je formiralo trdno agregatno stanje.

3.2.2.2 Agar DRBC

Na selektivnem gojišču za plesni in kvasovke se v petih dneh po absorpciji barvila rose bengal pojavijo rožnate kolonije teh kultur.

Sestava: 5,0 g peptona, 10,0 g glukoze, 1,0 g kalijevega hidrogen sulfata, 0,5 g magnezijevega sulfita, 0,002 g/l diklorana 0,025 g/l barvila rose bengal, 15,0 g agarja.

Priprava: V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 15,75 g suhega gojišča DRBC, mu dodali s 3 ml 100-% etanola rehidrirano vialo floramfenikola in ga avtoklavirali 20 minut na 120 °C. Nato smo gojišče ohladili na 45 °C, ga aseptično razlili v petrijevke in ga čez noč pustili v laminariju, da se je formiralo trdno agregatno stanje.

3.2.2.3 Agar PCA

Sestava: 5 g/l triptona, 2,5 g/l kvasnega ekstrakta, 1 g/l glukoze, 9 g/l agarja, pH 7,0 ± 0,2.

Priprava: V 250-ml steklenico za vsak vzorec kruha zatehtamo 1,75 g PCA gojišča, dodamo 100 ml destilirane vode in avtoklaviramo.

3.2.2.4 Tekoče gojišče YPD

Sestava: 20 g/l peptona, 10 g/l kvasnega ekstrakta, 20 g/l glukoze.

Priprava: V 750 ml destilirane vode smo zatehtali 37,5 g suhega gojišča YPD. Tekoče gojišče smo nato avtoklavirali 20 min na 120 °C.

3.2.2.5 Trdno gojišče YPD

Sestava: 20 g/l peptona, 10 g/l kvasnega ekstrakta, 20 g/l glukoze.

Priprava: V 750 ml destilirane vode smo zatehtali 37,5 g suhega gojišča YPD in 7,5 g agarja. Gojišče smo avtoklavirali 20 min na 120 °C, ga nato ohladili na 45 °C in aseptično razlili v petrijevke. Petrijevke smo čez noč pustili v laminariju, da se je agar strdil.

3.2.3 Reagenti

Preglednica 5: Reagenti

destilirana voda	aceton
KH_2PO_4	celit
NaOH	α -amilazna raztopina (Termamyl, Bioquant®, Merck)
agar	proteazna raztopina (Protesal, Bioquant®, Merck)
<i>Bacillus cereus</i> antimikrobní suplement	amiloglukozidazna raztopina (Bioquant®, Merck)
kloramfenikol	acetatni pufer (pH 3,6)
etanol (100 %, 96 %, 78 %, 70 %, 10 %)	vodna raztopina železovega klorida ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
emulzija rumenjaka	vodna raztopina železovega sulfata ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)
MES/TRIS pufer (c = 0,05 mol/l, pH8,3)	TPTZ (4,6-tripiridil-s-triazin)
NaOH (6 mol/l)	metanol (100 %, 70 %, 50 %)
NaOH (5 %)	Reagent Folin-Ciocalteu
HCl (0,56 mol/l)	DPPH* (0,05 mg/l)
HCl (5 %)	galna kislina
nasičena raztopina NaCl	Na_2CO_3 (7,5 %)
petrol eter	30-% raztopina NaOH

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

V 100-ml čašo smo zatehtali 3,4 g KH_2PO_4 in dodali 50 ml destilirane vode. V čašo smo dodali magnet in na magnetnem mešalu mešali, dokler ni raztopina postala bistra. Raztopino smo nato nevtralizirali s 3M NaOH (pH 7,2), prelili v 100-ml bučko ter do oznake dopolnili z destilirano vodo. Dobljeno založno raztopino smo avtoklavirali 20 minut na 120 °C. Za pripravo fiziološke raztopine smo zmešali 1,25 ml založno raztopino z 1 L sterilne destilirane vode.

3.2.3.2 Reagent FRAP

Ta reagent smo pripravili iz 300 mM acetatnega pufra z vrednostjo pH 3,6 (31 g C₂H₃NaO₂x3H₂O in 16 ml C₂H₄OH), 10 mM raztopine TPTZ v 40 mM HCl in 20 mM FeCl₃x6H₂O. Delovna raztopina je bila pripravljena tako, da smo zmešali 10 del acetatnega pufra, 1 del raztopine TPTZ in 1 del FeCl₃x6H₂O. Pred uporabo je bila segreta na 37 °C.

3.2.4 Oprema

Preglednica 6: Oprema

Oprema	Oznaka
analizator a _w	Aqua lab
analizator trdote	TA. XT Analyzer
avtoklav	Sutjeska
avtomatska tehnika	Scalter SPB 31
centrifugirka	Sigma 3K30
hladilnik	6–7 °C
inkubator	37 °C, Kambič
inkubator	27 °C, Sutjeska
kolona za Solid Phase ekstrakcijo	Strata-X RP
kromometer	Minolta
laminarij	Thermo Scientific
LC/MS	Agilent Technology 1100/Micromass Quattro Micro
magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH
mlinček	Bosch
pH meter	Metler Tored, Metrel 5736
precizna avtomatska tehnika	Sartorius
Stomacher in vrečke za gnetilnik s filtrom	Golias Stomacher
stresalna kopel	Tecator 1024 Shaking Water Bath
sušilnik	Sterimatic ST-11
ultrazvočna vodna kopel	Sonis 10, Iskra pib
vakumska črpalka	ABM
vodna kopel	Kambič
žarilna peč	Iskraterm
ekstrakcijska enota	Foss soxectm 2050
ekstrakcijska enota	Foss control unit 2050
spektrofotometerski čitalec mikrotitrskih plošč	

3.2.5 Pripravki

Preglednica 7: Pripravki

mlinček za drobtine	2-ml centrifugirke
fotoaparat	bučke
plinski gorilnik	čaše
steklenice (250- in 1000-ml)	sežigne epruvete
avtomatske pipete in nastavki (eppendorf)	tehtirne ladjice
stresalnik	infuzijska steklenica 5 l
avtomatski rezalnik	silikonska cev
centrifugirke (10- in 50-ml)	silikonsko tesnilo
klasične petrijeve plošče	keramični difuzor rena cer (10 cm)
kvadratne petrijeve plošče	zračni filtri
rokavice	zračna črpalka crawfish 1800
plastične vrečke	magnet
merilni valji	filtrirni lončki
dringalske spatule in eze za enkratno uporabo	presesalne buče
nož	eksikator
stojala	foss kapsule
avtoklavirni trak	ekstrakcijski lončki
0,2 µm filter	erlenmajerice (250-ml, 500-ml)
termometer	termostat
vrtinčno namizno mešalo	žarilni lončki
mikrotitrskie plošče	merilni valji, kapalke

3.2.6 Vzorci

Raziskava je obsegala kemijsko in mikrobiološko analizo brezglutenskega ajdovega kruha z različnimi dodatki rožičeve moke in ajdovih otrobov. Kruh so za potrebe raziskovalnega dela spekli v podjetju Mlinotest, d. d. Iz vsakega zamesa smo dobili štiri hlebčke kruha. Vsak zames je imel enako osnovno recepturo, spremenjal se je dodatek rožičeve moke, ob dodatku otrobov se je za enako težo zmanjšal dodatek ajdove moke. V fazi predposkusa smo kruh (vzorca B in C) fermentirali s kvasovkama *S. cerevisiae* (vzorec C) in *S. boulardii* (vzorec B) (Preglednica 8). V fazi glavnega poskusa smo kruh fermentirali s kvasovko *S. boulardii*, spremenjali smo koncentracijo rožičeve moke in ajdovih otrobov, kot je razvidno iz Preglednice 8.

Preglednica 8: Vzorci kruha s pripadajočimi recepturami

Oznaka vzorca	Ajdova moka (g)	Rožičeva moka (g)	Ajdovi otrobi (g)	Kvas	Gumi iz zrn rožičevca (g)	Sladkor (g)	Sol (g)	Solublin (g)	Voda (ml)	Število zamesov
K	1000	0	0	20	50	100	20	100	1100	7
5R	1000	50	0	20	50	100	20	100	1100	2
10R	1000	100	0	20	50	100	20	100	1100	1
15R	1000	150	0	20	50	100	20	100	1100	1
20R	1000	200	0	20	50	100	20	100	1100	1
30R	1000	300	0	20	50	100	20	100	1100	3
20Ro10	900	200	100	20	50	100	20	100	1100	1
20Ro20	800	200	200	20	50	100	20	100	1100	1
20Ro40	600	200	400	20	50	100	20	100	1100	1
30Ro10	900	300	100	20	50	100	20	100	1100	3
B,C	1000	70	0	20	50	100	20	100	1100	6

3.3 METODE

V diplomski nalogi smo pripravili, vzorčili in analizirali ajdov brezglutenski kruh, začenši s proizvodnjo kvasne biomase (*S. boulardii*, *S. cerevisiae*), uporabili smo različne vsebnosti dodatkov (rožičeva moka, otrobi).

Diplomsko naložno smo začeli s predposkusom, pri katerem smo ugotavljali, ali je kvasovka *S. boulardii* v senzoričnem, tehnološkem in mikrobiološkem aspektu sploh konkurenčna običajni pekovski kvasovki *S. cerevisiae*. Po pozitivnem zaključku predposkusa smo začeli obsežno analizo kruhov, fermentiranih s kvasovko *S. boulardii*. Izpeljali smo tehnološko (trdota, barva), senzorično, mikrobiološko ter kemijsko analizo kruha.

3.3.1 Proizvodnja kvasne biomase (*S. boulardii*)



Slika 2: Bioreaktor za proizvodnjo kvasne biomase

V 5-litrsko infuzijsko steklenico smo prelili 3 litre obogatitvenega gojišča YPD, vanj nacepili izolirano kulturo *S. boulardii* iz dveh petrijevk in v steklenico vstavili magnet (mešanje). Vso uporabljeno opremo in gojišča smo pred izvedbo bioprocesa 20 minut avtoklavirali na 120 °C, difuzor je bil čez noč namočen v 100%-i etanolu, pred uporabo spran s sterilno destilirano vodo ter ožarjen nad plamenom. Na grlo smo pritrdirili zamašek, skozi katerega sta bili speljani dve silikonski cevki (ena za dotok zraka, druga za odvod nastalega CO₂). Na obe zunanjih strani smo pritrdirili zračni filter, na notranji konec za dotok zraka pa keramični difuzor (delo je potekalo aseptično v laminariju). Steklenico smo nato postavili na magnetno mešalo v inkubator (30 °C), cevko za dotok zraka smo priklopili na zračno tlačilko. Inkubirali smo 24 ur. Po inkubaciji smo dobljeno biomaso centrifugirali v 50-ml falkonkah, 3 minute na 6000 g, do dobljene čiste mokre biomase. Gojišče smo iz biomase spirali s sterilno fiziološko raztopino. Da smo zagotovili dobro rast kvasovk, smo kvasovke, namenjene za inkubacijo, vsak teden dva dni pred inkubacijo precepili na sveža trdna gojišča YPD.

3.3.2 Senzorična analiza

Senzorična analiza je bila izvedena po obrazcu za ocenjevanje kruha Gospodarske zbornice Slovenije (Priloga N). Na podlagi senzorične analize smo vzorčenja, kemijske, tehnološke in mikrobiološke analize izbranih dveh vzorcev ponovili v treh paralelkah.

3.3.3 Vzorčenje

Iz vsakega zamesa smo vzorčili tri kruhe, tako smo dobili tri paralelke, s katerimi smo zagotovili preverljivost in ponovljivost.

3.3.4 Določanje mikrobiološke stabilnosti kruha

3.3.4.1 Priprava vzorcev za mikrobiološko analizo

Pri sprejemu smo kruh skupaj z vrečko stehtali. V brezprašni komori smo vrečko aseptično odprli in s sterilnim nožem prerezali na polovici.

3.3.4.2 Vizualno spremeljanje pojava plesni

Od vsakega kruha smo v laminariju aseptično odrezali tri rezine in jih položili v kvadratne petrijevke, jih združili po paralelkah in jih zavili v plastično folijo. Na sobni temperaturi smo nato vizualno in s fotografiranjem spremljali pojav plesni. Rezultate smo odčitali po petih in po sedmih dneh inkubacije.

3.3.4.3 Priprava matične raztopine in ostalih razredčitev

V Stomacherjevo vrečko smo v laminariju aseptično odvzeli 10 g sredice, dodali 90 ml fiziološke raztopine in homogenizirali na Stomacherju 5 minut pri srednji moči. Iz dobljene matične raztopine smo naredili serijske razredčitve do 10^{-4} .

3.3.4.4 Spremljanje mikrobiološke rasti na selektivnih gojiščih DRBC in BCA

V klasične okrogle petrijevke z gojiščema DRBC agar in BCA smo v treh paralelkah nacepili po 100 μl homogenizirane matične raztopine ter vzorec razmazali po celotni površini petrijevk. Ker pri razredčitvah 10^{-2} in 10^{-3} nismo pričakovali velike rasti, smo zaradi racionalizacije postopka po 10 μl razredčitev 10^{-2} in 10^{-3} nacepili v kvadratne petrijevke, ki smo jih vizualno razdelili na dvanajstine. Tako je vsaka paralelka razredčitve dobila eno dvanajstino gojišča v petrijevki. Teh vzorcev nismo razmazali, temveč smo v vsak kvadrat v obliki trikotnika nacepili tri kapljice vzorca. Vzorce, nacepljene na petrijevke z gojiščem DRBC, smo inkubirali na 28 °C, vzorce, nacepljene na petrijevke z gojiščem BCA, pa na 37 °C.

3.3.4.5 Določanje spor aerobnih bakterij

V šestih 250-ml stekleničkah smo pripravili gojišče PCA, ga avtoklavirali 20 minut na 120 °C, ga ohladili na 60 °C in aseptično v laminariju nacepili 10 ml homogenizirane matične raztopine. Gojišče z vzorcem smo nato segrevali 20 minut na 100 °C, ga nato ohladili na 60 °C, vsak vzorec pa potem aseptično razlili v pet petrijevk. Petrijevke smo čez noč pustili v laminariju, da se je gojišče strdilo, nato pa inkubirali na 37 °C.

3.3.5 Instrumentalne analize kruha

3.3.5.1 Določanje barve sredice

Barvo kruha smo določili s kromametrom Minolta CR 200b. Pred merjenjem smo kromameter umerili na bel standard L = 92,8, a = 0,3136, b = 0,3196). Aparat podaja barvo v treh koordinatah (L*, a*, b*). Vrednost L* opisuje svetlost barve, višje vrednosti pomenijo svetlejšo barvo in obratno. Vrednost a* določa intenzitetu rdeče barve v pozitivnem območju, v negativnem pa intenzitetu zelene barve. Vrednost b* predstavlja intenzitetu rumene barve v pozitivnem in modre v negativnem območju. Barvo vsakega zamesa smo merili v treh paralelkah, iz vsake paralelke smo izbrali štiri rezine, barvo na vsaki rezini pa smo izmerili v treh točkah.

3.3.5.2 Določanje trdote sredice

Trdoto sredice smo merili z analizatorjem tekture TA-TX Plus z okroglim nastavkom premera 35 mm. Kruh smo z avtomatskim rezalnikom razrezali na 6 rezin debeline 12,5 mm. Po dve rezini smo nato položili pod aluminijast bat širine 36 mm, ki je potoval s hitrostjo 10 mm/s in sredico rezin stisnil za 40 % (z višine 25 mm na 15 mm). Merili smo silo, potrebno za penetracijo bata skozi sredico. Bolj kot je bila sredica trda, večja sila je bila potrebna za penetracijo. Trdoto smo merili 24 in 28 ur po peki, silo smo podali v newtonih (N).

3.3.5.3 Priprava zračno suhega vzorca (za določanje vsebnosti vlaknin)

Iz vsake paralelke zamesa smo izbrali dve rezini, jih stehtali ter sušili 12 ur na 50–60 °C. Posušene vzorce smo nekaj ur pustili na sobni temperaturi in jih šele nato stehtali. Dobljeni zračno suh vzorec smo zmleli in shranili v zračno neprepustne epruvete za nadaljnje analize.

3.3.6 Kemijske analize kruha

3.3.6.1 Določanje vsebnosti polifenolov

Ekstrakcija

V falkonko smo zatehtali 3 g posušenih krušnih drobtin, dodali 25 ml 75-% etanola in ekstrahirali v ultrazvočni kopeli 20 min na 30 °C. Nato smo vzorec centrifugirali 5 minut na 9000 g ter supernatant prefiltrirali čez Whatsonov papir nr. 1. Ekstrakcijo smo ponovili še dvakrat, vse tri supernatante združili v 100-ml bučko ter dopolnili do oznake. Iz bučke smo odvzeli 50 ml vzorca in ga v hladilniku shranili do solid phase ekstrakcije.

Ekstrakcija na trdnem nosilcu

V falkonko smo odpipetirali 20 ml destilirane vode. Na vakuumski sistem smo pritrdirili kolono Strata-X RP. Kolono smo najprej kondicionirali s 3 ml 100-% metanola, nato izvedli ekvilibracijo s 3 ml 10-% metanola, po tem pa skozi kolono spustili 25 ml vzorca. Ko je vzorca zmanjkalo, smo kolono sprali s 3 ml 10-% metanola, dobljeni ekstrakt smo posušili pod tokom zraka skozi črpalko. Vzorec smo iz kolone eluirali s 3 ml 100-% metanola.

Iz dobljenih vzorcev smo odparili topilo, vzorce prefiltrirali skozi 0,2- μ l filter in jih analizirali na LC/MS.

Račun:

$$C = (C_{lc-ms} \times R - n) / k \quad \dots(1)$$

C ... koncentracija polifenolov (mg/kg)

C_{lc-ms} ... izmerjena koncentracija vzorcev na LC-MS

3.3.6.2 Določanje vsebnosti prehranske vlaknine (modificirana encimsko-gravimetrična metoda po Proskyju)

Priprava vzorca

Zračno suhe vzorce smo zmleli v kavnem mlinčku in jih do analize shranili v falkonkah. Vzorce, ki so vsebovali več kot 4 % mašcobe, smo razmastili v Foss soxtec sistemu.

Razmaščevanje vzorcev

V Foss kapsule smo vstavili kos vate in jo potlačili na dno, nanjo pa smo odtehtali približno 20 g zračno suhega vzorca. Na vrh vzorca smo ravno tako vstavili kos vate in ga rahlo potlačili. Kapsule smo nato namestili v sistem Soxtec za ekstrakcijo. Pod kapsule smo namestili predhodno stehtane in posušene ekstrakcijske lončke, v katerih so bile vrelne kroglice in 80 ml petrol etra. Po ekstrakciji smo ekstrakcijske lončke posušili na 105 °C in jih po ohlajanju v eksikatorju stehtali.

Račun:

$$\text{Vsebnost mašcobe v zračno suhem vzorcu (\%)} = \frac{b - c}{a} \times 100 \quad \dots(2)$$

a ... zatehta vzorca

b ... masa ekstrakcijskega lončka po ekstrakciji

c ... masa ekstrakcijskega lončka pred ekstrakcijo

Priprava filtrnih lončkov

V filtrne lončke smo zatehtali približno 1 g celita in jih čez noč sušili na 105 °C, jih ohladili v eksikatorju in stehtali na 0,1 mg natančno.

Encimska razgradnja

Delali smo v osmih vzporednih določitvah in v vsako falkonko zatehtali 1 g vzorca ($\pm 0,1$ mg) ter dodali 40 ml MES/TRIS pufra. Pripravili smo tudi dva slepa vzorca. Vrednost pH smo uravnali na 8,3 s 5%-raztopino NaOH. Z mikropipeto smo dodali 50 μl termostabilne α -amilaze, dobro premešali, pokrili z alufolijo in inkubirali na vreli vodni kopeli 30 minut od trenutka, ko je raztopina v falkonkah dosegla 90 °C. Z mikropipeto smo dodali 50 μl proteaze, dobro premešali, pokrili z alufolijo in med stalnim stresanjem inkubirali 30 minut pri 60 °C. Čas inkubacije smo začeli meriti, ko je raztopina v erlenmajerici dosegla 60 °C. Ohladili smo na sobno temperaturo, dodali 5 ml HCl (0,56 mol/l) in naravnali vrednost pH na 4,7 ($\pm 0,2$). Dodali smo 150 μl amiloglukozidaze, dobro premešali, pokrili z alufolijo in med stalnim stresanjem inkubirali 30 minut pri 60 °C. Čas inkubacije smo začeli meriti, ko je temperatura raztopine dosegla 60 °C.

Določanje skupne prehranske vlaknine

Skupna prehranska vlaknina je seštevek topne in netopne prehranske vlaknine.

Določanje netopne prehranske vlaknine

Po encimski razgradnji smo vzorce filtrirali skozi filtrne lončke, priklopljene na vakuumsko črpalko. Lončke smo nato sprali z 2×10 ml na 70°C ogrete destilirane vode, 3×15 ml na 78°C segretega 78%-etanola ter 2×10 ml acetona. Lončke smo sušili 5 ur na 105°C , ohladili v eksikatorju in stehtali na 0,1 mg natančno.

Določanje topne prehranske vlaknine

Stehtali smo količino filtrata in dodali štirikratno količino na 60°C segretega 95%-etanola. Raztopino smo eno uro termostatirali v vodni kopeli na 60°C , s tem smo oborili topne vlaknine. Raztopino smo nato filtrirali skozi filtrne lončke, sprali z 2×10 ml destilirane vode, 3×15 ml 78%-etanola ter 2×10 ml acetona. Vzorce smo 5 ur sušili na 105°C , ohladili v eksikatorju in stehtali na 0,1 mg natančno.

Račun:

$$\% \text{ netopne vlaknine} = \frac{b - c - d}{a} \times 100 \quad \dots(3)$$

a ... teža vzorca

b ... teža ostanka netopne vlaknine

c ... teža pepela v netopnem ostanku

d ... teža beljakovin v netopnem ostanku

$$\% \text{ topne vlaknine} = \frac{b - c - d}{a} \times 100 \quad \dots(4)$$

a ... teža vzorca

b ... teža ostanka topne vlaknine

c ... teža pepela v topnem ostanku

d ... teža beljakovin v topnem ostanku.

$$\text{skupna vlaknina} = \text{topna vlaknina} + \text{netopna vlaknina} \quad \dots(5)$$

3.3.6.3 Določanje antioksidativnega potenciala

Priprava vzorcev

Vzorce smo pripravili s Solid phase ekstrakcijo, ki je opisana pri določanju fenolov.

Metoda Folin–Ciocalteu

Pripravili smo 1 : 10 razredčitev reagenta Folin-Ciocalteu in 7,5%-raztopino Na_2CO_3 . Nato smo pripravili razredčitve za umeritveno krivuljo iz založne raztopine galne kisline ($c = 5 \text{ mg/ml}$), v koncentracijah od 25 do 200 mg/l. V 2-ml Eppendorf centrifugirko smo odpipetirali 20 μl vzorcev, dodali 100 μl Folin-Ciocalteu reagenta in 80 μl raztopine Na_2CO_3 (7,5-%) ter premešali na vrtinčniku. Mešanice smo prenesli na prozorno mikrotitrsko ploščico, jo prekrili z alufolijo in vzorce 2 uri inkubirali v temi. Po inkubaciji smo merili absorbanco v mikrotitrskem čitalcu na 760 nm. Rezultate smo izrazili kot miligram ekvivalenta galne kisline na gram vzorca.

Račun:

$$C = (A - A_{50} - n) / k \quad \dots(6)$$

$$C_{GAE} = C \times R \quad \dots(7)$$

C ... koncentracija skupnih fenolov (mg/l)

C_{GAE} ... koncentracija ekvivalenta galni kislini (GAE)

A ... izmerjena absorbanca vzorca

A_{50} ... izmerjena absorbanca topila (50-% metanol)

n ... vrednost iz umeritvene krivulje

k ... vrednost iz umeritvene krivulje

R ... razredčitveni faktor.

DPPH

V 2-ml Eppendorf centrifugirko smo dali 25 μ l vzorca in 25 μ l destilirane vode ter premešali. Pripravili smo tudi umeritveno krivuljo, kjer smo namesto vzorca dodali koncentracije galne kisline od 25–200 mg/l. V temi smo nato dodali 1 ml DPPH* s koncentracijo 0,05 mg/l ter ponovno vorteksirali. Spojino smo nato 30 minut v temi inkubirali na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo 200 μ l vzorcev nanesli na prozorno mikrotitrsko ploščico ter izmerili absorbanco pri 517 nm. Rezultate smo izrazili kot miligramekvivalenta galne kisline na gram vzorca.

Račun:

$$C = (A - A_{50} - n) / k \quad \dots(8)$$

$$C_{GAE} = C \times R \quad \dots(9)$$

C ... koncentracija skupnih fenolov (mg/l)

C_{GAE} ... koncentracija ekvivalenta galni kislini (GAE)

A ... izmerjena absorbanca vzorca

A_{50} ... izmerjena absorbanca topila (50-% metanol)

n ... vrednost iz umeritvene krivulje

k ... vrednost iz umeritvene krivulje

R ... razredčitveni faktor.

4 REZULTATI

Izhajajoč iz postavljenih hipotez smo izpeljali eksperimentalno delo po hodogramu. Opravljenih je bilo 27 zamesov, 3 peke v fazi predposkusa in 7 pek v fazi glavnega poskusa. Eksperimentalno delo je potekalo od 4. 2. 2015 do 2. 4. 2015. Zbrali smo sveže vzorce za senzorične analize, ki jih zahteva pravilnik o kakovosti pekovskih izdelkov, na osnovi teh rezultatov pa izbirali vzorce za nadaljnje analize kemijskih, instrumentalnih in mikrobioloških parametrov.

4.1 REZULTATI PREDPOSKUSA

V predposkusu smo vzorčili in analizirali kruh, fermentiran s kvasovko *S. boulardii* in kruh, fermentiran s kvasovko *S. cerevisiae*, s čimer smo hoteli potrditi uporabnost obeh delovnih organizmov v ajdovem brezglutenskem kruhu in s tem potrditi poskus, ki ga je v svojem diplomskem seminarju z naslovom Uporabnost probiotične kvasovke *Saccharomyces boulardii* v živilstvu pokazala Ana Griz (2015). V omenjenem delu je bil za analizo in primerjavo uporabljen kruh iz pšenične bele moke, dokazano pa je bilo, da je *S. boulardii* kot tehnološki organizem povsem enakovreden *S. cerevisiae*. V našem predposkusu smo v treh paralelnih vzorčenjih testirali ajdov kruh s 7 % dodatka rožičeve moke. Pri vsakem izmed treh vzorčenj smo imeli dva zamesa. Prvega smo fermentirali s *S. cerevisiae* (vzorec C), drugega pa s probiotično kvasovko *S. boulardii* (vzorec B).

Rezultati so pokazali primerljive vrednosti med kruhi, fermentiranimi s *S. boulardii*, in kruhi, fermentiranimi s *S. cerevisiae*. Med obema kruhomoma ni bilo razlik pri mikrobiološki analizi. Prišlo je do primerljive rasti plesni na rezinah kruha, testi rasti na gojišču BCA (bakterije *Bacillus subtilis*) niso pokazali razlik, pri testih na gojišču DRBC (plesni in kvasovke) ni bilo nobene rasti, prav tako ni bilo nobene rasti spor aerobnih bakterij na gojišču PCA.

Pri meritvah z instrumentalnimi metodami prav tako ni prišlo do značilnih razlik med vzorcema B in C. Vrednosti pH so bile neznačilne ($P < 0,05$), saj je bilo povprečje vrednosti pH vzorca B 6,43, vzorca C pa 6,41. Pri vzorcu C je bila povprečna vrednost pri merjenju barve $L^* = 49,03$, $a^* = 6,19$ in $b^* = 13,32$. Vzorec B je imel vrednosti $L^* = 47,56$, $a^* = 6,14$ in $b^* = 13,24$. Vzoreci C so nekoliko temnejši, z močnejšimi odtenki rdeče in rumene kot pri vzorcih B. Merjenje trdote sredice je pokazalo minimalne razlike, saj so imeli vzorci B povprečno vrednost 19,46 N, vzorci C pa povprečno vrednost 19,24 N.

Test vsebnosti vlaknin je pokazal, da ima vzorec B nekoliko večjo vsebnost topne vlaknine (3,02 %) in tudi netopne prehranske vlaknine (11,34 %) kot vzorec C, ki je imel 2,88 % topne vlaknine in 9,31 % netopne prehranske vlaknine. Vzorec B je imel nekoliko nižjo vsebnost beljakovin (7,92 %) kot vzorec C (8,69 %).

Razlika se je pojavila pri samem vzhajanju testa in pri sposobnosti zadržanja oblike štruce po peki, saj je pri vseh vzorcih B prišlo do padca volumna na sredini štruce, medtem ko pri vzorcih C do tega ni prišlo (Slika 3).

Iz vseh rezultatov smo lahko sklepali, da je kvasovka *S. boulardii* enakovreden delovni mikroorganizem kvasovki *S. cerevisiae*.



Slika 3: Primerjava rezin kruha (levo vzorec C, desno vzorec B).

4.2 GLAVNI POSKUS

V glavni poskus smo vključili 14 delovnih vzorcev in 7 kontrolnih vzorcev kruha, 8 z dodatkom rožičeve moke in 6 z dodatkom rožičeve moke in otrobov (Preglednica 8).

V nadaljevanju je predstavljenih 8 kombinacij z rožičevom moko. V osnovno recepturo smo dodali 5–30 % dodatka rožičeve moke glede na maso ajdove moke. Na podlagi vzorčenj vzorcev z dodatkom rožičeve moke smo vzorcu 20R dodali še 10 %, 20 % in 40 % ajdovih otrobov, glede na maso ajdove moke. Glede na rezultate, ki smo jih dobili pri vzorčenju teh vzorcev, smo vzorcu 30R dodali 10 % ajdovih otrobov glede na maso ajdove moke (Preglednica 8).

4.2.1 Vizualna primerjava rezin kruha po peki

Da bi zagotovili čim bolj objektivno primerjavo vzorcev in njihovega videza takoj po peki, smo ohlajene vzorce kruha razrezali, položili na laboratorijski pult, jih označili z merilom in s kamero izvedli fotografski posnetek (Slike 4–9). Vzorce z različnim odstotkom dodane rožičeve moke in otrobov smo vedno primerjali s kontrolnim vzorcem.



Slika 4: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 5R levo, vzorec 10R na sredini in vzorec K na desni).

Vzorec 5R je imel primerljivo poroznost in višino kot kontrolni vzorec (K). Vzorec 10R je imel slabšo poroznost in manjšo višino kot kontrolni vzorec (K). Oba vzorca (5R in 10R) sta bila temnejša od kontrolnega vzorca.



Slika 5: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec K levo, vzorec 15R desno).

Vzorec 15R je bil temnejši, imel je boljšo poroznost, a je bil nižji od kontrolnega vzorca.



Slika 6: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 30R levo, vzorec 20R na sredini, vzorec K desno)

Vzorec 20R je imel poroznost in višino primerljivo s kontrolnim vzorcem, vzorec 30R pa v primerjavi s kontrolnim vzorcem boljšo višino in poroznost. Vzorec 20R je bil temnejši od kontrolnega vzorca, vzorec 30R je bil temnejši od vzorca 20R.



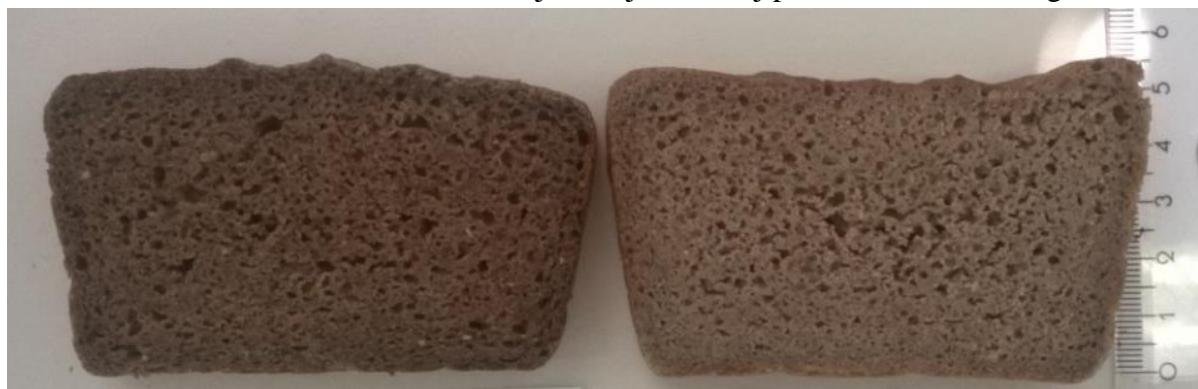
Slika 7: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 20Ro10 levo, vzorec K desno)

Vzorec 20Ro10 je bil temnejši in nižji od kontrolnega vzorca, imel pa je boljšo poroznost.



Slika 8: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 20Ro20 levo, vzorec 20Ro40 v sredini, vzorec K desno)

Vzorca 20Ro20 in 20Ro40 sta bila temnejša, nižja ter manj porozna od kontrolnega vzorca.



Slika 9: Vizualna primerjava rezin kruha (vzorec 30Ro10 levo, vzorec K desno)

Vzorec 30Ro10 je bil temnejši od kontrolnega vzorca. Imel je primerljivo višino in poroznost s kontrolnim vzorcem.

Medsebojna primerjava rezin testiranih kruhov je pokazala, da je koncentracija dodanega rožiča vplivala na barvo, volumen in poroznost izdelka. Eksperimentalno smo dodajali 5–30 % rožičeve moke glede na maso ajdove moke. Podrobna analiza pokaže, da so nižje koncentracije dodane rožičeve moke negativno vplivale na volumen kruha (Slike 4 in 5), medtem ko so višje koncentracije dodane rožičeve moke pokazale pozitiven rezultat na volumen (Slika 5). Dodatek ajdovih otrobov je negativno vplival na volumen kruha (Slike 7, 8 in 9). Med kontrolnim vzorcem in kruhom s 5%- dodatkom rožiča ni bistvene razlike v barvi, višini in poroznosti, medtem ko je kruh z 10%- dodatkom rožiča rahlo nižji, manj porozen in temnejši kot kontrola. Vzorec K je bolje vzhajal, vzorec 15R ima boljšo poroznost. Kruh s 40%- vsebnostjo otrobov je bil zbit, drobljiv, vlažen in nizek. Kruh z 20%- vsebnostjo otrobov je bil v primerjavi s kruhom s 40%- vsebnostjo otrobov nekoliko boljši, vendar še vedno relativno zbit, nizek, ne pa tudi vlažen. Vzorec 30R je bil višji, imel je podobno poroznost, vzorec 20R podobno poroznost, vendar nekoliko nižji, vzorec 20Ro10 pa podobno poroznost in višino, enakomernejše vzhajanje, prav tako vzorec 30Ro10 podobno poroznost in bolj enakomerno vzhajanje.

4.2.2 Senzorično ocenjevanje kruha po obrazcu GZS

Na podlagi analize reoloških lastnosti in interne senzorične ocene smo na uradno senzorično ocenjevanje poslali naslednje izbrane vzorce: ajdov kruh brez dodatka rožičeve moke (K), ajdov kruh z 20 % dodatka rožičeve moke (20R), ajdov kruh z 20 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov (20Ro10), ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke (30R) in ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke ter 10 % dodatka ajdovih otrobov (30Ro10).

Rezultati senzoričnega ocenjevanja po obrazcu GZS so bili naslednji:

- K: 4,68
- 20R: 4,67
- 30R: 4,61
- 20Ro10: 4,49
- 30Ro10: -4,58.

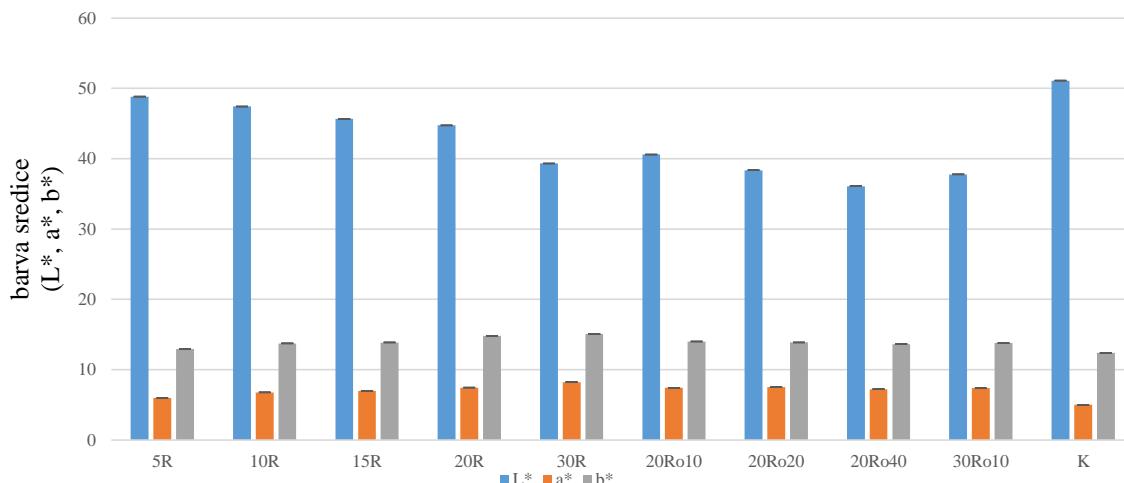
Na podlagi teh senzoričnih ocen izkušenega panela za senzorično ocenjevanje kruha smo se odločili za podrobnejše analize (s tremi vzorčenji) vzorcev 30R, 30Ro10 in kontrolnega vzorca brez dodatkov (K).

4.2.3 Instrumentalne metode

Pri poglavju instrumentalne metode smo analizirali naslednje vzorce: ajdov kruh (K), ajdov kruh s 5 % dodatka rožičeve moke (5R), ajdov kruh z 10 % dodatka rožičeve moke (10R), ajdov kruh s 15 % dodatka rožičeve moke (15R), ajdov kruh z 20 % dodatka rožičeve moke (20R), ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke (30R), ajdov kruh z 20 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov (20Ro10), ajdov kruh z 20 % dodatka rožičeve moke in 20 % dodatka ajdovih otrobov (20Ro20), ajdov kruh z 20 % dodatka rožičeve moke in 40 % dodatka ajdovih otrobov (20Ro40) in ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov (R30o10).

4.2.3.1 Določanje barve

Povprečne vrednosti meritev barve z izračunano standardno deviacijo so v Prilogi E. Svetlost vzorcev določa parameter L^* . Najsvetlejši je bil ajdov kruh brez dodatkov (K) z vrednostjo $L^* = 51,1$. Z dodajanjem rožičeve moke in ajdovih otrobov kruhi temnijo. Tako si sledijo vzorci 5R (48,81), 10R (47,43), 15R (45,66), 20R (44,75), 20Ro10 (40,59), 30R (39,32), 20Ro20 (38,33), 30Ro10 (37,75), najbolj temen je kruh z 20 % dodatka rožičeve moke in 40 % dodatka ajdovih otrobov (20Ro40).



Slika 10: Prikaz povprečij vrednosti L^* , a^* in b^* , izmerjenih na sredici rezin kruhov

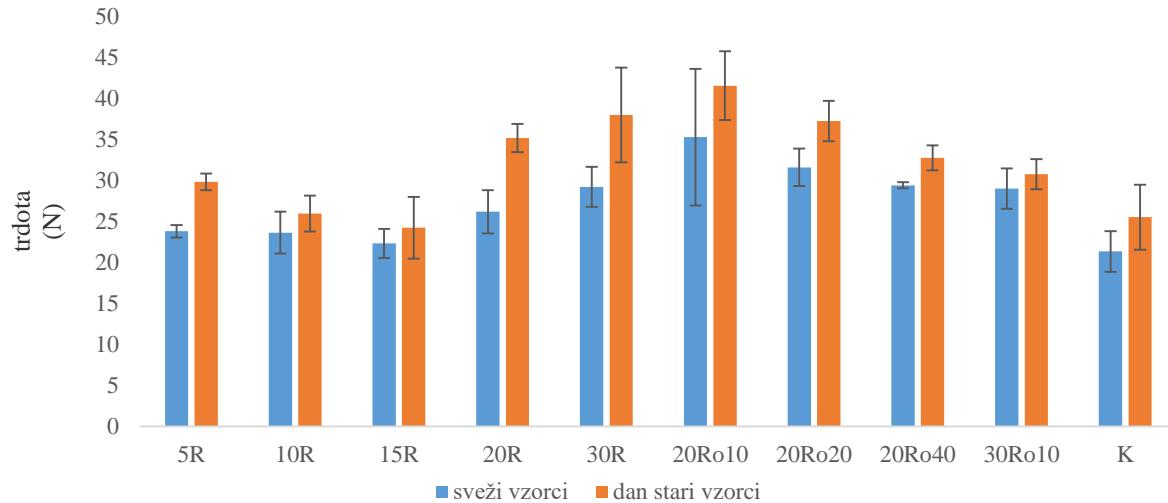
Parameter a^* v pozitivnem določa intenziteto rdeče barve, v negativnem pa zelene. Vsi vzorci so bili pozitivni. Najnižjo intenzivnost so imeli: vzorec K (5,00), vzorec 5R (5,96), 10R (5,96), 15R (6,99). Vzorci 20Ro40, 20R in 20Ro20, 30Ro10, 20Ro10, 20R in 20Ro20 so imeli primerljive rezultate v razponu med 7,22 in 7,52. Najvišjo vrednost je imel vzorec 30R (8,20).

Parameter b^* v pozitivnem določa intenziteto rumene barve, v negativnem pa intenziteto modre barve. Vsi vzorci so bili pozitivni. Najnižjo intenziteto rumene barve ima vzorec K (12,37), vzorec 5R ima vrednost 12,93. Vzorci 20Ro40, 10R, 30Ro10, 15R, 20Ro20 in 20Ro10 so imeli primerljive rezultate v razponu od 13,62 do 13,98, vzorec 20R je imel vrednost 14,79, najvišjo vrednost pa je imel vzorec 30R (15,06).

Dodatek rožičeve moke ima viden vpliv na spremembo barve ajdovega kruha. Vzorci z dodatkom rožiča so temnejši. Če analiziramo parameter a^* , vidimo, da so vzorci intenzivneje rdeči s povečano koncentracijo rožičeve moke, medtem ko so vzorci intenzivneje rumeni s povečano koncentracijo rožičeve moke. Otrobi vplivajo na svetlost kruha, saj so vsi vzorci z dodatkom otrobov temnejši od vzorcev z enakim dodatkom rožičeve moke, vendar brez rožiča. Na parametra a^* in b^* povečana koncentracija ajdovih otrobov nima vpliva.

4.2.3.2 Določanje trdote sredice kruha

Povprečne vrednosti meritev trdote z izračunano standardno deviacijo so v Prilogi F.



Slika 11: Povprečna trdota vzorcev kruha

Trdoto sredice smo merili z analizatorjem tekture TA-TX Plus z okroglim nastavkom premera 35 mm. Povprečne vrednosti pri določanju trdote sredice kruha se gibljejo med 21,31 N in 35,25 N. Najmanjšo trdoto sredice (21,31 N) ima ajdov kruh brez dodatka rožiča in ajdovih otrobov (K). Največjo trdoto sredice (35,25 N) ima kruh z 20-% deležem rožičeve moke in 10-% deležem otrobov (20Ro10). Dodatek rožičeve moke je povečal trdoto sredice. Primerljivo vrednost trdote imajo kruhi 5R, 10R, 15R s povprečjem 22,40 N. Primerljivi vrednosti imata tudi oba ajdova kruha s 30 % dodatka rožičeve moke, z 10 % dodatka ajdovih otrobov in brez dodatka otrobov(30R in 30Ro10), s povprečjem 29,08 N. Vzorec 20R je imel povprečno trdoto 26,15N. Ajdovi otrobi prav tako vplivajo na povečanje trdote, s tem da je vzorec obraten. Z izjemo vzorca 30Ro10 imajo vsi vzorci z dodanimi otrobi izmerjene večje vrednosti kot vzorci brez dodanih otrobov, vendar je zanimivo, da so pri primeru 20-% dodatka rožičeve moke rezultati obratno sorazmerni, saj ima vzorec z najmanjšim dodatkom otrobov (10 %) največjo povprečno trdoto (41,51 N), vzorec z 20 % dodatka otrobov ima povprečno trdoto 31,56 N, vzorec z največjim dodatkom otrobov (40 %) pa najmanjšo povprečno trdoto (29,37 N).

Za potrebe ugotavljanja hitrosti staranja smo iz povprečij meritev trdote svežega kruha in povprečij meritev trdote dan starega kruha izračunali odstotek, za katerega se v enem dnevu poveča trdota kruha. Najmanj se je trdota povečala pri vzorcu 30Ro10 (6,11 %), primerljive vrednosti so dale meritve vzorcev 15R,10R in 20Ro40 (8,62 %, 9,87 % in 11,44 %) ter vzorcev 20Ro10 in 20Ro20 (17,76 % in 17,93 %). Pri kontrolnem vzorcu je bilo povečanje 19,62-%, presenetljivo veliko pa je bilo povečanje pri vzorcih 5R (25,42 %), 30R (30,04 %) in 20R (34,38 %).

Preglednica 9: Povečanje trdote (%) med svežimi in dan starimi vzorci kruha

vzorci	m	n	Povečanje trdote sredice (%)
5R	2	6	25,41
10R	1	3	9,90
15R	1	3	8,62
20R	1	3	34,35
30R	3	9	30,04
20Ro10	1	3	17,78
20Ro20	1	3	17,89
20Ro40	1	3	11,42
30Ro10	3	9	6,11
K	7	21	19,59

m ... število vzorčenj, n ... število vzorcev

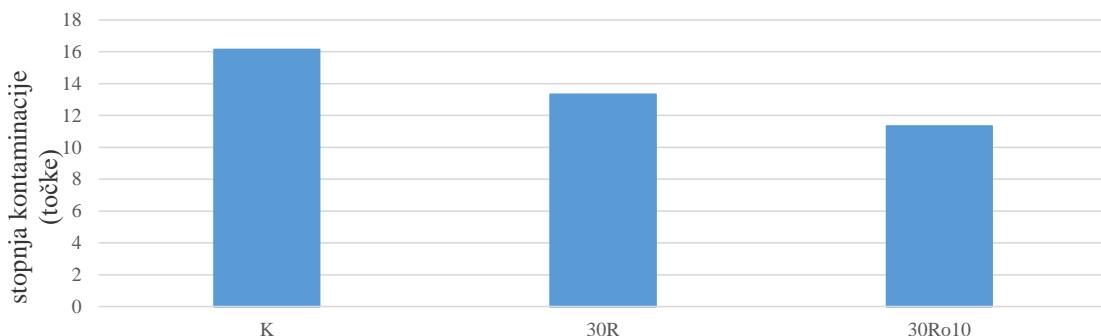
4.2.4 Mikrobiološka stabilnost kruha

Zaradi velike možnosti napak in navzkrižne kontaminacije pri jemanju vzorcev v aseptičnih pogojih in pri sami inkubaciji možnih prisotnih mikroorganizmov v vzorcih bomo predstavili rezultate vzorcev, ki smo jih analizirali v več paralelkah. To so ajdov kruh brez dodane rožičeve moke in ajdovih otrobov (K), ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke (30R) in ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov (30Ro10). Zaradi lažje interpretacije smo uvedli točkovni sistem, ki glede na stopnjo kontaminacije vsakemu vzorcu podeli število točk. Na tak način smo lahko zanesljiveje ugotovili vplive rožičeve moke na mikrobiološko stabilnost brezglutenskega ajdovega kruha.

Preglednica 10: Točkovni sistem za opredelitev stopnje mikrobiološke kontaminacije vzorcev

Točkovni sistem	
1	1 kolonija
2	2 do 5 posameznih kolonij
3	6 posameznih kolonij ali več

4.2.4.1 Vizualno spremljanje pojava plesni



Slika 12: Vizualno spremljanje pojava plesni, predstavljeno po točkovnem sistemu, ki predstavlja stopnjo kontaminacije.

Rezultati vizualnega spremeljanja pojava plesni so v Prilogi A. Rezultate smo odčitali 5 dni po začetku inkubacije. Za lažjo interpretacijo rezultatov smo uvedli točkovni sistem, pri katerem smo vsako okuženo rezino pomnožili s številko, in sicer glede na število kolonij,zraslih na skorji in sredici rezine. Opazovanja so pokazala, da rožičeva moka in rožičevi otrobi pozitivno vplivajo na inhibicijo rasti plesni na rezinah kruha. Najvišjo vrednost kontaminacije so dosegli vzorci K (16,14 točke), vzorci 30R so dosegli 13,33 točke, najmanjša pa je bila stopnja kontaminacije pri vzorcih 30Ro10 (11,33).

4.2.4.2 Spremljanje mikrobiološke rasti bakterije *Bacillus subtilis* na selektivnem mikrobiološkem gojišču BCA (*Bacillus cereus* agar)

Bacillus subtilis je pogost kontaminent pekovskih izdelkov in povzroča mikrobiološki kvar, nitkavost kruha. Pri raziskavi smo hoteli ugotoviti, v kakšni meri lahko rožičeva moka s svojimi učinkovinami in ajdovi otrobi inhibitorno učinkujejo na rast omenjene bakterije.

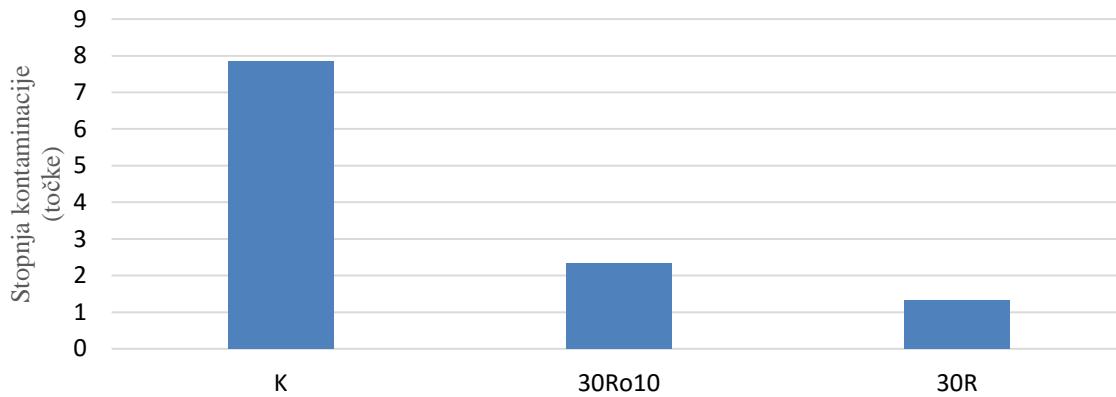
Za določanje kontaminacije vzorcev z bakterijo *Bacillus subtilis* smo vzorce nacepili na gojišče BCA in spremljali rast ter prešteli vse zrasle kolonije, ki so imele vizualne lastnosti rasti omenjene bakterije. Za lažjo interpretacijo rezultatov smo prešteli plošče, na katerih se je pojavila rast, jih pomnožili s številom točk glede na kontaminiranost po že omenjenem točkovnem sistemu in dobljene rezultate delili s številom vzorčenj pri vsaki recepturi. Dobili smo rezultate, zbrane v Preglednici 11.

Preglednica 11: Ocena stopnje kontaminacije kruhov z bakterijo *Bacillus subtilis*.

Vzorec	m	Št. plošč	Št. pozitivnih plošč	Stopnja kontaminacije po točkovnem sistemu
30R	3	27	3	1,33
30Ro10	3	27	5	2,33
K	7	63	36	7,86

m ... število vzorčenj

Rezultati so pokazali, da rožičeva moka močno inhibira rast bakterije *Bacillus subtilis*. Tako je bila povprečna vrednost, izračunana po točkovnem sistemu, za vzorce ajdovega kruha s 30 % dodatka rožičeve moke (30R) 1,33 točke. Vzorci ajdovega kruha s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov (30Ro10) so bili malo bolj kontaminirani (2,33 točke), torej dodatek otrobov ni imel inhibitornega učinka na rast bakterije *Bacillus subtilis*. Vzorci ajdovega kruha brez dodatkov (K) so imeli najvišje vrednosti (7,86 točke), torej smo s poskusom uspešno dokazali inhibitorni učinek rožičeve moke na rast že omenjene bakterije.



Slika 13: Ocena stopnje kontaminacije kruhov z bakterijo *Bacillus subtilis*.

4.2.4.3 Spremljanje mikrobiološke rasti kvasovk in plesni na selektivnem gojišču DRBC

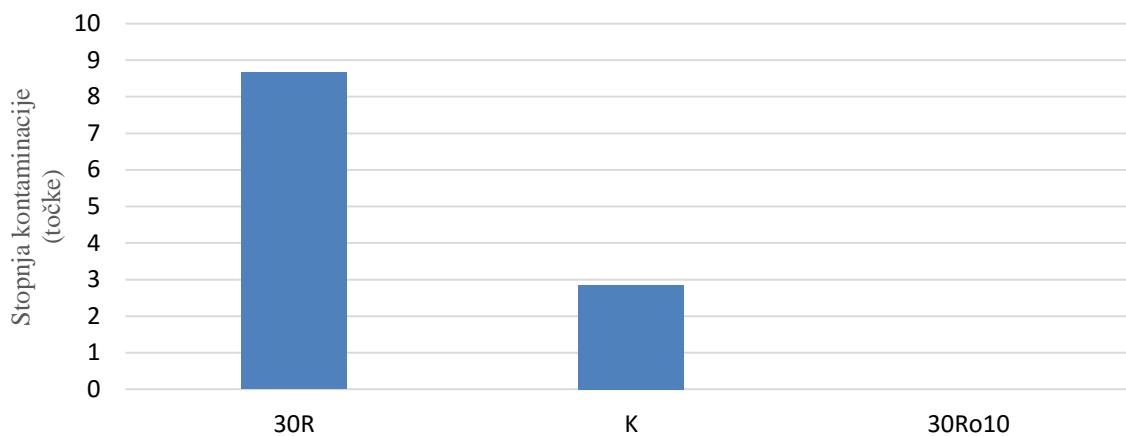
Vzorce smo testirali na prisotnost kvasovk in plesni z inkubacijo na selektivnem gojišču za kvasovke in plesni, DRBC. Hoteli smo ugotoviti, ali imata rožičeva moka in ajdovi otrobi inhibitorni učinek na rast kvasovk in plesni. Za interpretacijo rezultatov smo uporabili enak točkovni sistem kot pri določanju prisotnosti *Bacillus subtilis* v vzorcih. Dobili smo rezultate, zbrane v Preglednici 12.

Preglednica 12: Ocena stopnje kontaminacije kruhov s kvasovkami in plesnimi.

Vzorec	m	Št. plošč	Št. pozitivnih plošč	Stopnja kontaminacije po točkovnem sistemu
30R	3	27	16	8,67
30Ro10	3	27	0	0,00
K	7	63	9	2,86

m ... število vzorčenj

Pri ugotavljanju inhibicije rasti kvasovk in plesni smo dobili drugačne rezultate, kot smo jih dobili pri ugotavljanju inhibicije rasti *Bacillus subtilis*. Vzorci ajdovega kruha s 30 % dodatka rožičeve moke (30R) so imeli najvišjo stopnjo kontaminiranosti (8,67 točke).



Slika 14: Ocena stopnje kontaminacije kruha s kvasovkami in plesnimi.

Vzorci ajdovega kruha brez dodatkov (K) so imeli značilno nižjo stopnjo kontaminacije (2,86). Rožičeva moka ni inhibirala rasti, temveč jo je celo spodbudila. Presenetljivo so imeli inhibitoren učinek ajdovi otrobi, saj pri vzorcih ajdovega kruha s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % ajdovih otrobov (30Ro10) ni bilo rasti na niti eni plošči. Do tega odstopanja od vizualnega spremljanja pojava plesni na rezinah je prišlo, ker je bila vsa prisotna kontaminacija testiranih vzorcev kontaminacija s kvasovkami, ne plesnimi.

4.2.4.4 Določanje prisotnosti spor aerobnih bakterij

Stopnjo kontaminiranosti s termostabilnimi sporami smo ugotavljali z inkubacijo vzorcev na gojišču PCA (*plate count agar*). Rezultate smo interpretirali na enak način kot pri določanju rasti kvasovk in plesni ter določanju rasti *Bacillus subtilis* na selektivnem gojišču.

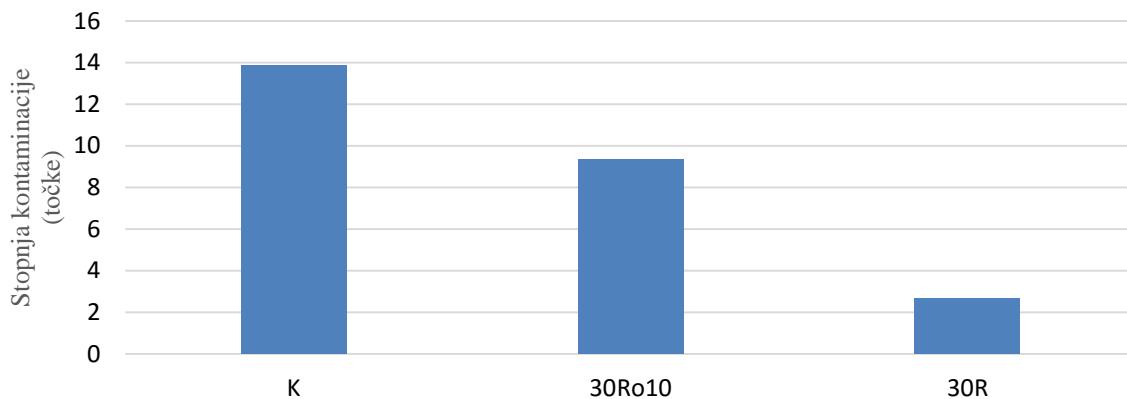
Dobili smo rezultate, zbrane v Preglednici 13.

Preglednica 13: Ocena stopnje kontaminacije kruha s sporami aerobnih bakterij.

Vzorec	m	Št. plošč	Št. pozitivnih plošč	Stopnja kontaminacije po točkovnem sistemu
K	7	105	70	13,86
30Ro10	3	45	25	9,33
30R	3	45	7	2,67

m ... število vzorčenj

V primeru kontaminacije vzorcev kruha s sporami so se najslabše izkazali vzorci ajdovega kruha brez dodatkov (K), ki so po našem točkovnem sistemu dosegli 13,86 točke. Vzorci ajdovega kruha s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov (30Ro10) so imeli nižjo stopnjo kontaminacije, in sicer 9,33 točke. Najnižjo stopnjo kontaminacije so imeli vzorci ajdovega kruha s 30 % dodatka rožičeve moke (30R). Tudi pri ugotavljanju kontaminacije s sporami je rožičeva moka delovala kot močen inhibitor, medtem ko so ajdovi otrobi dodatno kontaminirali vzorce.



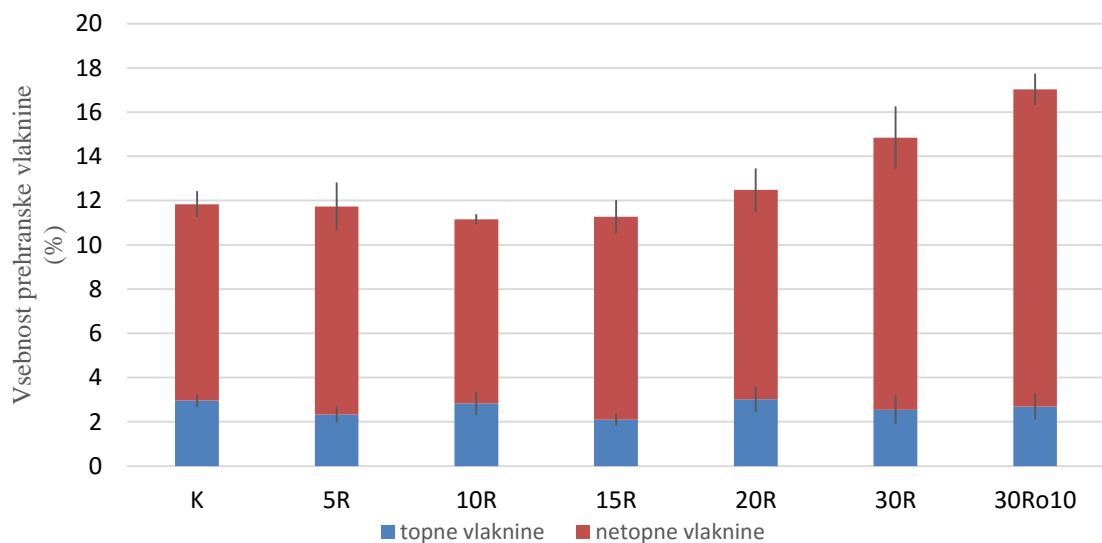
Slika 15: Ocena stopnje kontaminacije kruha s sporami aerobnih bakterij.

4.2.5 Kemijska analiza

Kemijsko smo analizirali naslednje vzorce: ajdov kruh (K), ajdov kruh s 5 % dodatka rožičeve moke (5R), ajdov kruh z 10 % dodatka rožičeve moke (10R), ajdov kruh s 15 % dodatka rožičeve moke (15R), ajdov kruh z 20 % dodatka rožičeve moke (20R), ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke (30R), ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov (R30o10). Vzorcem smo določili vsebnost prehranske vlaknine, vsebnost beljakovin, vsebnost pepela, vsebnost vode, vsebnost fenolnih kislin in antioksidativni potencial.

4.2.5.1 Določanje vsebnosti prehranske vlaknine

Povprečne vrednosti meritev vsebnosti prehranske vlaknine z izračunano standardno deviacijo so v Prilogi G.



Slika 16: Vsebnost topne, netopne in skupne prehranske vlaknine v vzorcih kruha.

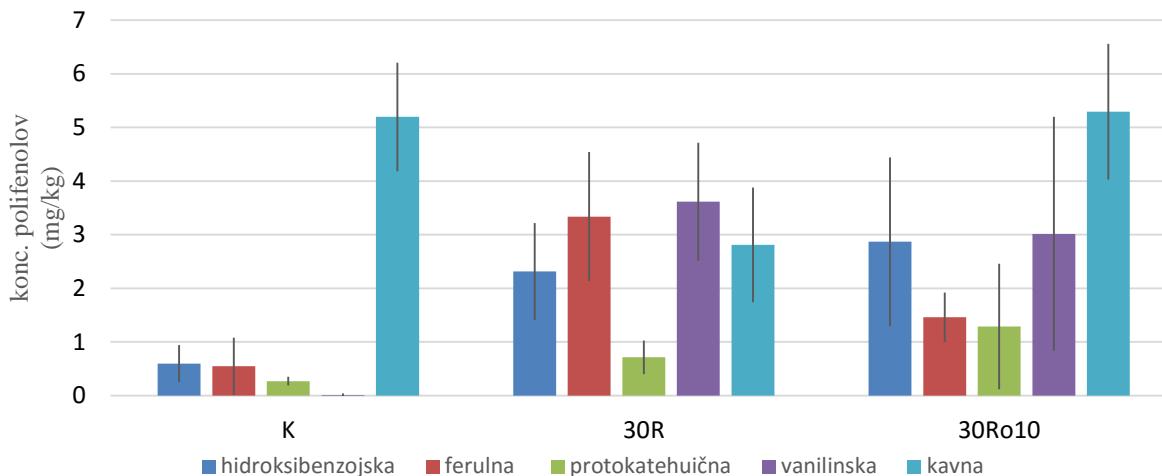
Vsebnost prehranske vlaknine smo določali po modifcirani encimsko gravimetrični metodi po Proskyju. Vsebnost topnih vlaknin je bila primerljiva pri vseh vzorcih in je variirala od 2,10 % (15R) do 3,02 % (20R). Dodatek ajdovih otrobov in rožičeve moke ni bistveno vplival na vsebnost topnih vlaknin, saj je imel kontrolni vzorec (K) primerljivo vsebnost topnih prehranskih vlaknin z vzorcem 20R in 10R, ki vsebujejo rožičovo moko.

Vsebnost netopnih vlaknin je v nasprotju z vsebnostjo topnih vlaknin odvisna od vsebnosti rožičeve moke in ajdovih otrobov, saj imajo z izjemo vzorca 10R vsi vzorci, ki vsebujejo rožičovo moko ali ajdove otrobe, višje vrednosti vsebnosti netopne prehranske vlaknine. Pri vzorcih z nižjo vsebnostjo rožičeve moke in kontrolnem vzorcu (5R, 10R, 15R, 20R, K) smo dobili povprečne vrednosti, ki so se gibale med 8,32 % (10R) in 9,45 % (20R). Vzorec s 30-% deležem rožičeve moke je vseboval 12,30 %, vzorec s 30-% deležem rožičeve moke in 10-% deležem otrobov pa 14,34 % netopne prehranske vlaknine.

Vrednosti skupne prehranske vlaknine so podobno kot pri vrednostih netopne prehranske vlaknine primerljive med vzorci 5R, 10R, 15R in 20R in se gibljejo od 10,97 % (15R) in 12,48 % (20R). Vzorec s 30-% deležem rožičeve moke je vseboval 14,77 % skupne prehranske vlaknine, vzorec s 30-% deležem rožičeve moke in 10-% deležem otrobov pa 17,16 % skupne prehranske vlaknine.

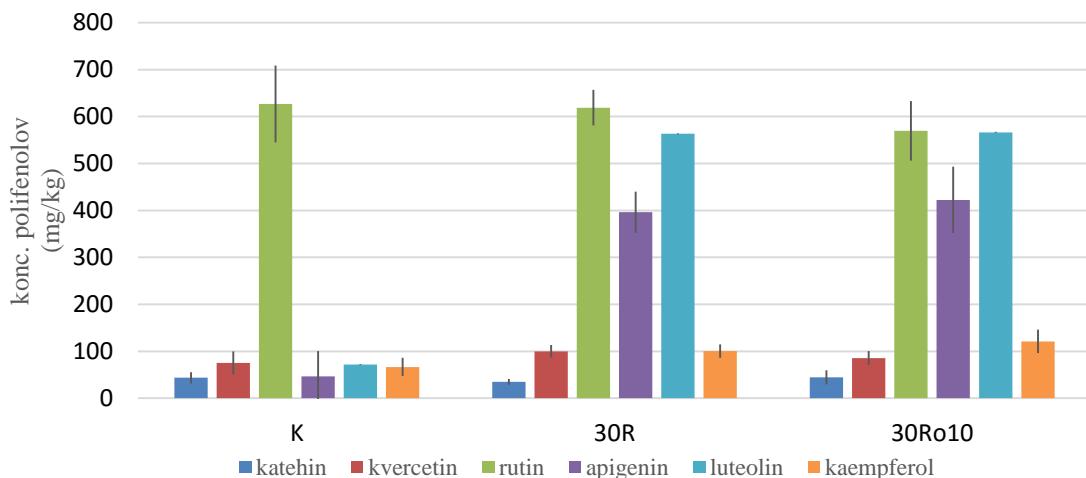
4.2.5.2 Določanje vsebnosti polifenolov

Zaradi boljše preglednosti in lažje prezentacije rezultatov bomo (zaradi obsega podatkov) predstavili samo rezultate skrajnih vzorcev, ker je tako najbolje vidna razlika v vsebnosti posameznih fenolnih kislin ob dodatku rožičeve moke in ajdovih otrobov (Slika 17).

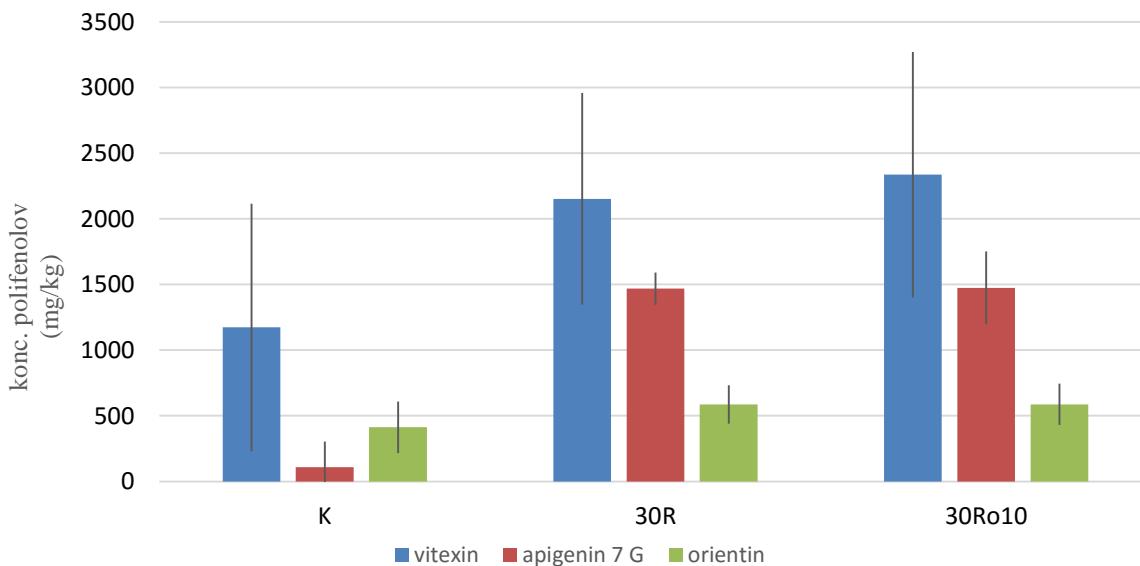


Slika 17: Vsebnost hidroksibenzojske, ferulne, protokatehuične, vanilinske in kavne kisline v vzorcih kruha.

To so ajdov kruh brez dodatkov (K), ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke (30R) in ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka ajdovih otrobov. Povprečne vrednosti meritev vsebnosti polifenolnih spojin z izračunano standardno deviacijo so v Prilogi I.



Slika 18: Vsebnost katehina, kvarcetina, rutina, apigenina, luteolina in kaempferola v vzorcih kruha.



Slika 19: Vsebnost viteksina, apigenina 7G in orientina v vzorcih kruha.

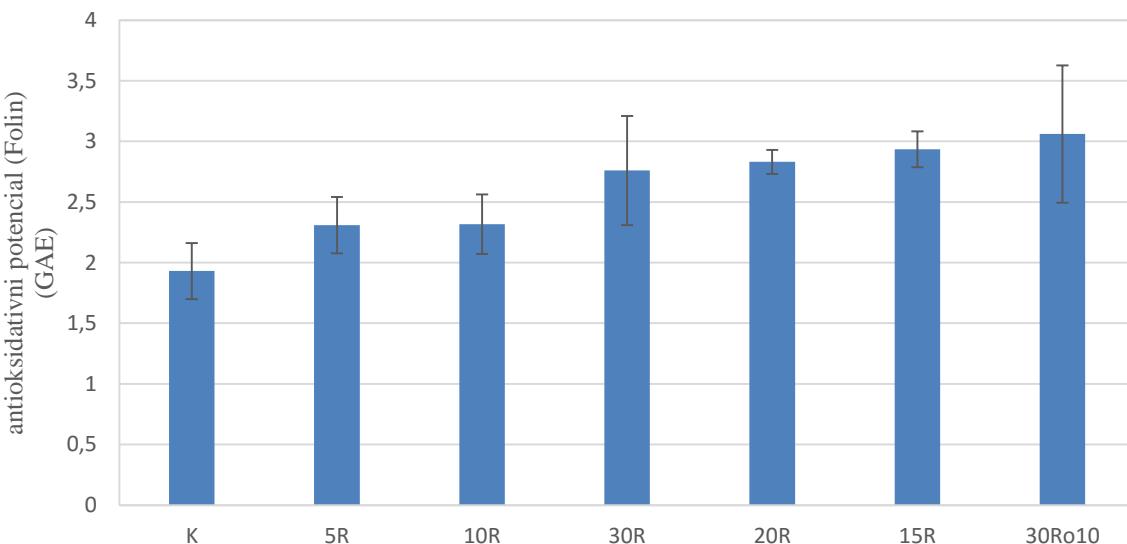
Koncentracije posameznih polifenolov smo izračunali iz vnaprej pripravljenih umeritvenih krivulj za vsako polifenolno spojino posebej (Priloga H). Vsebnosti posameznih polifenolov so se razlikovale glede na njihovo prisotnost in koncentracijo v posamezni surovini (ajdova moka, ajdovi otrobi, rožičeva moka). Določali smo koncentracije hidroksibenzojske kisline, ferulne kisline, protokatehuične kisline, vanilinske kisline, kavne kisline, katehina, kvercetina, rutina, apigenina, luteolina, kaempferola, vitexina, apigenina 7G in orientina. Vzorec K je vseboval 0,55 mg/kg ferulne kisline, 0,60 mg/kg hidroksibenzojske kisline, 0,27 mg/kg protokatehuične kisline, 0,01 mg/kg vanilinske kisline, 5,20 mg/kg kavne kisline, 43,47 mg/kg katehina, 75,05 mg/kg kvercetina, 627,14 mg/kg rutina, 46,44 mg/kg apigenina, 71,61 mg/kg luteolina, 66,46 mg/kg kaempferola, 1173,00 mg/kg viteksina, 108,31 mg/kg apigenina 7G in 412,55 mg/kg orientina. Vzorec 30R je vseboval 3,34 mg/kg ferulne kisline, 2,31 mg/kg hidroksibenzojske kisline, 0,71 mg/kg protokatehuične kisline, 3,61 mg/kg vanilinske kisline, 2,81 mg/kg kavne kisline, 35,04 mg/kg katehina, 99,91 mg/kg kvarcetina,

618,97 mg/kg rutina, 396,11 mg/kg apigenina, 563,20 mg/kg luteolina, 100,52 mg/kg kaempferola, 2152,39 mg/kg viteksina, 1468,18 mg/kg apigenina 7G in 586,16 mg/kg orientina. Vzorec 30Ro10 je vseboval 1,46 mg/kg ferulne kisline, 2,87 mg/kg hidroksibenzojske kisline, 1,29 mg/kg protokatehuične kisline, 3,02 mg/kg vanilinske kisline, 5,29 mg/kg kavne kisline, 44,44 mg/kg katehina, 85,68 mg/kg kvarcetina, 569,74 mg/kg rutina, 422,60 mg/kg apigenina, 566,25 mg/kg luteolina, 121,16 mg/kg kaempferola, 2336,55 mg/kg viteksina, 1474,12 mg/kg apigenina 7G in 587,20 mg/kg orientina.

Vzorec K je vseboval več rutina kot vzorca 30R in 30Ro10. Koncentracija kavne kisline in katehina je bila primerljiva med vzorcema 30Ro10 in K, manjša je bila pri vzorcu 30R. Vse ostale analizirane polifenolne spojine so bili prisotni v višjih koncentracijah pri vzorcih 30R in 30Ro10.

4.2.5.3 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo Folin-Ciocalteu

Povprečne vrednosti meritev antioksidativnega potenciala po Folinu-Ciocalteuju z izračunano standardno deviacijo so v Prilogi K.

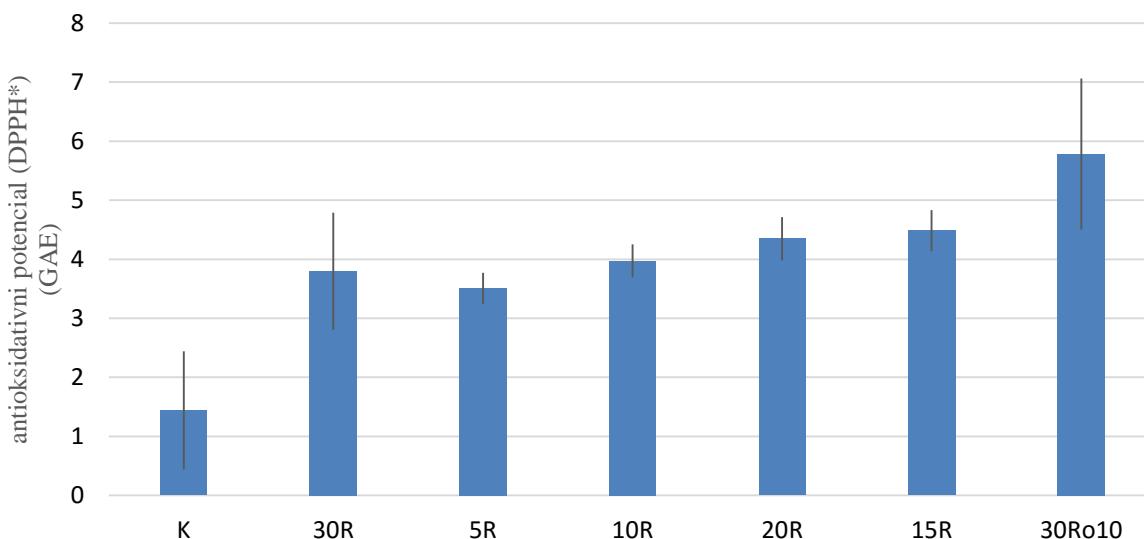


Slika 20: Antioksidativni potencial vzorcev kruha po metodi Folin-Ciocalteu.

Antioksidativni potencial smo določali z metodo Folin-Ciocalteu, in sicer s pomočjo umeritvene krivulje (Priloga J), ki smo jo pripravili z znanimi koncentracijami galne kisline. Enota za določanje antioksidativnega potenciala je miligram galne kisline na gram vzorca (GAE). Najmanjši potencial je imel vzorec K (1,93 GAE), vzorec 5R je imel izračunano vrednost 2,30 GAE, vzorec 10R 2,32 GAE, vzorec 30R 2,75 GAE, vzorec 20R 2,83 GAE, vzorec 15R 2,94 GAE. Največji antioksidativni potencial je dosegel vzorec 30Ro10 (3,06 GAE).

4.2.5.4 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo DPPH

Povprečne vrednosti meritev antioksidativnega potenciala po DPPH metodi z izračunano standardno deviacijo so v Prilogi M.



Slika 21: Antioksidativni potencial vzorcev kruha po metodi DPPH*

Antioksidativni potencial z metodo DPPH smo določali s pomočjo umeritvene krivulje (Priloga L), ki smo jo pripravili z znanimi koncentracijami galne kisline. Enota za določanje antioksidativnega potenciala je torej miligram galne kisline na gram vzorca (GAE). Najmanjši potencial je imel vzorec K (1,44 GAE), vzorec 30R je imel izračunano vrednost 3,63 GAE, vzorec 5R 3,70 GAE, vzorec 10R 3,86 GAE, vzorec 20R 4,35 GAE, vzorec 15R 4,63 GAE. Največji antioksidativni potencial je dosegel vzorec 30Ro10 (5,78 GAE).

5 RAZPRAVA

Izhajajoč iz postavljenih delovnih hipotez – da bo dodatek rožičeve moke izboljšal mikrobiološko obstojnost kruha (hipoteza 1), povečal vsebnosti prehranske vlaknine in polifenolnih spojin (hipoteza 2) ter zaradi vsebovanih hidrokoloidov izboljšal senzorične lastnosti ajdovega kruha (hipoteza 3) – smo v prejšnjem poglavju predstavili rezultate mikrobiološke analize, senzorične analize ter rezultate analize kemijske sestave kruhov z različnim deležem rožičeve moke in ajdovih otrobov. V nadaljevanju bomo razpravljali o rezultatih in njihovi skladnosti s predstavljenimi hipotezami.

5.1 VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA MIKROBIOLOŠKO OBSTOJNOST AJDOVEGA KRUHA

V prvi hipotezi smo predpostavili, da bo dodatek rožičeve moke zaradi vsebnosti polifenolnih spojin izboljšal mikrobiološko obstojnost kruha. Pri raziskovalnem delu smo skladnost prve hipoteze preverjali z različnimi mikrobiološkimi laboratorijskimi metodami. Spremljali smo pojav in rast plesni na aseptično odrezanih in na sobni temperaturi inkubiranih rezinah svežega kruha, prisotnost in rast kvasovk ter plesni na gojišču DRBC, prisotnost in rast bakterije *Bacillus subtilis* na mikrobiološkem gojišču BCA ter ugotavljali prisotnost spor aerobnih bakterij na mikrobiološkem gojišču PCA.

5.1.1 Vizualno spremjanje pojava plesni na rezinah kruha

Z vizualnim spremjanjem pojava plesni nismo potrdili hipoteze, saj smo ugotovili, da razlik med posameznimi kruhi v pojavu plesni praktično ni. Na vseh kruhih se je v povprečju plesen začela pojavljati 3 do 4 dni po peki izdelka. Prišli pa smo do zanimivih zaključkov pri spremjanju intenzivnosti same kontaminacije. Zaradi boljše statistične kredibilnosti smo predstavili rezultate samo pri vzorcih, ki smo jih vzorčili v treh ali več neodvisnih paralelkah, to so bili vzorci K, 30R in 30Ro10. S pomočjo točkovnega sistema, ki smo ga za ta poskus naredili, smo ocenili, da rožičeva moka vpliva na intenzivnost in razširjenost rasti na rezinah kruha. Povprečja rezultatov so se gibala med 11,33 točke (vzorec 30Ro10) in 16,14 točke (vzorec K). Najmočnejša je bila rast na vzorcu K, najnižja pa na vzorcu 30Ro10. Rezultati niso direktno potrdili naše hipoteze, saj dodatek rožičeve moke ni podaljšal mikrobiološke obstojnosti kruha, saj so se prve kolonije plesni pojavile na rezinah vseh vzorcev ob istem času, so nam pa pokazali, da po pojavu kolonij plesni dodatek rožičeve moke zavira rast plesni.

5.1.2 Spremljanje rasti bakterije *Bacillus subtilis*

Zanimala nas je stopnja preživelosti bakterije *Bacillus subtilis*, ki je izredno pogost kontaminent pekovskih izdelkov in povzroča mikrobiološki kvar z imenom nitkavost. Določanje inhibicije rasti bakterije *Bacillus subtilis* je potrdilo našo hipotezo, saj je prisotnost rožičeve moke močno inhibirala rast omenjene bakterije. Najvišjo stopnjo kontaminacije smo opazili pri vzorcih K, najnižjo pa pri vzorcih 30R. Vzorec 30Ro10 je imel rahlo povečano

stopnjo kontaminacije. Predvidevamo, da je do tega prišlo zaradi dodatka ajdovih otrobov, ki so zaradi svoje izpostavljenosti mikrobiološkim okužbam dodatno kontaminirali kruh z bakterijo *Bacillus subtilis*.

5.1.3 Spremljanje mikrobiološke rasti kvasovk

Hipoteze z določanjem rasti kvasovk in plesni nismo mogli v celoti potrditi. Inkubacija homogenizirnih vzorcev kruha je sicer potrdila analizo vizualnega spre mljanja rasti na rezinah kruha, saj na gojišču v nobeni petrijevki ni prišlo do rasti plesni, iz česar lahko sklepamo, da sredica vzorcev ni bila kontaminirana s plesnimi, temveč je prišlo do kontaminacije skorje na rezinah kruha med ravnanjem s kruhom po peki. Je pa prišlo na mikrobiološkem gojišču do rasti kvasovk, najvišjo stopnjo kontaminiranosti s kvasovkami pa je dosegel vzorec s 30-% dodatkom rožičeve moke (30R). Sklepamo lahko le, da dodatek rožiča ne zavira rasti kvasovk.

5.1.4 Določanje prisotnosti spor aerobnih bakterij

Pri določanju prisotnosti spor aerobnih bakterij smo dobili zelo podobne rezultate kot pri določanju prisotnosti bakterije *Bacillus subtilis*. Rezultati so potrdili našo hipotezo, saj je dodatek rožičeve moke tudi na rast spor deloval kot močan inhibitor. Razlika med prisotno rastjo je bila izjemna, saj je ajdov kruh brez dodatkov po našem točkovnem sistemu dosegel stopnjo kontaminacije 13,86 točke, ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke pa samo 2,67 točke. Ajdov kruh s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % dodatka otrobov je dosegel 9,33 točke. Predvidevamo, da je pri tem vzorcu do tako visoke stopnje kontaminiranosti prišlo zaradi prisotnosti spor v ajdovih otrobih.

5.2 VPLIV DODATKA ROŽIČEVE MOKE NA VSEBNOSTI PREHRANSKE VLAKNINE IN POLIFENOLNIH SPOJIN

V drugi hipotezi smo predpostavili, da bo dodatek rožičeve moke povečal vsebnosti prehranske vlaknine in polifenolnih spojin, s tem pa se bo povečal tudi antioksidativni potencial kruha. Pri raziskovalnem delu smo skladnost druge hipoteze preverjali z različnimi kemijskimi metodami. Vsebnost prehranske vlaknine smo določali z encimsko gravimetrično metodo po Proskyju. Koncentracije posameznih polifenolov smo določali z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (Solid phase) in nadaljnjo analizo na LC-MS, antioksidativni potencial in s tem tudi skupno koncentracijo polifenolov pa z metodama Folin-Ciocalteu in DPPH.

5.2.1 Določanje vsebnosti prehranske vlaknine

Z encimsko gravimetrično metodo po Proskyju smo določali vsebnost topne in netopne prehranske vlaknine. Analiza je potrdila našo hipotezo, saj je dodatek rožičeve moke povečal vsebnost skupne prehranske vlaknine. Kontrolni vzorec je vseboval 12,33 % skupne prehranske vlaknine, vzorec s 30 % dodatka rožičeve moke pa 14,77 % skupne prehranske vlaknine. Dodatno je vsebnost skupne prehranske vlaknine povečal dodatek ajdovih otrobov,

saj je vzorec s 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % ajdovih otrobov vseboval 17,16 % skupne prehranske vlaknine.

Dodatek rožičeve moke ni bistveno vplival na vsebnost topne prehranske vlaknine. Nekateri rezultati so sicer kazali na morebitno zmanjšanje vsebnosti prehranske vlaknine ob dodatku rožičeve moke, vendar so rezultati preveč neznačilni, da bi to lahko z gotovostjo trdili. Vzorca 20R in 10R sta na primer imela primerljive rezultate z rezultati vzorca K, medtem ko staimela vzorca 5R in 15R bistveno nižje oziroma celo najnižje vrednosti topne prehranske vlaknine (5,10 % in 5,33 %).

Pri določanju netopne prehranske vlaknine je dodatek rožičeve moke značilno vplival na vsebnost. Razen pri vzorcu 10R je vsebnost netopne prehranske vlaknine konstantno naraščala s količino dodane rožičeve moke. Vzorec 30R je tako imel za skoraj 4 % večjo vsebnost prehranske vlaknine kot vzorec K.

5.2.2 Določanje vsebnosti polifenolnih spojin

Vrednosti, ki smo jih dobili pri določanju vsebnosti posameznih polifenolnih spojin, so prav tako potrdile našo hipotezo. Vsebnost posameznih polifenolov smo s predhodno ekstrakcijo določali z metodo LC/MS. Pri nekaterih rezultatih je zaradi zapletenosti ekstrakcije prišlo do napak, ki so vodile v velike standardne deviacije, vendar smo kljub temu lahko videli vpliv dodatka rožičeve moke na vsebnost polifenolov v vzorcu. Ker ajdova moka vsebuje velike količine rutina, je predvideno največjo koncentracijo rutina vseboval vzorec brez dodatka rožičeve moke, saj je ta zmanjšala prvotno koncentracijo. Rožičeva moka je prav tako znižala koncentracijo kavne kisline in katehina. Koncentracija vseh preostalih fenolnih kislin (hidroksibenzojske kisline, ferulne kisline, protokatehuične kisline, vanilinske kisline, kvercetina, apigenina, luteolina, kaempferola, vitexina, apigenina 7G in orientina) je bila znatno višja v vzorcih, ki so vsebovali rožičovo moko in ajdove otrobe.

5.2.3 Določanje antioksidativnega potenciala z metodo Folin-Ciocalteu in DPPH

Rezultati določanja antioksidativnega potenciala neposredno kažejo na vsebnost skupnih polifenolnih spojin v vzorcih kruha. Analiza je potrdila hipotezo, rezultati sovpadajo s tistimi, ki smo jih dobili pri določanju posameznih polifenolov. Pri primerjanju rezultatov med obema metodama sicer prihaja do odstopanj, vendar rezultati obeh metod neizpodbitno kažejo, da dodatek rožičeve moke pozitivno vpliva na povečanje antioksidativnega potenciala, saj je imel pri obeh metodah najnižji antioksidativni potencial vzorec brez dodatka rožičeve moke, najvišjega pa vzorec s 30 % dodatkom rožičeve moke.

5.3 Vpliv dodatka rožičeve moke na senzorične lastnosti ajdovega kruha

V tretji hipotezi smo predpostavljeni, da bo dodatek rožičeve moke zaradi velike vsebnosti hidrokoloidov pozitivno vplival na senzorične parametre, ki jih uporabljamo za ocenjevanje kruha. Predvideli smo, da bodo lastnosti rožičeve moke, ki ne vsebuje samo hidrokoloidov (ki

lahko pozitivno vplivajo na senzorične lastnosti), temveč tudi enostavne sladkorje, ki so hkrati hrana za kvasovke (kar bi se lahko odražalo v boljšem volumnu kruha), nefermentiran del sladkorjev pa skupaj z drugimi kemijskimi sestavinami rožičeve moke vplivajo na okus, aromo in druge senzorične lastnosti, ki jih določamo pri senzorični analizi (določali smo jo po standardnem obrazcu GZS). Predvidevali smo, da bo dodatek rožiča vplival tudi na barvo, ki smo jo merili s kromometrom, trdoto, ki smo jo merili z analizatorjem tekture ter na vrednost pH.

5.3.1 Senzorično ocenjevanje kruha po obrazcu GZS

Ajdov kruh brez dodatka rožičeve moke je imel zelo primerljive vrednosti z vzorcema z 20 % in 30 % dodatka. Dodatek rožičeve moke ocene ni poslabšal, ni pa je tudi izboljšal. Senzorično ocenjevanje pa nam je pokazalo, da dodatek otrobov negativno vpliva na senzorične lastnosti kruha, saj sta imela oba ocenjevana vzorca, ki sta vsebovala dodatek ajdovih otrobov, nižjo senzorično oceno kot vsi kruhi brez dodatka otrobov.

5.3.2 Vizualna primerjava rezin kruha po peki

Glavna težava priprave brezglutenskega kruha je prav odsotnost glutena, ki povezuje beljakovine v kruhu v tridimenzionalno mrežo, v katero se ob fermentaciji ujamejo plini, rezultat pa se vidi kot vzhajanje testa. Rožičeva moka vsebuje hidrokoloide, ki funkcionalno lahko nadomestijo vlogo glutena, zato nas je zanimalo, ali večji deleži dodatka rožičeve moke izboljšajo zračnost kruha in njegovo višino.

Vizualna primerjava rezin kruha je potrdila našo hipotezo. Čeprav dodatek rožičeve moke ni bistveno vplival na višino prereza kruha, je pozitivno vplival na poroznost in obliko prereza. Z izjemo kruhov z 20- in 40-% dodatkom ajdovih otrobov, so imeli vsi kruhi boljšo poroznost, kar je najverjetneje posledica vsebnosti enostavnih sladkorjev v rožičevi moki, zaradi česar so imeli tudi boljšo fermentacijo kvasovk. Vzorci z 10 %, 15 % in 20 % dodatka rožičeve moke so v primerjavi s kontrolnim vzorcem ajdovega kruha brez dodatkov malenkost slabše vzhajali, najslabše pa se je pri procesu vzhajanja in peke odrezal večji dodatek ajdovih otrobov, saj sta bila kruha z 20 % dodatka rožičeve moke in 20 % ter 40 % ajdovih otrobov zbita, drobljiva in zelo nizka. Ajdov kruh brez dodatkov, ki smo ga uporabljali kot kontrolni vzorec, je sicer dobro vzhajal, vendar je pri peki prišlo do rahlega padca višine na sredini rezine. Pri kruhih s 30 % dodatka rožiča, 20 % dodatka rožičeve moke in 10 % ajdovih otrobov ter 30 % dodatka rožičeve moke in 10 % ajdovih otrobov do padca višine sredine hlebčka pri peki ni prišlo, zato so bili vsi trije vzorci vizualno ustreznejši kot kontrolni vzorec.

5.3.3 Določanje barve sredice

Barva kruha je pomemben vizualni aspekt in ima veliko vlogo pri potrošnikovi izbiri izdelka. Prav tako je barva osnovna fizikalna lastnost hrane, tudi kruha, saj obstajajo zelo dobre korelacije s preostalimi fizikalnimi in senzoričnimi lastnostmi, ki so indikatorji kakovosti

produkta (Angioloni in Collar, 2009). Rezultati so pokazali lepe in jasne spremembe v barvi kruha z dodajanjem rožičeve moke in otrobov. Kruhi z dodatkom rožičeve moke in ajdovih otrobov so bili vedno bolj temni, vedno več je bilo prisotnih rdečih in rumenih odtenkov. Z meritvami nismo ne potrdili ne ovrgli hipoteze, smo pa ugotovili, da dodatek rožičeve moke vpliva na barvo sredice.

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov diplomskega dela lahko podamo naslednje sklepe.

- Dodatek rožičeve moke je v skladu z našo hipotezo pozitivno vplival na mikrobiološko stabilnost kruha. Rast plesni na rezinah je bila upočasnjena. Dodatek rožičeve moke je inhibiral tudi rast sporogenih bakterij. Dodatek rožičeve moke ni inhibiral rasti kvasovk.
- V skladu s hipotezo je dodatek rožičeve moke izboljšal prehransko vrednost ajdovega brezglutenskega kruha. Vzorci z dodatkom rožičeve moke so vsebovali več prehranske vlaknine in več polifenolnih spojin. Skladno s tem smo potrdili povečan antioksidativni potencial teh vzorcev kruha.
- Večji dodatki rožičeve moke (30 %) k zamesu ajdovega brezglutenskega kruha so izboljšali višino in poroznost kruha. Negativno je dodatek rožičeve moke vplival na trdoto sredice, saj jo je povečal. Rezultati so tako delno potrdili našo hipotezo. Za izboljšavo konsistence sredice bi morali v prvotni zames uvajati še druge dodatke.

7 POVZETEK

V zadnjih letih je zaradi povečanja števila obolelih za celiakijo prišlo do povečanega povpraševanja po brezglutenskih izdelkih, zlasti kruhu. Zaradi dobrih prehranskih lastnosti je zanimiva postala uporaba psevdo žit, med katera sodi tudi ajda, ki ima izredno dobre prehranske lastnosti. V diplomskem delu smo se odločili razviti in ovrednotiti brezglutenski kruh iz ajdove moke, ki smo ga fermentirali s probiotično kvasovko *Saccharomyces boulardii*. Kruhu smo dodali rožičovo moko, ki vsebuje veliko hidrokoloida *locust bean gum*, ki pozitivno vpliva na vzhajanje in reološke lastnosti kruha po peki. Zanimalo nas je, kolikšni odstotki dodane rožičeve moke pozitivno vplivajo na mikrobiološko stabilnost kruha, na vizualne, senzorične in reološke lastnosti ajdovega kruha. Senzorično ocenjevanje ni pokazalo bistvenih razlik med ocenami kruha z različnimi dodatki rožičeve moke, vendar smo ugotovili, da ob prisotnosti ajdovih otrobov rožičeva moka močno izboljša senzorično oceno. Po vizualnem primerjanju kruhov smo ugotovili, da v majhnih dodanih količinah rožičeva moka na volumen in poroznost kruha ne vpliva bistveno. Kruhi z višjimi dodatki rožičeve moke (20- in 30-%) pa so imeli boljšo poroznost, primerljiv volumen in močnejšo strukturo. Analiza trdote je potrdila boljšo notranjo strukturo kruhov, saj so imeli kruhi z dodatkom rožičeve moke večjo trdoto. Dodatek rožiča je prav tako močno vplival na barvo, saj so bili kruhi z dodatkom rožičeve moke temnejši, po instrumentalnih meritvah s kromametrom so imeli večji odtenek rdeče in rumene barve. V prvem delu mikrobiološke analize smo opazovali rast plesni na rezinah kruha, ki smo jih inkubirali na sobni temperaturi. Rezultati so pokazali, da rožičeva moka inhibitorno deluje na rast plesni, saj je bila stopnja kontaminacije vzorcev z dodatkom rožičeve moke precej manjša kot pri vzorcih brez dodane rožičeve moke. V naslednji stopnji smo preverjali inhibitorni učinek rožičeve moke na rast bakterije *Bacillus subtilis* ter rast kvasovk in plesni. Rezultati so pokazali, da rožičeva moka inhibitorno deluje na rast bakterije *Bacillus subtilis*, saj je bila kontaminacija plošč s homogeniziranim vzorcem z dodatkom rožičeve moke značilno manjša kot pri vzorcih brez dodane rožičeve moke, nima pa inhibitornega učinka na rast kvasovk, temveč jo celo spodbuja, saj je bila kontaminacija s kvasovkami pri vzorcih z dodatkom rožičeve moke znatno višja kot pri vzorcih brez dodane rožičeve moke. V zaključni fazi mikrobiološke analize smo analizirali vpliv rožičeve moke na inhibicijo rasti spor aerobnih bakterij. Rezultati so pokazali, da ima rožičeva moka inhibitoren učinek na rast spor, saj je bila kontaminacija vzorcev z dodano rožičovo moko znatno manjša kot pri vzorcih brez dodatka rožičeve moke. Pri kemijski analizi smo ugotovili, da dodatek rožičeve moke poveča količino skupne prehranske vlaknine. Vsebnost rožičeve moke ni imela značilnega vpliva na količino topne prehranske vlaknine, je pa močno vplivala na vsebnost netopne prehranske vlaknine, saj so imeli vzorci z dodatkom rožičeve moke višjo vsebnost netopne prehranske vlaknine. Med analizo smo ugotovili, da dodatek rožičeve moke močno dvigne vsebnost posameznih polifenolov (z izjemo rutina, katehina in kavne kisline). Prav tako vsebnost rožičeve moke močno poveča antioksidativni potencial in s tem tudi skupno vsebnost polifenolov. V diplomskem delu smo ugotovili, da dodatek rožičeve moke značilno vpliva na izboljšanje senzoričnih lastnosti ajdovega kruha. Izboljšuje prehranske lastnosti, povečuje vsebnost prehranske vlaknine in polifenolov ter izboljšuje mikrobiološko stabilnost ajdovega brezglutenskega kruha.

8 VIRI

- Ablett S., Attenburrow G. E., Lillford P. J. 1986. Significance of water in the baking process. V: Chemistry and physics of baking: Materials, processes and products. Blanshard J. M. V., Frazier P. J., Galliard T (eds.). London, Royal Society of Chemistry: 30–41
- Alvarez-Jubete L., Arendt E. K., Gallagher E. 2010. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as a functional gluten-free ingredients. Trends in Food Science and Technology, 21, 2: 106–113
- Alvarez-Jubete L., Holse M., Hansen A., Arendt E. K., Gallaghe, E. 2009. Impact of baking on the vitamin E content of the pseudocereals amaranth, quinoa and buckwheat. Cereal Chemistry, 86, 5: 511–515
- Anderson D. B., McKracken V. J., Aminov R. I., Simpson J. M., Mackie R. I., Versteegen M. W. A., Gaskins H. R. 1999. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. Pig News and Information, 20: 115–122
- AOAC Official Method 991.43. Total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. 1995. V: Official methods of analysis of AOAC international. 15th ed. Cunniff P. (ed.). Gaithersburg, AOAC International, Chapter 32: 7–9
- Atchison J., Head L., Gates A. 2010. Wheat as food, wheat as industrial substance: comparative geographies of transformation and mobility. Geoforum, 41: 236–246
- Avallone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani A. 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. Journal of Food Composition and Analysis, 10, 2: 166–172
- Ayaz F. A., Torun H., Ayaz S., Correia P. J., Alaiz, M., Sanz C., Gruz J., Strnad M. 2007. Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. Journal of Food Quality, 30, 6: 1040–1055
- Baker A. E., Ponte J. G. 1987. Measurment of bread firmness with the universal testing machine. Cereal Foods World, 32: 491–493
- Batič M., Raspor P. 1994. Kvasna biomasa kot aditiv. V: Aditivi: Dodatki –tehnologija - zdravje. 16. Bitenčevi živilski dnevi, Bled, 9. in 10. junij 1994. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23–25
- BeMiller J. N. 2008. Hydrocolloids. V: Gluten-free cereal products and beverages, Arendt E. K., Dal Bello F. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 203–215
- Berghofer E., Schoenlechner R. 2002. Grain amaranth. V: Pseudocereals and less common cereals: Grain properties and utilization potential, Belton P. S., Taylor J. R. N. (eds.). Berlin, Springer Verlag: 219–260
- Bergogne-Bérézin E. 1995. Ecologic impact of antibioticotherapy: Role of substitution microorganisms in the control of antibiotic-related diarrhea and colitis. Presse Medicale, 24: 145–148
- Berti C., Riso P., Brusamolino A., Porrini M. 2004. *In vitro* starch digestibility and *in vivo* glucose response of gluten-free foods and their gluten counterparts. European Journal of Nutrition, 43: 198–204
- Biesiekirski J. R., Peters S. L., Newnham E. D., Rosella O., Muir J. G., Gibson P. R. 2013. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity following

- dietary reduction of low-fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology*, 145: 320–328
- Bingham S. A., Day N. E., Luben R., Ferrari P., Slimani N., Norat T., Clavel-Chapelon F., Kesse E., Nieters A., Boeing H., Tjønneland A., Overvad K., Martinez C., Dorronsoro M., Gonzalez C. A., Key T. J., Trichopoulou A., Naska A., Vineis P., Tumino R., Krogh V., Bueno-de-Mesquita H. B., Peeters P. H., Berglund G., Hallmans G., Lund E., Skeie G., Kaaks R., Riboli E., EPIC. 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), an observational study. *Lancet*, 361: 1496–1501
- Böhm O., Komerički J. 2004. Tehnologija predelave žit. Del 2: študijsko gradivo: 2. letnik. 5. dop. izd. Živilska šola. Maribor, Višja strokovna šola: 59.
- Bonafaccia G., Kreft I. 1994. Technological and qualitative characteristics of food products made with buckwheat. *Fagopyrum*, 14: 35–42
- Bonafaccia G., Marocchini M., Kreft I. 2003. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 80: 9–15
- Brecelj J. 2002. Pomen brezglutenske diete pri celiakiji. V: *Celiakija*. Glasilo Slovenskega društva za celiakijo. Mičetić-Turk D., Ornik T. (ur.). Maribor, Slovensko društvo za celiakijo: 9–10
- Bressani R. 1994. Composition and nutritional properties of amaranth. V: *Amaranth-biology, chemistry and technology*, Paredes-Lopez O. (ed.), London, CRC Press Inc.: 185–205
- Bruni R., Medici A., Guerrini A., Scalia S., Poli F., Muzzoli M., Sacchetti G. 2001. Wild *Amaranthus caudatus* seed oil, a nutraceutical resource from Ecuadorian flora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5455–5460
- Buts J. P., De Keyser N. 2006. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, 51, 8: 1485–1492
- Calixto F. S., Canellas J. 1982. Components of nutritional interest in carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33: 1319–1323
- Catassi C., Bai J. C., Bonaz B., Bouma G., Calabro A., Carroccio A., Castillejo G., Carolina C., Cristofori F., Dolinšek J., Francavilla R., Elli L., Green P., Holtmeier W., Koehler P., Koletzko S., Meinhold C., Sanders D., Schumann M., Schuppan D., Ullrich R., Vécsei A., Volta U., Zevallos V., Sapone A., Fasano A. 2013. Non-celiac gluten sensitivity: New frontier of gluten related disorders. *Nutrients*, 10: 3839–3853
- Cauvain S. P. 2003. Bread making: an overview. V: *Bread making: improving quality*. Cauvain S. P. (ed.). Cambridge, CRC Press, Woodhead Publishing in Food Science and Technology: 8–28
- Cauvain S. P., Young L. S. 2000. *Bakery food manufacture & quality: water control & effects*. 2. izdaja. Oxford, Blackwell Science: 285
- Cegnar F. 1991. Svežost kruha – Metoda ocenjevanja kakovosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 1–10 (interni gradivo)
- Chang M. H. 2006. Baking. V: *Bakery products: science and technology*. Hui Y. H. (ed.). Ames, Blackwell Publishing: 273–283
- Constantini L., Lukšič L., Molinaria R., Kreft I., Bonafaccia G., Manzia L., Merendino N. 2014. Development of gluten-free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredients. *Food Chemistry*, 165: 232–240

- Cooper B., Holmes G., Ferguson R., Thompson R., Allan R., Cooke W. 1981. Gluten-sensitive diarrhea without evidence of celiac disease. *Gastroenterology*, 81, 1: 192–194
- Craig W. J., Nguyen T. T. 1984. Caffeine and theobromine levels in cocoa nad carob products. *Journal of Food Science*, 49: 302–305
- Daussant J., Mosse J., Voughan J. 1983. Seed proteins. London, Academic Press: 101–133
- Davies A. P. 1986. Protein functionality in bakery products. V: Chemistry and physics of baking: Materials, processes and products. Blanshard J. M. V., Frazier P. J., Galliard T (eds.). London, RCS Press: 89–104
- Dickinson J. R., Schweizer M. 2004. The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. . Dickinson R. J., Schweizer M. (eds.). London, Taylor and Francis: 1–14
- Dreese P. C., Faubion J. M., Hoseney R. C. 1988. The effects of different heating and washing procedures on the dynamics rheological properties of wheat gluten. *Cereal Foods World*, 33: 225–228
- Drzewiecki J., Delgado-Licon E., Haruenkit R., Pawelzik E., Martin-Belloso O., Park Y.-S., Jung S. T., Trakhtenberg S., Gorinstein S. 2003. Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 26: 7798–7804
- Durazzo A., Turfani V., Narducci V., Azzini E., Maiani G., Carcea M. 2014. Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chemistry*, 153: 109–113
- Edwardson S. 1996. Buckwheat: pseudocereal and nutraceutical. V: Progress in new crops, Janick J. (ed.), Alexandria, ASHS Press, VA: 195-207
- Eguchi K., Anase T., Osuga H. 2009. Development of a high-performance liquid chromatography method to determine the fagopyrin content of tartary buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) and common buckwheat (*F. esculentum* Moench). *Plant Production Science*, 12: 475–480
- Eliasson A. C. 1983. Differential Scanning Calorimetry studies on wheat starch-gluten mixtures. Effect of gluten on the gelatinization of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 1: 99–205
- FAO/WHO 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May 2002. Rome, FAO: 55 str.
- Fletcher R. J. 2016. Pseudocereals, Overview.V: Encyclopedia of food grains. Vol. 1. . Wrigley C. W., Corke H., Seetharaman K., Faubion J. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 274—279
- Fraizer W. C., Westhoff D. C. 1978. Food microbiology. 3rd ed., New York, McGraw-Hill: 540 str.
- Francavilla R., Cristofori F., Castellaneta S., Polloni C., Albano V., Dellatte S., Indrio F., Cavallo L., Catassi C. 2013. Clinical, serologic, and histologic features of gluten sensitivity in children. *Journal of Pediatrics*, 164, 3: 463–467
- Graveland A. 1988. Struktur und Funktionelle Eigenschaften von Glutenin. *Getreide Mehl und Brot*, 42, 2: 35–38

- Gray J. A., Bemiller J. N. 2003. Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 1–21
- Griz A. 2015. Uporabnost probiotične kvasovke *Saccharomyces boulardii* v živilstvu. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 22 str.
- Guh D. P., Zhang W., Bansback N., Amarsi Z., Birmingham C. L., Anis A. H. 2009. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 9: 88, doi: 10.1186/1471-2458-9-88: 20 str.
- Gujral H. S., Rosell C. M. 2004. Modification of pasting properties of wheat starch by cyclodextrin glycosyltransferase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1685–1690
- Houben A., Höchstötter A., Becker T. 2012. Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production. An overview. *European Food Research Technology*, 235: 195–208
- Hribar J., Gobec T. 1999. Hidrokoloidi v tehnologiji rastlinskih živil. V: *Reologija živil*. 19. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 10. in 11. junij 1999. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 167–177
- Ikeda K. 2002. Buckwheat: Composition, chemistry and processing. *Advances in Food and Nutrition Research*, 44: 395–434
- Javornik B., Eggum B. O., Kreft I. 1981. Studies on protein fractions and protein quality of buckwheat proteins. *Genetika*, 13, 2: 115–121
- Jensen L. T., Posewitz M. C., Srinivasan C., Winge D. R. 1998. Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 37: 23805–23811
- Jud B., Brümmer J. M. 1990. Herstellung von glutenfreien Brotten unter verwendung von speziellen galaktomannanen. *Getreide Mehl und Brot*, 44, 6: 178–183
- Jurga R. 1993. Characteristics of milled products. V: *Encyclopedia of food science technology and nutrition*. Vol. 5. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3113–3115
- Kang Y. H., Park Y. K., Lee, G. D. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 28, 2: 232–239
- Katalenič M., Balenovič J. 1999. Deklariranje količine proteinov. *Mlinarstvo in pekarstvo*, 3, 7: 4–5
- Khan K. 1982. Polycrylamide gel electrophoresis of wheat gluten proteins. *Bakers Digest*. : 44–56
- Kreft I. 1989. Ideotype breeding of buckwheat. V: *Proceedings of the 4th International symposium on buckwheat*, Orel, USSR, 11-15 July 1989; International Buckwheat Research Association (IBRA). Fesenko N. V. (ed). Tula, VASHNIL: 3–6
- Kreft I. 1995. Ajda. Ljubljana, Kmečki glas: 61–66
- Kreft I., Skrabanja V. 2002. Nutritional properties of starch in buckwheat noodles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 48: 47–50
- Kreft S., Knapp M., Kreft I. 1999. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 11: 4649–4652

- Legan J. D., Voysey P. A. 1981. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 361–37
- Leivers C., Martin G., Gasparetto M., Shelley H., Valante M. 2014. Coeliac disease. Symposium: gastroenterologa. *Pediatrics and Child Health*, 24, 11: 481–484
- Lesage G., Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 317–343
- Li S., Zhang Q. H. 2001. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41: 451–464
- Lionetto F., Maffezzoli A., Ottenhof M. A., Farhat I. A., Mitchell J. R. 2006. Ultrasonic investigation of wheat starch retrogradation. *Journal of Food Engineering*, 75, 2: 258–266
- Liu W., Chen W. J., Suo Z. R., Yao Y. P. 2008. Protective effects of ethanolic extracts of buckwheat groats on DNA damage caused by hydroxyl radicals. *Food Research International*, 41: 924–929
- Malgoire J. Y., Bertout S., Renaud F., Bastide J. M., Mallič M. 2005. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 3: 1133–1137
- Marakis S. 1996. Carob beans in food: Current status and future potentials-a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 33: 365–383
- Mariotti M., Lucisano M., Pagani M., W. 2009. The role of corn starch, amaranth flour, pea isolate, and psyllium flour on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. *Food Research International*, 42, 8: 963–975
- Mastrototaro L., Castellaneta S., Gentile A., Fontana C., Tandoi E., Dellatte S., Romagnoli V., Catassi C., Francavilla R. 2012. Gluten sensitivity in children: clinical, serological, genetic and histological description of the first paediatric series. *Digestive and Liver Disease*, 44: 254–255.
- Mazza G. 1993. Buckwheat. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 1. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (eds). Amsterdam, Academic Press: 516–521.
- McFarland L., Bernasconi P. 1993. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6: 157–171
- Miles M. J., Morris W. J., Ring S. G. 1985. Gelation of amylose. *Carbohydrate Research*, 135: 257–269
- Mir S. A., Shah M. A., Naik H. R. 2016. Influence of hydrocolloids on dough handling and technological properties of gluten free breads. *Trends in Food Science & Technology*, 51: 49–57
- Morton J. F. 1987. Fruits of warm climates, Miami, Florida Flair Books: 65–69
- Mukhtar H., Wang Z. Y., Katiyar S. K., Agarwal R. 1992. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Preventive Medicine*, 21, 3: 352–360
- Orel R. 2000. Nekatere novosti na področju imunologije celiakije. *Slovenska pediatrija*, 7, 1: 75–78
- Plestenjak A. 2008. Tehnologija pekarstva. Zapiski s predavanj. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo (interno gradivo)

- Pokorn D. 2001. Oris zdrave prehrane: priporočena prehrana. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 68 str.
- Ponte J. G., Tsen C. C. 1978. Bakery products. V: Food and beverage mycology. Beuchat L. R. (ed.). Westport, AVI Publishing Co.: 191–223
- Pothoulakis C. 2009. Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 30: 826–833
- Pravilnik o kakovosti pekovskih izdelkov. 2003. Uradni List Republike Slovenije, 26, 13: 3270–3273
- Przybylski R., Woodwaer L., Eskin N. A. M., Malcolmson L. J., Mazza G. 1995. Effect of buckwheat storage and milling on flavor compounds. V: Current advances in buckwheat research: The VI international symposium on buckwheat in Shinshu. Matano T., Ujihara A., (eds.). Shinshu, University press: 783–785
- Renčelj S., Prajner M., Bogataj J. 1993. Kruh na Slovenskem. Ljubljana, Kmečki glas: 123–153
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B., 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research, 22: 375–383
- Roberfroid M. 1993. Dietary fiber, inulin and oligofructose – a review comparing their physiological effects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33: 103–148
- Sapone A., Bai J. C., Ciacci C., Dolinsek J., Green P. H., Hadjivassiliou M., Kaukinen K., Rostami K., Sanders D. S., Schumann M., Ullrich R., Villalta D., Volta U., Catassi C., Fasano A. 2012. Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. BMC, 10: 13, doi: 10.1186/1741-7015-10-13: 13 str.
- Saranraj P. in Geetha M. 2011. Microbial spoilage of bakery products and its control by preservatives. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 3, 1: 38–48
- Schofield J. D., Botto mley R. C., Timms M. F., Booth M. R. 1984. Effects of heat on wheat gluten. V: Proceedings In The 2nd international workshop on gluten proteins. Graveland A., Monen J.M.E. (eds.). Wageningen, TNO: 81–90
- Silliker, J. H. 1980. Cereals and cereal products. V: Microbial ecology of foods. Silliker J. H. (ed.). Amsterdam, Academic Press: 669–730
- Smole Možina S., Ambrožič M., Raspor P. 2015. Ajda od njive do zdravja. V: Hrana in prehrana za zdravje, 2. Predstavitev evropskega projekta "Trafoon" = Presentation of the EU FP7 project "Trafoon". Raspor P., Smole Možina S. (ur.). Izola: Fakulteta za vede o zdravju, Inštitut za živila, prehrano in zdravje: 301–310
- Steadman K. J., Burgoon M. S., Kewis B. A., Edwardson S. E., Obendorf R. L. 2001. Buckwheat seed milling fractions: description, macro-nutrient composition and dietary fibre. Journal of Cereal Science, 33: 271–278
- Škrabanja V., Liljeberg Elmstahl H. G. M., Kreft, I., Björck I. M. E. 2001. Nutritional properties of starch in buckwheat products: studies *in vitro* and *in vivo*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 490–496

- Tomotake H., Shimaoka I., Kayashita J., Yokoyama F., Nakayoh M., Kato N. 2000. A buckwheat protein products suppresses gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters. *Journal of Nutrition*, 130: 1670–1674
- TRAFOON. 2013. proposal for 7 framework programme, Bruselj, Evropska Komisija: 124 str.
- Tsatsaragkou K., Yiannopoulos S., Kontogiorgi A., Poulli E., Krokida M., Mandala I. 2012. Mathematical approach of structural and textural properties of gluten free bread enriched with carob flour. *Journal of Cereal Science*, 56, 3: 603– 609
- Vogrinčič M., Timoracka M., Melichacova S., Vollmannova A., Kreft I. 2010. Degradation of rutin and polyphenols during the preparation of tartary buckwheat bread. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58: 4883–4887
- Watanabe M., Ho C. T., Lee Y. C. 1997. Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1039–1044
- Wei Y. M., Zhang Q. H., Li Z. X. 1995. Study on nutritive and physico-chemical properties of buckwheat flour. *Die Nahrung*, 39, 10: 48–54
- Whiteley L. O., Klurfeld D. M. 2000. Are dietary fiber-induced alterations in colonic epithelial cell proliferation predictive of fiber's effect on colon cancer? *Nutrition and Cancer*, 36: 131–149
- Wolever T. M. S., Jenkins D. J. A. 1993. Effect on dietary fiber and foods on carbohydrate metabolism. *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*: 157– 164
- Xiaona G., Huiyuan Y., Zhengxing C. 2006. *In vitro* digestibility of chinese tartary buckwheat protein fractions: The microstructure and molecular weight distribution of their hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 5: 508–520
- Yamagishi M., Natsume M., Nagaki A., Adachi T., Osakabe N., Takizawa T., Kumon H., Osawa T. 2000. Antimutagenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols on the mutagenic action of heterocyclic amines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5074–5078
- Yildzogle-Ari N., Altan V., Altinkurt O., Ozturk, Y. 1991. Pharmacological effects of rutin. *Phytotherapy Research*, 5, 1: 19–23
- Zhang H. W., Zhang Y. H., Lu M. J., Tong W. J., Cao G. W. 2007. Comparison of hypertension, dyslipidaemia and hyperglycaemia between buckwheat seed-consuming and non-consuming Mongolian-Chinese populations in Inner Mongolia, China. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34: 838–844
- Zobel H. F., Kulp K. 1996. The staling mechanism. V: Baked goods freshness: Technology evaluation and inhibition of staling. Hebeda R. E., Zobel H. F. (eds.). New York, Marcel Dekker: 1–65

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem:

- mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za potrežljivost, strokovno pomoč in pregled diplomskega dela;
- somentorju dr. Petru Rasporju za izkazano zaupanje in strokovno pomoč ter pregled diplomskega dela;
- delovni mentorici dr. Martini Avbelj za neizmerno potrežljivost in vodenje skozi celotno delo;
- recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za strokovni pregled diplomske naloge;
- celotni katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil ter katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil;
- staršema, ker nista nikoli obupala in sta mi stala ob strani ob uspehih in neuspehih ter mi sploh omogočila študij (hvala tudi Tini in Nejcu za moralno oporo);
- hvala vsem cimrom na študijski poti, ki so me poskušali speljati stran s poti, še posebej hvala pa Matiji, ki me je (uspešno) skušal obdržati na njej;
- največja zahvala pa gre mojemu dekletu Vesni, ki mi je stala ob strani v dobrem in slabem, ko skoraj že ni bilo več videti luči dneva in me znala spodbuditi, ko sem se sam že vdal.

Hvala tudi vsem drugim, ki ste prispevali k uspešnemu zaključku te zgodbe.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati vizualnega spremeljanja rasti plesni na rezinah kruha

vzorci	M	n	pozitivni vzorci	stopnja kontaminacije
K1	3	9	8	16
K2	3	9	9	18
K3	3	9	9	15
K4	3	9	11	22
K5	3	9	9	23
K6	3	9	7	11
K7	3	9	4	8
30R1	3	9	9	16
30R2	3	9	7	10
30R3	3	9	8	14
30Ro101	3	9	12	24
30Ro102	3	9	5	6
30Ro103	3	9	4	4

M ... število vzorčenj, n ... število analiziranih vzorcev

Priloga B: Rast plesni in kvasovk na gojišču DRBC

vzorec	m	št. plošč	št. pozitivnih plošč	stopnja kontaminacije po točkovnem sistemu
30R	3	27	16	26,00
30Ro10	3	9	0	0,00
K	7	63	9	20,00

m ... število vzorčenj

Priloga C: Rast bakterij *Bacillus subtilis* na gojišču BCA.

vzorec	m	št. plošč	št. pozitivnih plošč	Stopnja kontaminacije po točkovnem sistemu
30R	3	27	3	4
30Ro10	3	9	5	7
K	7	63	36	55

m ... število vzorčenj

Priloga D: Prisotnost spor anaerobnih bakterij na gojišču PCA

vzorec	m	št. plošč	št. pozitivnih plošč	Stopnja kontaminacije po točkovnem sistemu
30R	3	45	7,00	8,00
30Ro10	3	45	25,00	28,00
K	7	105	70,00	97,00

m ... število vzorčenj

Priloga E: Določanje barve sredice ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke

					Povprečje + SD					
	5R	10R	15R	20R	30R	20Ro10	20Ro20	20Ro40	30Ro10	K
m	2	1	1	1	3	1	1	1	3	7
n	6	3	3	3	9	3	3	3	9	21
L	48,81 ± 0	47,43 ± 0,36	45,66 ± 0,33	44,75 ± 0,19	39,32 ± 2,55	40,59 ± 0,27	38,33 ± 0,24	36,079 ± 1,02	37,75 ± 0,30	51,10 ± 1,76
a	5,96 ± 2,29	6,75 ± 0,06	6,99 ± 0	7,44 ± 0,04	8,20 ± 0,31	7,41 ± 0,03	7,52 ± 0,07	7,22 ± 0,10	7,36 ± 0,14	5,00 ± 0,14
b	12,93 ± 22,82	13,71 ± 0,06	13,85 ± 0,17	14,79 ± 0,14	15,06 ± 0,29	13,98 ± 0,03	13,88 ± 0,07	13,62 ± 0,14	13,78 ± 0,32	12,37 ± 0,42

Priloga F: Določanje trdote sredice ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke

	m	n	povp. (N)	dan star (N)
5R	2	6	23,76 ± 6,15	29,81 ± 5,58
10R	1	3	23,60 ± 2,55	25,93 ± 2,17
15R	1	3	22,28 ± 1,76	24,20 ± 3,76
20R	1	3	26,15 ± 2,64	35,141,73
30R	3	9	29,19 ± 2,44	37,96 ± 5,79
20Ro10	1	3	35,25 ± 8,34	41,51 ± 4,20
20Ro20	1	3	31,56 ± 2,27	37,22 ± 2,44
20Ro40	1	3	29,37 ± 0,37	32,73 ± 1,51
30Ro10	3	3	28,96 ± 2,46	30,73 ± 1,85
K	7	21	21,31 ± 2,48	25,49 ± 3,96

m ... število zamesov, n ... število paralelk v zamesu

Priloga G: Določanje prehranske vlaknine ajdovega kruha z različnimi dodatki rožičeve moke

vzorci	n	topne vlaknine	netopne vlaknine	skupne vlaknine
K	8	2,96±0,28	8,87±0,59	12,23±0,56
5R	4	2,33±0,37	9,40±1,08	11,73±1,10
10R	4	2,83±0,52	8,32±0,23	11,15±0,39
15R	6	2,10±0,27	9,17±0,75	10,97±1,04
20R	4	3,02±0,57	9,45±0,98	12,48±0,99
30R	10	2,55±0,65	12,30±1,42	14,77±1,41
30Ro10	9	2,69±0,58	14,34±0,70	17,16±0,92

n ... število analiziranih paralelk

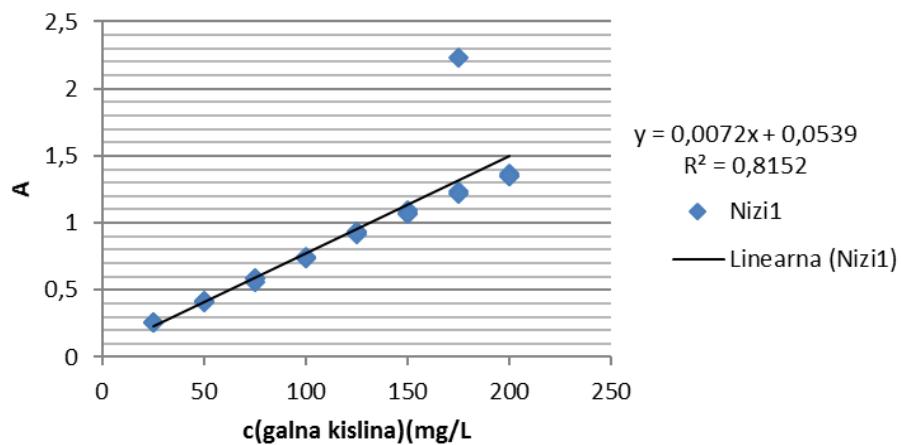
Priloga H: Enačbe umeritvenih krivulj standardov polifenolov

hidroksibenzojska kislina	$y=3128753,90625x+91,5847499999995$
ferulna kislina	$y=854616,897681452x+175,091125$
protokatehuična kislina	$y=4121942,96875x+193,18525$
vanilinska kislina	$y=45602,2429435484x-6,0457499999997$
kavna kislina	$y=5232518,96421371x-415,335374999999$
siringinska kislina	$y=18662,2916666667x+121,201333333333$
katehin	$y=1400129,47471056x-190,890594387751$
kvercetin	$y=1727539,70423167x+8238,69322368423$
rutin	$y=359318,258289623x+27029,5710997725$
kaempferol	$y=77390,1931688316-252,653015350876$
apigenin	$y=38505,4705114539x+44873,8977391305$
luteolin	$y=77390,1931688316x-252,653015350876$
viteksin	$y=6962x+370$
apigenin 7 G	$y=1234,92169212691x+11,3808260869566$
orientin	$y=9323,4728x-314,946$

Priloga I: Vsebnost polifenolov v ajdovem brezglutenškem kruhu z različnim dodatkom rožičeve moke

Vzorci (mg/kg)	K	30R	30Ro10
n	8	5	5
hidroksibenzojska	0,60±0,34	2,31±0,90	2,87±1,57
ferulna	0,55±0,53	3,34±1,20	1,46±0,46
protokatehuična	0,27±0,08	0,71±0,31	1,29±1,17
vanilinska	0,01±0,03	3,61±1,10	3,02±2,18
kavna	5,20±1,01	2,81±1,07	5,29±1,27
katehin	43,47±11,87	35,04±6,23	44,44±14,85
kvercetin	75,05±24,81	99,91±13,28	85,68±14,35
rutin	627,14±81,79	618,97±37,74	569,74±63,61
apigenin	46,44±53,74	396,11±44,06	422,60±70,30
luteolin	71,61±71,28	563,20±57,74	566,25±83,99
kaempferol	66,46±19,29	100,52±14,29	121,16±24,75
vitexin	1173,00±941,77	2152,39±806,32	2336,55±935,65
Isovitezin	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
apigenin 7 G	108,31±195,35	1468,18±123,67	1474,12±276,80
orientin	412,55±195,56	586,16±145,95	587,20±157,55

Umeritvena krivulja folin 29.6.2015



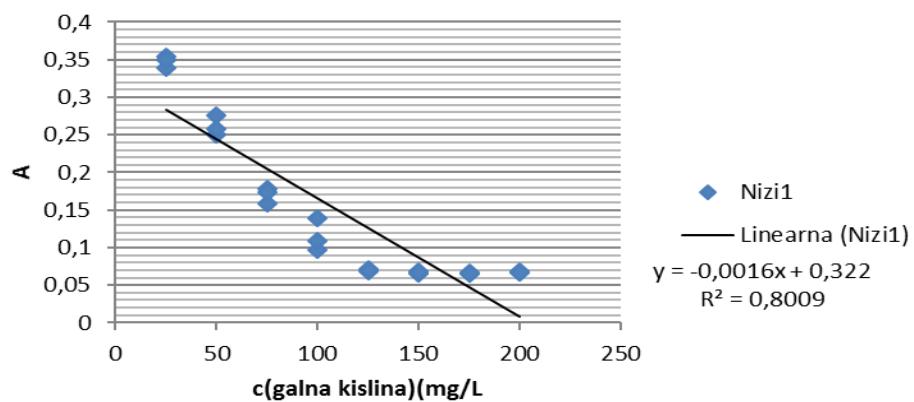
Priloga J: Umeritvena krivulja za določanje antioksidativne vrednosti ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke po metodi Folin-Ciocalteu

Priloga K: Antioksidativni potencial ajdovega kruha z različnimi dodatki rožičeve moke (metoda Folin-Ciocalteu)

	n	GAE
30Ro10	7	$3,06 \pm 0,57$
15R	6	$2,94 \pm 0,14$
20R	6	$2,83 \pm 0,10$
30R	9	$2,75 \pm 0,45$
10R	6	$2,32 \pm 0,25$
5R	4	$2,30 \pm 0,23$
K	10	$1,93 \pm 0,23$

n ... število vzorcev

Umeritvena krivulja DPPH 2.7.2015



Priloga L: Umeritvena krivulja za določanje antioksidativne aktivnosti ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke po metodi s pomočjo radikala DPPH*

Priloga M: Antioksidativni potencial ajdovega kruha z različnim dodatkom rožičeve moke (DPPH* metoda)

	n	GAE
30Ro10	7	5,78 ± 1,28
15R	6	4,53 ± 0,25
20R	6	4,35 ± 0,37
10R	6	3,86 ± 0,27
5R	4	3,70 ± 0,52
30R	9	3,63 ± 1,35
K	10	1,44 ± 1,0

n ... število vzorcev

Priloga N: Obrazec za ocenjevanje kruha Gospodarske zbornice Slovenije

Z	Konečna ocena	Kakovostna oznaka	Splošne lastnosti			
			4,70-5,00	zelo dobro	udična kakovost	
			4,25-4,69	dobro	rachel odliko od visoke kakovosti	
			4,00-4,24	zadovoljivo	opazen odliko od kakovosti	
			prod 4,00	potrebo izboljšave	pomenljive napake	
					Število tečk 5	
Z					4 3 2 1 0	
0	4	-	108 slabо ločeni kraški:	4	- - - -	
1	3	-	109 nečista površja	4	- - - -	
2	4	-	110 nenečitni rez	4	- - - -	
3	4	-	111 nenečitomeren posip	4	- - - -	
4	4	-	112 preveč posipa	4	- - - -	
5	4	-	113 nenečitkom pomokan	4	- - - -	
6	M	-	114 preveč pomokan	4	- - - -	
7	uni	4		120 siroka spodnja stran	4	- - - -
				121 razrez spod. stran	4	- - - -
					5 4 3 2 1 0	
TNOSTI SKORJE						
skorja	4	-	206 mehuri temeži:	4	- - - -	
	4	-	207 plasti mad. (kond.)	4	- - - -	
	3	-	208 začetni deli, gube	4	- - - -	
	4	-	209 neza. razpolok skorja	4	- - - -	
	4	-	210 magubana skorja	4	- - - -	
CE					5 4 3 2 1 0	
02.	4	-	307 vodni obroči	4	- - - -	
	4	-	308 vodne čete	4	- - - -	
	3	-	309 velike luknje	4	- - - -	
	4	-	310 razpolok v sredici	4	- - - -	
	4	-	311 odstop skorje/sredice	4	- - - -	
	4	-	312 meh. pošk. pod skorjo	4	- - - -	
					5 4 3 2 1 0	
PROŽNOST						
orma	4	-	405 neen. prazen toast	4	- - - -	
unc	4	-	406 presvetlo prazen toast	4	- - - -	
	4	-	407 perenimo prazen toast	4	- - - -	
	4	-	408 žlab	4	- - - -	
					5 4 3 2 1 0	
PROČELJE						
orma	4	-	507 zelenko-kisel	3 2*	- - - -	
	3	-	508 tuj. neznačilna kisina	2* 1*	- - - -	
	2	-	509 slan	4 3*	- - - -	
	3	-	510 sladek	4	- - - -	
	4	-	511 gremak	4 3	- - - -	
	3	-	512 preveč zadržen	4 3	- - - -	
	2	-			5 4 3 2 1 0	
PISNA OBRAZLOŽITVE:						

In številom zadetkem izpostavljenih se za razdalji 120-400 uporjava usajdja ocena

Pisna obrazložitev: