Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u bezglutenskom kiselom tijestu i kruhu s dodatkom brašna žutog graška

Štoler, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:627133

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Ivan Štoler

845/ USH

ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U BEZGLUTENSKOM KISELOM TIJESTU I KRUHU S DODATKOM BRAŠNA ŽUTOG GRAŠKA

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Marine Krpan, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i uz pomoć asistentice mag. ing. Saše Drakule.

Diplomski rad izrađen je u oviru znanstveno-istraživačkog projekta: Primjena vakuumskog hlađenja u proizvodnji hrane produljene trajnosti i svježine (09.01/279), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Marini Krpan i mag. ing. Saši Drakuli na pomoći i savjetima pri izradi i pisanju ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U BEZGLUTENSKOM KISELOM TIJESTU I KRUHU S DODATKOM BRAŠNA ŽUTOG GRAŠKA

Ivan Štoler, 845/USH

Sažetak: Celijakija je autoimuni poremećaj od kojeg mogu oboljeti osobe s genetskom predispozicijom, a manifestira se oštećenjem tankog crijeva ukoliko oboljela osoba prehranom unese gluten. Bezglutenski kruh predstavlja određenu vrstu tehnološkog izazova s obzirom da gluten kao protein sudjeluje u formiranju strukture kruha te utječe na njegova senzorska svojstva. Uporabom mješavine brašna od sirovina koje ne sadrže gluten te tehnologije kiseljenja tijesta nastoje se poboljšati senzorska i nutritivna svojstva kruha. Cilj ovog rada bio je odrediti udio ukupnih slobodnih fenolnih spojeva TPC metodom i antioksidacijsku aktivnost DPPH i FRAP metodama na uzorcima bezglutenskog kiselog tijesta s dodatkom brašna žutog graška te kruha i kore kruha s dodatkom istog kiselog tijesta. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da fermentacija tijesta s *L. fermentum* i *L. brevis* značajno utječe na povećanje udjela slobodnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti kiselog tijesta kao i kruha s njegovim dodatkom.

Ključne riječi: bezglutenski kruh, brašno žutog graška, DPPH, FRAP, TPC
Rad sadrži: 37 stranica, 16 slika, 4 tablice, 68 literaturnih navoda
Jezik izvornika: Hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marina Krpan
Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag. ing., asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof.dr.sc. Mirjana Hruškar
2. Doc.dr.sc. Marina Krpan
3. Doc.dr.sc. Nikolina Čukelj
4. Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček

Datum obrane: 27. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN GLUTEN-FREE SOURDOUGH AND BREAD WITH ADDED YELLOW PEA FLOUR

Ivan Štoler, 845/USH

Abstract: Celiac disease is an autoimmune disorder that can occur in genetically predisposed individuals where the ingestion of gluten leads to damage of the small intestine. Gluten-free bread production is a technological challenge given the fact that gluten has a role in forming the structure of bread, and has influence on its sensory characteristics. Flour or mix of flours from gluten-free seeds and plants and sourdough technology are used to improve sensory and nutritive properties of bread. The aim of this thesis was to determine the total free phenolic content (TPC) and antioxidative activity (DPPH and FRAP methods) of gluten-free sourdough made from yellow pea flour, as well as bread crumb and crust made with the same sourdough. Results show that the fermentation of dough with addition of *L. fermentum* and *L. brevis* significantly increases the content of free phenolic compounds and antioxidative activity of sourdough sourdough bread and bread crust.

Key words: DPPH, FRAP, gluten free, TPC, yellow pea flour
Thesis contains: 37 pages, 16 figures, 4 tables, 68 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Marina Krpan, Assistant professor
Technical support and assistance: Saša Drakula, BSc, Research assistant

Reviewers:
1. PhD. Mirjana Hruškar, Full professor
2. PhD. Marina Krpan, Assistant professor
3. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor
4. PhD. Sanja Vidaček, Associate professor

Thesis defended: 27 September 2017

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 2

2.1. CELIJAKIJA ... 2

2.2. TEHNOLOGIJA FERMENTACIJE ... 4

2.3. NUTRITIVNI SASTAV ŽUTOG GRAŠKA ... 6

2.4. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDANSI ... 7

2.5. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA TPC METODOM ... 9

2.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM ... 11

2.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM ... 12

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 14

3.1. MATERIJALI I METODE ... **14**

3.1.1. Kemikalije ... 14

3.1.2. Korišteni uređaji ... 15

3.1.3. Uzorci za analize ... 15

3.2. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI ... 16

3.3. PRIPREMA EKSTRAKTA UZORKA ZA ODREĐIVANJE FENOLNIH fSPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ... 16

3.4. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH SLOBODNIH FENOLNIH SPOJEVA TPC METODOM 17

3.4.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu ... 17

3.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenolnih spojeva TPC metodom ... 17

3.4.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za TPC metodu ... 17

3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM ... 18

3.5.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu ... 18

3.5.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom ... 18

3.5.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za DPPH metodu ... 18

3.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM ... 18

3.6.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu ... 18

3.6.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom ... 19

3.6.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu ... 19

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 20

4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA SUHE TVARI ... 20

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA ... 20

4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM .. 25

4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM .. 28

5. ZAKLJUČCI ... 31

6. LITERATURA ... 32

1. UVOD

Kruh je danas jedna od osnovnih namirnica u ljudskoj prehrani. Brašno koje se koristi u proizvodnji kruha i sličnih proizvoda je često pšenično ili od srodne žitarice te kao takvo predstavlja problem kod ljudi oboljelih od celijakije. Celijakija je autoimuni poremećaj koji zahvaća određeni dio populacije s genetskim predispozicijama, a manifestira se kao netolerancija na gluten, protein koji se prirodno nalazi u pšenici i srodnim žitaricama. Unos glutena kod osoba oboljelih od celijakije rezultira oštećenjem probavnog sustava, a procjenjuje se da je zahvaćeno 1 % ukupne svjetske populacije (CDF, 2017).

Osvještavanjem ljudi o potrebama osoba oboljelih od celijakije te sve učestalijim dijagnozama celijakije i pojave necelijakijske osjetljivosti na gluten došlo je do širenja tržišta bezglutenskih proizvoda. Međutim, čest problem kod takvih proizvoda prvenstveno su loša senzorska i nutritivna svojstva te kraća trajnost u usporedbi s proizvodima s glutenom. Razvojem bezglutenskih proizvoda otkriveno je da se kombiniranjem više različitih brašna te tehnologije mogu poboljšati njihova senzorska i nutritivna svojstva te produljiti trajnost. Tako primjerice proces fermentacije tijesta pozitivno utječe na sve aspekte kvalitete pekarskih proizvoda poput teksture, arome, nutritivnih svojstava i trajnosti (Nionelli i Rizzello, 2016).

Fenolni spojevi su ubikvitarni u biljkama i pridonose unosu ukupnih antioksidansa u ljudskoj prehani (Balasundram i sur., 2006). Molekule fenolnih spojeva mogu biti jednostavne strukture, a mogu biti i visoko polimerizirani spojevi (Bravo, 1998). Njihova struktura je zaslužna za različita djelovanja u organizmu kao npr. za kapacitet hvatanja slobodnih radikala (tj. antioksidacijsku aktivnost), a uvriježena je podjela na one koji su najznačajniji u ljudskoj prehrani, a to su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini (Balasundram i sur., 2006). Važnost antioksidansa u prehrani i zdravlju je već provjereno dokazana zbog njihove uloge u hvatanju štetnih reaktivnih vrsta spojeva koje oštećuju molekule poput proteina, enzima, DNA i sl.

Cilj ovog rada bio je odrediti udjel ukupnih slobodnih fenolnih spojeva TPC (engl. *Total Phenolic Content*) metodom te odrediti antioksidacijsku aktivnost DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodama za uzorke bezglutenskog kiselog tijesta s dodatkom brašna žutog graška te kruha i kore kruha s dodatkom istog kiselog tijesta. Dobiveni rezultati će utvrditi je li dodatak brašna žutog graška i provođenje kisele fermentacije tijesta utjecalo na povećanje udjela ukupnih fenolnih spojeva i povećanje antioksidacijske aktivnosti.

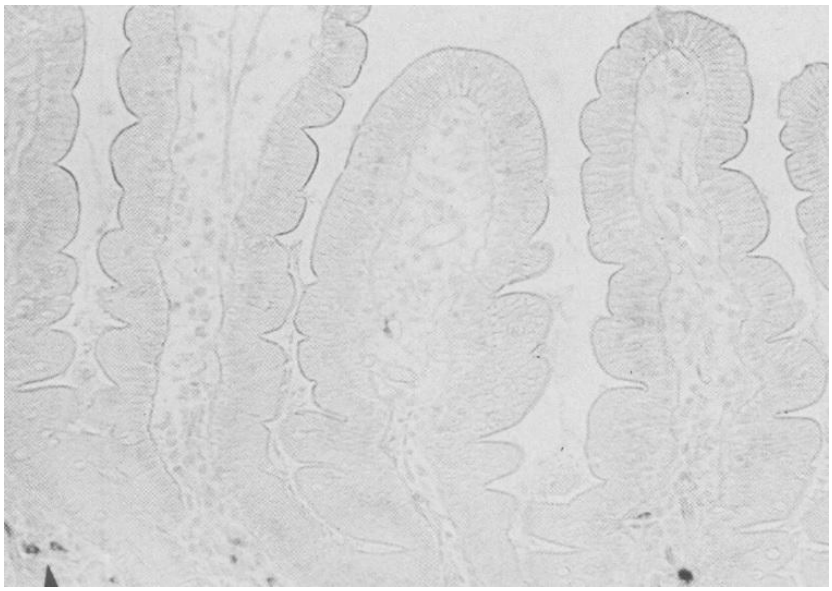
2. TEORIJSKI DIO

2.1. CELIJAKIJA

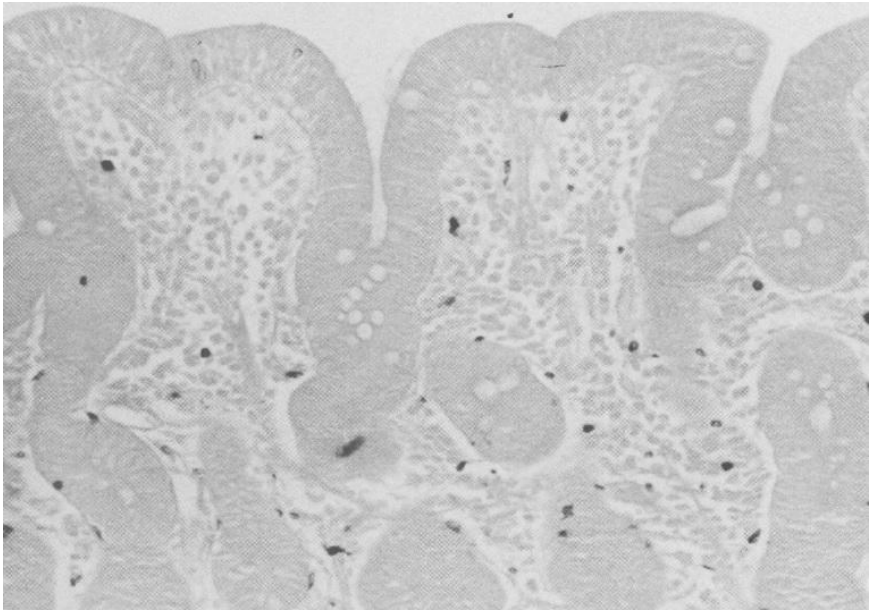
Celijakija je genetska autoimuna bolest koja je karakterizirana doživotnom intolerancijom na gluten, protein koji obuhvaća kompleksnu skupinu prolamina u pšenici (glijadin), raži (sekalin) i ječmu (hordein).

Patogeneza celijakije uključuje interakcije između genetske podložnosti (HLA-DQ2 i HLA-DQ8 aleli), izloženosti glutenu iz okoliša (unos glutena) i imunološkog odgovora koji obično uzrokuje oštećenje mukoznog tkiva probavnog sustava. Specifičan sastav aminokiselina ovih prolamina, s prisutnim prolinom i glutaminom, odgovoran je za njihovu otpornost na proteolitičku probavu u ljudi. Ovakva nepotpuna probava rezultira s puno relativno velikih glutenskih peptida u tankom crijevu. Određeni peptidi glutena tako mogu proći kroz epitelno tkivo tankog crijeva i ući u sluznicu. Kada jednom uđu u sluznicu, glutaminski ogranci glutenskih peptida mogu biti deaminirani od strane enzima transglutaminaze. Stanice koje eksprimiraju HLA-DQ2 i HLA-DQ8 molekule predstavljaju stanice antigena i imaju povećan afinitet za vezanje na deaminirane peptide glutena. Kroz niz događaja navedene antigen stanice s vezanim deaminiranim peptidima glutena uzrokuju aktivaciju specifičnih $CD4^+$ T stanica (limfocita), što pokreće autoimuni odgovor koji vodi do oštećenja tkiva karakterističnog za celijakiju (Kagnoff, 2005; Briani i sur., 2008).

Do ranih 1990-ih, celijakija se smatrala rijetkom bolešću koja zahvaća djecu i karakterizirana je ozbiljnom neuhranjenosti i gastrointestinalnim problemima (dijareja, gubitak tjelesne mase, povraćanje, bol u abdomenu, nadutost, zatvor). Bolest se tada dijagnosticirala preko gastrointestinalnih simptoma i biopsije tkiva tankog crijeva. Današnja dostupnost visokoosjetljivih i specifičnih testova s antitijelima omogućila je bolje dijagnosticiranje bolesti i shvaćanje da je bolest puno raširenija nego što se mislilo (Capriles i Areas, 2014). Na slikama 1 i 2 su prikazane fotografije biopsije tkiva crijevnih resica zdravog čovjeka i pacijenta oboljelog od celijakije nakon unosa glutena.



Slika 1. Fotografija biopsije crijevnih resica zdravog čovjeka (Strobel i sur., 1983)



Slika 2. Fotografija biopsije crijevnih resica pacijenta oboljelog od celijakije (Strobel i sur., 1983)

Od velike je važnosti pravovremena dijagnoza, zato što se kasnije komplikacije poput osteporoze i raka mogu prevenirati adekvatnom prehranom (Capriles i sur., 2009; Fasano i Catassi, 2012). Iako je u proteklih 30 godina došlo do velikog napretka u shvaćanju patogeneze te kliničkih i nutritivnih aspekata celijakije, stroga doživotna bezglutenska prehrana je za sada jedino učinkovito i sigurno liječenje za oboljele od celijakije (Capriles i Areas, 2014).

Primjena doživotne bezglutenske prehrane nije laka za pridržavanje zbog moguće prisutnosti glutena u hrani u kojoj se ne očekuje njegovo prisustvo (kontaminacija prilikom procesiranja hrane); može društveno ograničiti osobu; dostupnost bezglutenskih proizvoda je lošija i proizvodi su skuplji u odnosu na proizvode koji sadrže gluten te često može dovesti do manjka nutrijenata u prehrani (Arendt i sur., 2011).

2.2. TEHNOLOGIJA FERMENTACIJE

Kiselo tijesto je tijesto čiji se mikroorganizmi (bakterije mliječne kiseline, kvasci), porijeklom iz sirovina ili dodani kao starter kulture nalaze u aktivnom stanju (Penić, 2010) te ono predstavlja kompleksni mikrobni ekosustav. Upotreba bakterija mliječne kiseline u pripremi kruha ima dugu tradiciju, od spontanih fermentacija gdje je njihova uloga bila kiseljenje tijesta, preko definiranih starter kultura, do razvoja i primjene funkcionalnih starter kultura (Mrvčić i sur., 2011).

Bakterije mliječne kiseline mogu se podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne, a glavna razlika između njih su produkti metobolizma. Homofermentativne bakterije kao primarni produkt metabolizma proizvode mliječnu kiselinu (laktat), a često se koriste u proizvodnji mliječnih proizvoda zbog brzog zakiseljavanja podloge u kojoj rastu. Homofermentativne vrste bakterija mliječne kiseline uključuju određene pripadnike rodova poput *Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Pediococcus* i *Aerococcus.* Heterofermentativne bakterije kao glavne produkte svog metabolizma proizvode mliječnu kiselinu, etanol, octenu kiselinu i ugljikov dioksid. Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline uključuju rod *Leuconostoc spp., Lactobacillus brevis, Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus reuteri* i druge (CU, 2017).

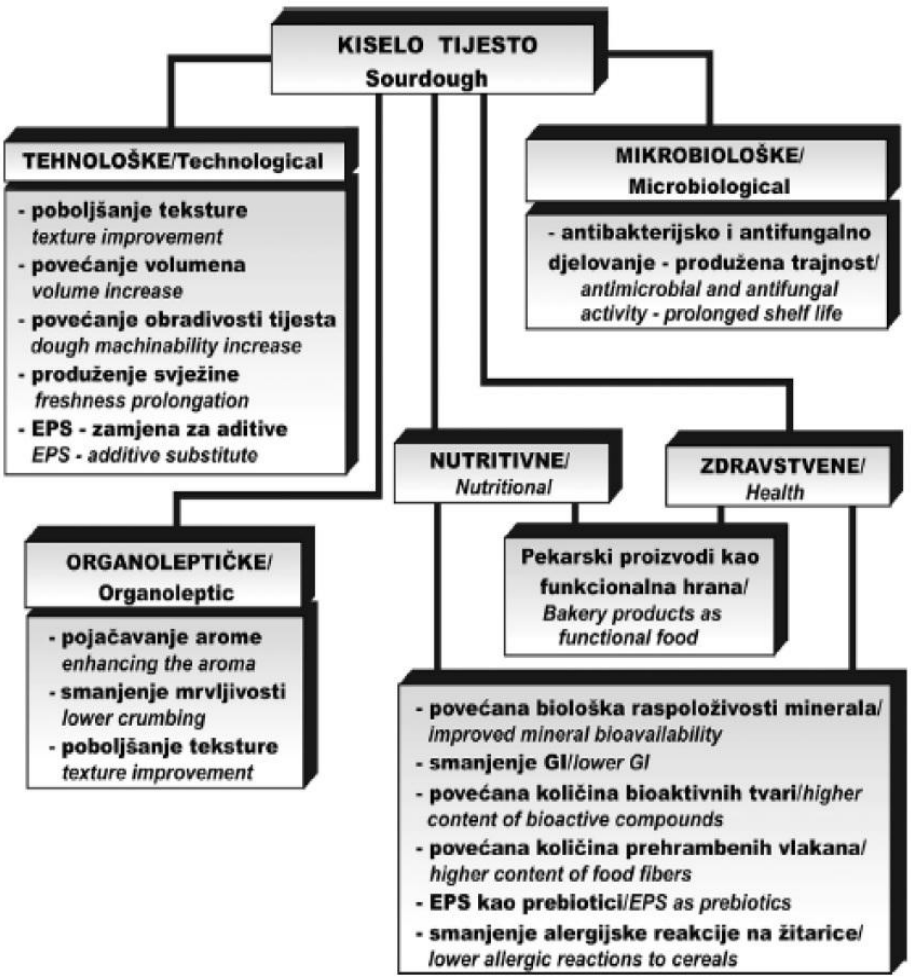
Moderna biotehnologija pekarskih proizvoda uglavnom koristi fermentaciju tijesta tj. kiselo tijesto kao prirodno sredstvo dizanja tijesta zbog svojih prednosti u usporedbi s pekarskim

kvascem, poput npr. razvoja karakteristične arome kruha što rezultira poboljšanim senzorskim svojstvima (Hansen i Hansen, 1996).

Mnoga svojstva kiselih tijesta ovise o metaboličkoj aktivnosti korištenih bakterija mliječne kiseline, a to su mliječno kisela fermentacija, proteoliza, sinteza hlapljivih spojeva, sinteza antifungalnih spojeva i ostale metaboličke aktivnosti (Gobbetti, 1998; Hammes & Ganzle, 1998). Mnoge bakterije mliječne kiseline mogu proizvesti različite dugolančane polimere ugljikohidrata tj. egzopolisaharide koji se razlikuju u sastavu, strukturi i fizikalnim karakteristikama (De Vuyst i Degeest, 1999). Ti egzopolisaharidi se sintetiziraju ekstracelularno (preko saharoze i uz djelovanje određenih enzima) ili intracelularno (preko prekursora ugljikohidratnih nukleotida i odgovarajućih enzima) te je dokazano da mogu utjecati na poboljšanje tehnoloških i nutritivnih svojstva bezglutenskog kruha kroz svoju funkciju, kao prebiotici i hidrokoloidi (Arendt i sur., 2011).

Korištenje bakterija mliječne kiseline u proizvodnji kiselog tijesta ima već dobro poznatu ulogu s obzirom na njihov pozitivan utjecaj na senzorska svojstva i nutritivnu vrijednost bezglutenskih proizvoda dobivenih od takvog tijesta (De Angelis i sur., 2007). Primjer korištenja fermentacije s bakterijama mliječne kiseline u proizvodnji bezglutenskog proizvoda je proizvodnja *towga* od brašna sirka (lat. *Sorghum*) gdje je tijekom fermetacije došlo do sinteze različitih spojeva odgovornih za aromu, a što se pripisuje spojevima poput alkohola i diacetila (Mugula i sur., 2003).

Prednosti korištenje tehnologije fermentacije tijesta su prikazane na slici 3.



Slika 3. Prednosti korištenja kiselog tijesta u proizvodnji pekarskih proizvoda (Mrvčić i sur., 2011)

Osim same fermentacije tijesta, važno je i odabrati adekvatne sirovine tj. njihovu kombinaciju i omjer kako bi se postigla što bolja senzorska i nutritivna svojstva (Gomez i sur., 2008).

2.3. NUTRITIVNI SASTAV ŽUTOG GRAŠKA

Korištenje brašna žutog graška može poboljšati nutritivni profil proizvoda te poboljšati tehnološka svojstva poput zadržavanja vode i ulja, formiranja gel strukture i sl. (Agboola i sur., 2010).

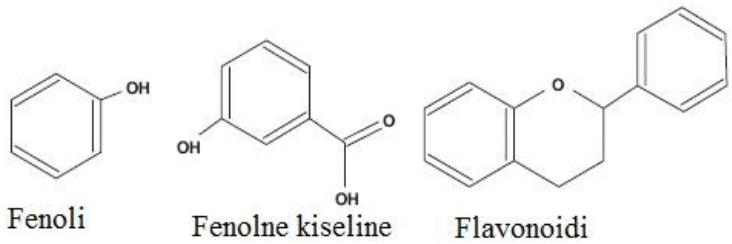
Žuti grašak (*Pisum sativum L.*) je jedan od glavnih kultivara mahunarki u Kanadi, te je ona ujedno i najveći svjetski izvoznik istog (Wang i sur., 2003). Bogat je proteinima, škrobom, vlaknima, vitaminima i mineralnim tvarima te stoga služi kao dobar izvor proteina, škroba i vlaknastih sastojaka koji imaju sve veću važnost u pravilnoj prehrani. Prehrambena vlakna su

danas već dobro uvriježena kao poželjna u pravilnoj prehrani zbog svog pozitivnog utjecaja na peristaltiku crijeva (Halliwell i Gutteridge, 1999). Dokazano je da plodovi tj. sjemenke graška sadrže veće udjele polifenola zbog pigmenata koje sadrže u ljusci (Elias i sur., 1979), a sve je više dokaza da konzumacija hrane bogate prirodnim polifenolima smanjuje rizik od oboljevanja od raznih bolesti (Beninger i Hosfield, 2003). Ljuske zrna graška su dobar izvor polifenola čiji se terapeutski učinci pripisuju njihovim antioksidativnim svojstvima (hvatanje slobodnih radikala tj. reaktivnih oblika). Reaktivni kisikovi oblici stvoreni *in vivo* su povezani s patogenezom raznih bolesti poput raka, arteroskleroze, hipertenzije i starenja (Halliwell i Gutteridge, 1999).

2.4. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDANSI

Fenolni spojevi su ubikvitarni u biljkama i konzumacijom bilja te fitokemikalije (sekundarni biljni metaboliti) pridonose unosu ukupnih antioksidansa u ljudskoj prehrani (Balasundram i sur., 2006). Biljke proizvode puno različitih fenolnih spojeva koji sadrže jednu ili više OH skupina vezanih na aromatski tj. fenolni prsten (Crototteau i sur., 2000).

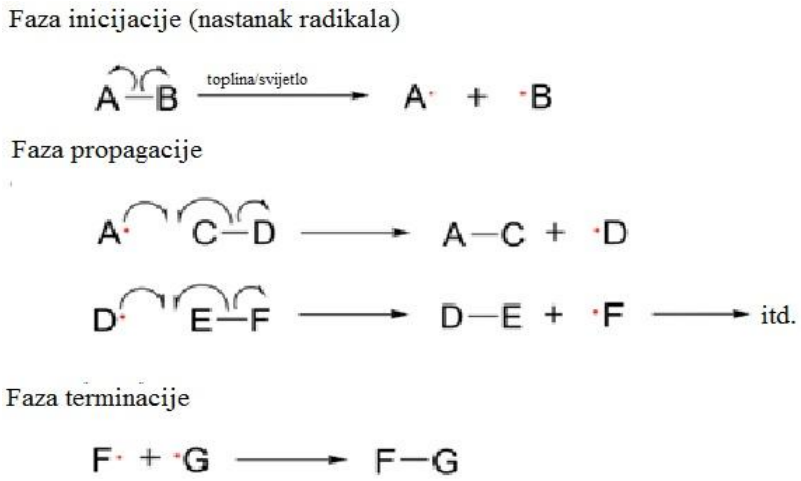
Molekule fenolnih spojeva mogu biti jednostavne strukture, a mogu biti i visoko polimerizirani spojevi (Bravo, 1998). Na slici 4 prikazana je struktura jednostavnih molekula fenola.



Slika 4. Struktura jednostavnih fenolnih spojeva (Anonymous, 2017)

Prema kemijskoj strukuri, fenolni spojevi se mogu podijeliti na flavonoide i fenolne kiseline (i njima srodne spojeve). Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se nalaze mnogim biljakama, a koncentrirani su u sjemenkama, koži i kori voća, kori drveća, cvijeću i lišću. Dokazano je da velik broj ljekovitog bilja sadrži flavonoide s izraženom antioksidacijskom i antiradikalnom aktivnosti (Rice-Evans i sur., 1995; Bors i sur., 1990).

Fenolni spojevi imaju svojstvo hvatanja slobodnih radikala tj. reaktivnih kisikovih oblika zbog toga što je redukcijski potencijal elektrona fenolnog radikala niži od redukcijskog potencijala elektrona reaktivnog kisikovog oblika (Mathew i sur., 2015) i zato što su fenoksi radikali općenito manje reaktivni od kisikovih radikala (Bors i sur., 1994). Mehanizam nastanka, propagacije i terminacije radikala prikazan je na slici 5.



Slika 5. Faze nastanka, lančane reakcije tj. propagacije i eliminacije tj. terminacije slobodnog radikala (CL, 2017)

Nadalje, fenoli pokazuju i antioksidacijska svojstva kroz kelatno vezanje dvovalentnih iona željeza, bakra, cinka i magnezija te aktiviranje antioksidacijskih enzima (Kazazić, 2004) i inihibiciju enzima poput lipooksigenaza, ciklooksigenaza, monooksigenaza, protein kinaza i dr. (Cao i sur., 1997). Antioksidansi se mogu definirati kao spojevi koji pri niskim koncentracijama sprečavaju oksidaciju supstrata poput npr. proteina, enzima, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata, lipida (Djilas i sur., 2002). U biološkim sustavima, reaktivni dušikovi i kisikovi oblici poput superoksida, hidroksila i dušično-oksidnih radikala oštećuju molekule poput DNK te uzorkuju oksidaciju proteina i lipida (Xu i sur., 2017) te je stoga važnost antioksidans više nego očita.

Unutar biosfere, najvažniji akceptor elektrona je molekularni oblik kisika, koji je po svojoj prirodi radikal, lako prima nesparene elektrone te time može stvoriti reaktivne oblike kisika. Ti reaktivni oblici kisika mogu započeti fazu inicijacije i fazu propagacije tj. nastajanje lančane reakcije slobodnih radikala koje potencijalno mogu nanjeti veliku štetu stanicama (Riley, 1994).

Slobodni radikal se može definirati kao svaka molekula koja ima sposobnost nezavisnog postojanja u obliku u kojem ima nespareni elektron u elektronskoj orbitali. Prisutnost tog nesparenog elektrona u orbitali je odgovorna za određena zajednička svojstva koja radikali dijele. Mnogi radikali su nestabilni i vrlo reaktivni te kao takvi mogu primati ili davati elektron tj. biti elektron akceptori ili elektron donori u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama (Cheeseman i Slater, 1993). Izvori slobodnih radikala u ljudskom organizmu se prema Lobo i sur. (2010) mogu podijeliti na one kod koji slobodni radikali nastaju endogeno (u organizmu) i na one kod kojih slobodni radikali dospijevaju u organizam iz okoliša (vanjski izvori). Primjeri nekih izvora slobodnih radikala u organizmu su: mitohondriji, enzimi (npr. ksantin oksidaza), peroksisomi, upale, fagocitoza, tjelovježba, metabolizam arahidonske kiseline, smanjen protok krvi kroz organe zbog prepreke u krvožilnom sustavu. Primjeri nekih vanjskih izvora slobodnih radikala su: dim cigarete, zagađivači okoliša, ionizacijsko zračenje, određeni lijekovi i pesticidi, industrijska otapala i ozon.

Antioksidansi prirodnog porijekla su većinom porijeklom iz bilja i to molekule fenola i polifenola, flavonoida, karotenoida, steroida i tiolni spojevi. Ovi spojevi mogu pomoći u zaštiti stanice od oksidativnog stresa i smanjiti rizik oboljevanja od kronične bolesti (Lu i sur., 2010).

2.5. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA TPC METODOM

TPC (engl. *Total Phenolic Content*) je analitička metoda pomoću koje se kvantificira ukupni fenolnih spojeva u hrani ili nekom drugom biološkom uzorku, a temelji se na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) koji omogućava mjerenja u vidljivom području spektra (Robards i Antolovich, 1997; Magalhaes i sur., 2006).

Metoda se zasniva na prijenosu elektrona s fenolnih spojeva na kompleks fosfomolibdenske/fosfovolframatne kiseline u bazičnom mediju do pojave plavog obojenja čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri oko 760 nm (Singleton i sur., 1999). Kemijska priroda reakcija Folin-Ciocalteu reagensa nije potpuno poznata, ali pretpostavlja se da se sastoji od slijeda reverzibilnih redukcijskih reakcija koje uključuju transfer jedan ili dva elektrona te vode do nastanka kemijskih vrsta koje daju plavo obojenje (moguće od $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$), tj. vezanje elektrona na inače nevezajuću (engl. *non-bonding*) orbitalu reducira MoO^{4+} u izostrukturni (istog oblika, različite veličine) MoO^{3+} koji daje plavo obojenje (Singleton i sur., 1999). U svom potpuno oksidiranom stanju, izopolifosforilirani

volframovi ioni imaju valenciju metala 6^+, a njihovi molibdenski analozi daju žuto obojenje. Zajedno daju miješane ione heteropolifosfovolframate i molibdenate. U kiselom mediju postoje kao hidratizirani oktaedarski kompleksi s oksidima metala raspoređenim oko središnjeg fosfata. Posebnu važnost mora se prirodati tumačenju rezultata zato što reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom nisu potpuno selektivne te na rezultate mogu utjecati drugi oksidansi tj. supstrati tako da inhibiraju, pokazuju sinergistički učinak ili pojačavaju učinak reagensa (Huang i sur., 2005).

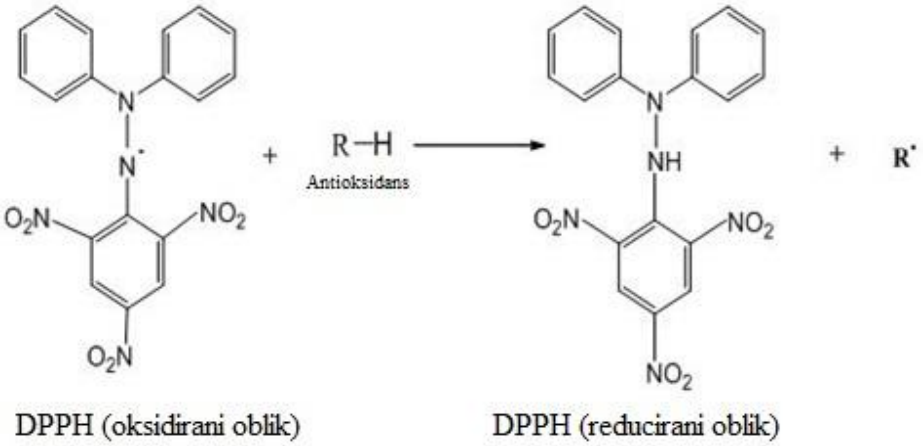
Važno je i dodatak Folin-Ciocalteu reagensa u suvišku kako bi reagirao potpuno sa svim fenolnim spojevima zato što on u bazičnom mediju nije stabilan. Određeni spojevi se koriste kao standardi za prikazivanje rezultata kao njihov maseni ekvivalent po masi ili volumenu uzorka. Primjeri takvih spojeva su taninska kiselina, galna kiselina, tirozin, katehin i ostali, pri čemu je najčešće korištena galna kiselina (Singleton i sur., 1999).

2.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

DPPH metoda je široko primjenjivana metoda za određivanje potencijala hvatanja slobodnih radikala od strane antioksidativnih spojeva. Smatra se jednom od standardnih i lakših kolorimetrijskih metoda za određivanje antioksidativnih svojstava čistih spojeva (Mishra i sur., 2012).

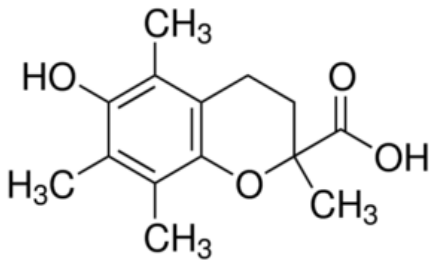
DPPH metoda se koristi za mjerenje antioksidacijske aktivnosti zato što dobro simulira reaktivne kisikove i dušikove oblike koji se nalaze u biološkim sustavima (Arnao, 2000), a hvatanje slobodnih radikala je opće prihvaćen mehanizam inhibitornog djelovanja antioksidansa na oksidaciju lipida (Brand-Williams i sur., 1995). Često se koristi za određivanje sadržaja antioksidanasa u žitaricama i povrću te ostalom bilju (Cheng i sur., 2006).

DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) u otopini daje stabilne radikalne ione i u metanolu daje ljubičasto obojenje koje apsorbira svjetlost pri 515 nm. Metoda se temelji na tome da se ion DPPH reducira iz DPPH• u $DPPH_2$ prilikom primanja protona (H) od strane antioksidansa, a ljubičasto obojenje prelazi u žuto obojenje što je popraćeno smanjenjem apsorbancije pri 515 nm. Promjena smanjenja intenziteta boje prati se spektrofotometrijski i primjenjuje se za određivanje količine reduciranog DPPH (Mishra i sur., 2012). Izgled molekule DPPH je prikazan na slici 6.



Slika 6. Reakcija redukcije DPPH (Casanovas i sur., 2015)

Neparni elektron dušikovog atoma u sredini DPPH molekule je reduciran primanjem protona od antioksidansa tvoreći time odgovarajući hidrazin (Contreras-Guzman i Srong, 1982). Nadalje, DPPH metoda se može koristiti i kada se primjenjuju nepolarna mediji i vodeni mediji, te se može koristiti za analizu hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa (Prior i sur., 2005). Metoda je jedinstvena po tome što se reakcija uzorka s DPPH provodi u metanolu/vodi što olakšava ekstrakciju spojeva odgovornih za antioksidacijsku aktivnost, a rezultate određivanja je moguće uspoređivati s ostalim metodama određivanja antioksidacijske aktivnosti za hranu (Kedare i Singh, 2011). Također, prednost ove metode je što će, ukoliko se izdvoji dovoljno vremena, DPPH reagirati s cijelim uzorkom tj. DPPH reagira sporo čak i sa slabim antioksidansima (Prakash, 2001). Kao što je predloženo u radu Prakash (2001), rezultati se prikazuju kao ekvivalenti troloxa ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline), a s obzirom na činjenicu da postoje različite vrste antioksidansa koji različitim brzinama i kinetikama reagiraju s DPPH, također se predlaže da se veličina uzoraka prilagodi tome da dođe do reakcije samo 50 % ukupne količine DPPH (da analiza ima prihvatljivo vrijeme trajanja). Izgled molekule troloxa dan je na slici 7.



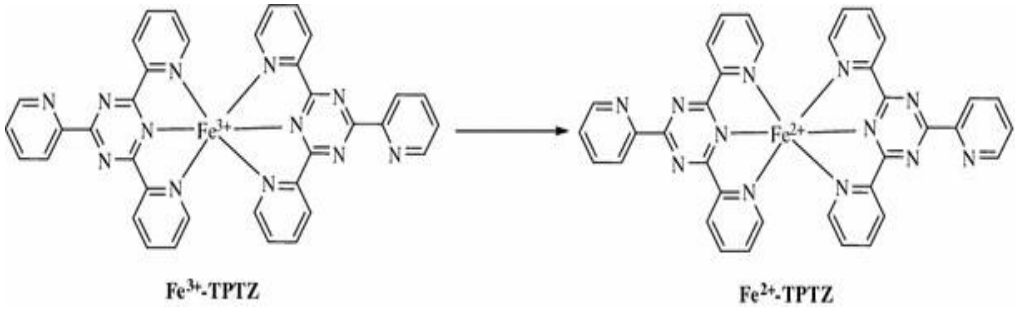
Slika 7. Izgled molekule troloxa ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne) (Sigma-Aldrich, 2017)

2.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

FRAP je jednostavna, brza, jeftina i robusna kolorimetrijska metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Glavna kemijska reakcija u FRAP metodi je prijenos elektrona između kompleksa željeza i TPTZ-a (2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina) tj. između $Fe(TPTZ)_2$ i molekule donora elektrona ArOH. Kemijska reakcija je prikazana u kemijskoj jednadžbi (Ou i sur., 2002):

$$Fe(TPTZ)_2\ (III) + ArOH \rightarrow Fe\ (TPTZ)_2\ (II) + ArOH^{+}\bullet$$

Metoda koristi antioksidanse u uzorku kao reducense za oksidanse koji su u prisutni u suvišku. Kako je oksidans u suvišku, jedini ograničavajući faktor nastajanja kompleksa produkta Fe^{2+}-TPTZ (koji daje obojenje) je reducirajuća moć uzorka (Benzie i Strain, 1999). Oksidirani i reducirani oblik kompleksa željezo-TPTZ prikazan je na slici 8.



Slika 8. Oksidirani i reducirani oblik kompleksa željezo-TPTZ (Gülçin, 2012)

U području niskog pH, redukciju $Fe(TPTZ)_2$ (III) kompleksa u Fe $(TPTZ)_2$ (II) (daje plavo obojenje) je moguće pratiti spektrofotometrijski pri 593 nm, a budući da reakcija nije selektivna, bilo koja druga redoks reakcija koja ima niži redoks potencijal od redoks reakcije promatranog kompleksa željeza i TPTZ-a će uzrokovati redukciju $Fe(TPTZ)_2$ (III). Iz tog razloga je promjena apsorbancije direktno povezana s ukupnom moći reduciranja u uzorku, tj. s njegovom elektron donorskom antioksidacijskom aktivnošću (Benzie i Strain, 1999).

FRAP analiza se treba provoditi u kiselom području pH, pri pH = 3,6, kako bi se održala dobra topivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (Kiš, 2012). U FRAP analizi nije potrebno prethodno tretirati uzorak, rezultati pokazuju linearnost u širokom području, a reproducibilnost i osjetljivost metode su visoki (Benzie i Strain, 1996).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

U ovom radu provedene su analize ukupno različitih 9 uzoraka kiselog tijesta te kruha i kore kruha iz istog kiselog tijesta (po dvije paralele za svaki uzorak). Uzorcima je određena suha tvar te je provedena ekstrakcija i analiza udjela slobodnih fenolnih spojeva i njihove antioksidacijske aktivnosti.

3.1.1. Kemikalije

Provođenje analitičkih metoda zahtjeva pripremu kemikalija i reagensa propisane koncentracije. Popis kemikalija korištenih pri izradi analiza prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Korištene kemikaije

Ime kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Folin-Ciocalteu reagens		Sigma
Galna kiselina	98 %	Acros
Natrijev acetat trihidrat		Lach- Ner
(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (TROLOX)	97 %	Aldrich
2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ)	98 %	Alfa Aesar
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)		Aldrich
Octena kiselina (ledena)	99,5 %	Macron
Metanol (MeOH)	HPLC čistoća	J. T. Baker
Ferulinska kiselina	99 %	Acros
Klorovodična kiselina (HCl)	37 %	Carlo Erba
Željezov (III) klorid heksahidrat ($FeCl_3$ x $6H_2O$)	*pro analysi*	Kemika
Natrijev karbonat (bezvodni)	*pro analysi*	Gram-Mol

3.1.2. Korišteni uređaji

Provođenje analitičkih metoda zahtjeva korištenje određenih uređaja za pripremu i analizu uzoraka. Popis korištenih uređaja prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Korišteni uređaji

Vrsta uređaja	Proizvođač i model
Analitička vaga	Shimadzu AX200
Mikrocentrifuga	Thermo Fisher Scientific Micro CL21 Centrifuge
Ultrazvučna kupelj	Bandelin Sonorex RK100H
Sušionik	Instrumentaria Zagreb ST-01/02
Spektrofotometar	PYE Unicam SP6-500 UV Spectrophotometer

3.1.3. Uzorci za analize

U ovom radu su analizirani uzorci bezglutenskih proizvoda: liofilizirano kiselo tijesto s dodatkom brašna žutog graška, kruh i kora kruha dobiveni s dodatkom istog kiselog tijesta. Popis analiziranih uzoraka i njihovih oznaka korištenih u daljnjem tekstu vidljiv je u tablici 3.

Tablica 3. Oznake uzoraka i njihovo značenje

Oznaka uzorka	Opis uzorka
0+G KT	Nefermentirano tijesto
LF+G KT	Kiselo tijesto fermentirano s *Lactobacillus fermentum*
LB+G KT	Kiselo tijesto fermentirao s *Lactobacillus brevis*
0+G KRUH	Kruh bez dodatka kiselog tijesta
LF+G KRUH	Kruh od tijesta fermentiranog s *Lactobacillus fermentum*
LB+G KRUH	Kruh od tijesta fermentiranog s *Lactobacillus brevis*
0+G KORA	Kora kruha bez dodatka kiselog tijesta
LF+G KORA	Kora kruha od tijesta fermentiranog s *Lactobacillus fermentum*
LB+G KORA	Kora kruha od tijesta fermentiranog s *Lactobacillus brevis*

3.2. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI

Odvagano je 2,000 g ± 0,0001 g liofiliziranog uzorka u prethodno osušenu i ohlađenu metalnu posudicu te je uzorak sušen do konstantne mase u sušioniku na 130 ^{O}C tijekom 90 min. Nakon sušenja je posudica s uzorkom prenesena u eksikator na hlađenje (oko 30 minuta) i zatim je ponovo izvagana. Određena je razlika u masi uzorka prije i poslije sušenja, a ta razlika predstavlja masu isparene vode. Udio suhe tvari u uzorku određen je na temelju mase isparene vode prema jednadžbi:

$$Udio\ vode\ u\ uzorku\ (\%) = \frac{m_{prije\ sušenja} - m_{nakon\ sušenja}}{m_{prije\ sušenja}} * 100$$

$$Udio\ suhe\ tvari\ u\ uzorku\ (\%) = 100\ \% - [Udio\ vode\ u\ uzorku]$$

gdje je: $m_{prije\ sušenja}$ – masa uzorka prije sušenja

$m_{nakon\ sušenja}$ – masa uzorka nakon sušenja

3.3. PRIPREMA EKSTRAKTA UZORKA ZA ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Priprema ekstrakta uzorka je rađena prema Li i sur. (2009). Izvagano je 0,2500 g ± 0,0001 g liofiliziranog uzorka kruha, kore kruha i kiselog tijesta te je uzorak prenesen u epruvete od 1,5 mL. Uzorku je zatim dodan 1 mL 80 % etanola, homogeniziran uzorak je u zatvorenoj epruveti stavljen u ultrazvučnu kupelj na 10 min. Nakon ultrazvučne kupelji uzorak je centrifugiran na 8000 o min^{-1} tijekom 15 min. Nakon centrifugiranja je odvojen supernatant koji je stavljen na uparavanje pod dušikom uz grijanje na 40 ^{O}C. Ekstrakcija s etanolom je ponovljena još dva puta, uz dodatak po 800 µL 80 % etanola. Nakon ekstrakcije su svi supernatanti spojeni i upareni do suhog.

U epruvetu s uparenim ekstraktom je potom dodano 500 µL 2 % octene kiseline, homogenizirano, zatim je dodano 500 µL etil acetata. Uzorak je nakon dodatka etil acetata centrifugiran na 14 000 o min^{-1} tijekom 15 min. Nakon centrifugiranja je gornji sloj odvojen (etil acetatna frakcija) i stavljen na upravanje pod dušikom uz zagrijavanje na 40 ^{O}C. Postupak ekstrakcije s etil acetatom je ponovljen još dva puta i supernatanti su spojeni i upareni do suhog.

Nakon priprave ekstrakta uzorci su zamrznuti do daljnjih analiza. Ekstrakcija fenolnih spojeva je za svaki uzorak provedena u dvije paralele. Prije analize je ekstrakt otopljen u 200 µL metanola, homogeniziran, a zatim je centrifugiran na 14 000 o min^{-1} tijekom 5 min.

3.4. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH SLOBODNIH FENOLNIH SPOJEVA TPC METODOM

3.4.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Metoda je rađena prema Yu i sur. (2002), uz modifikacije. Za provedbu analize pripremljena je 20 % otopina natrijeva karbonata. Otopina natrijeva karbonata je pripremljena u odmjernoj tikvici od 100 mL otapanjem 20 g anhidrida natrijeva karbonata u 80 mL vruće destilirane vode te je otopina zatim ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina natrijeva karbonata je odstajala 24 sata i nakon toga je profiltrirana. Pripremljene su i otopine ferulinske i galne kiseline u metanolu koncentracija

- ferulinske kiseline: 5,047; 3,861; 2,574; 1,287; 0,257 µmol mL^{-1},
- galne kiseline: 5,878; 4,411; 2,936; 1,468; 0,294 µmol mL^{-1}.

3.4.2. Postupak određivanja ukupnih fenolnih spojeva TPC metodom

U mikrokivetu je dodano 200 µL destilirane vode, 10 µL uzorka i 50 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 min je u otopinu dodano 150 µL 20 % otopine natrijeva karbonata i 580 µL destilirane vode. Mikrokiveta je začepljena, promućkana te je nakon 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi izmjerena apsorbancija pri 765 nm. Sva mjerenja su provedena u tri paralele, a slijepa proba je sadržavala 10 µL metanola umjesto uzorka.

3.4.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za TPC metodu

Postupak pripreme za izradu baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje ukupnih fenolnih spojeva u uzorku, ali se razlikuje u tome što se umjesto 10 µL uzorka dodaje 10 µL ferulinske tj. galne kiseline poznate koncentracije. Mjerenja su provedena na 5 koncentracijskih razina u 3 ponavljanja.

3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

3.5.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Metoda je rađena prema Brand-Williams i sur. (1995), uz modifikacije. Za provedbu analize je pripremljena svježa 0,06 mmol L^{-1} otopina DPPH reagensa u metanolu te otopine troloxa u metanolu koncentracija (0,989; 0,593; 0,198; 0,099; 0,040 μmol mL^{-1}).

3.5.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

U mikrokivetu je dodano 25 μL uzorka i 0,95 mL 0,06 mmol L^{-1} otopine DPPH te je mikrokiveta začepljena i promućkana. Nakon stajanja uzorka 30 min u mraku izmjerena je apsorbancija pri 517 nm. Sva mjerenja su provedena u tri paralele, a slijepa proba je sadržavala 25 μL metanola umjesto uzorka tj. ekstrakta.

3.5.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za DPPH metodu

Postupak izrade baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 25 μL uzorka dodaje 25 μL otopine troloxa poznate koncentracije. Mjerenja su provedena na 5 koncentracijskih razina troloxa u 3 ponavljanja.

3.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

3.6.1. Priprema kemikalija i reagensa za analizu

Metoda korištena u analizama je rađena prema Benzie i Strain (1996), uz modifikacije. Za provedbu analize je pripremljen FRAP reagens koji je sadržavao 25 mL 20 mmol L^{-1} željezovog (III) klorida heksahidrata, 25 mL 10 mmol L^{-1} otopine TPTZ-a u 40 mmol L^{-1} otopini HCl-a i 25 mL 300 mmol L^{-1} acetatnog pufera. FRAP reagens je temperiran na 37 ^{O}C. Priređene su i otopine troloxa u metanolu točno poznatih koncentracija (2,397; 1,598; 1,198; 0,799; 0,399 μmol mL^{-1}).

3.6.2. Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

U mikrokivetu je dodano 10 µL uzorka i 1 mL FRAP reagensa te je mikrokiveta začepljena i promućkana. Nakon 4 min reakcije izmjerena je apsorbancija pri 592 nm. Sva mjerenja su provedena u tri paralele, a slijepa proba je sadržavala 10 µL metanola umjesto uzorka tj. ekstrakta.

3.6.3. Postupak izrade baždarnog dijagrama za FRAP metodu

Postupak izrade baždarnog dijagrama je identičan protokolu za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom, ali se razlikuje u tome što se umjesto 10 µL uzorka dodaje 10 µL otopine troloxa poznate koncentracije. Mjerenja su provedena na 5 koncentracijskih razina troloxa u 3 ponavljanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA SUHE TVARI

Rezultati određivanja udjela suhe tvari izraženi su kao srednje vrijednosti udjela suhe tvari za dva paralelna mjerenja istog uzorka i pripadajuće standardne devijacije (tablica 4).

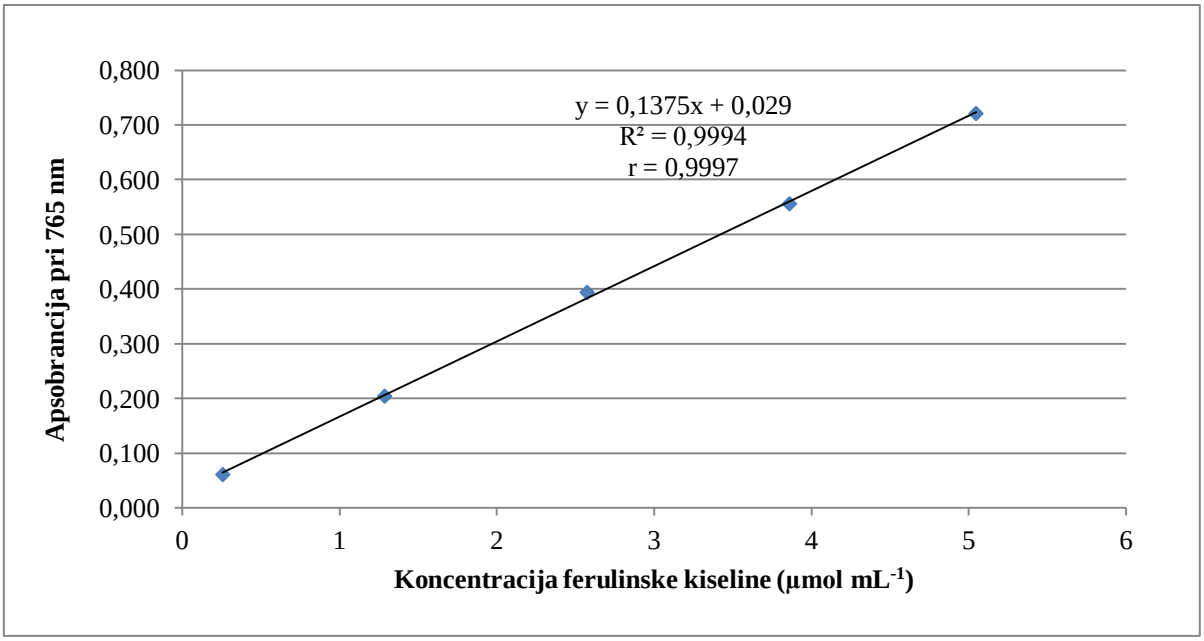
Tablica 4. Rezultati određivanja udjela suhe tvari u uzorcima

Uzorak	Srednja vrijednost ± standardna devijacija (%)
0+G KT	97,20 ± 0,25
LF+G KT	97,44 ± 0,10
LB+G KT	98,72 ± 0,43
0+G KRUH	99,18 ± 0,39
LF+G KRUH	96,62 ± 0,35
LB+G KRUH	98,11 ± 1,56
0+G KORA	98,26 ± 0,16
LF+G KORA	99,27 ± 0,05
LB+G KORA	98,42 ± 0,02

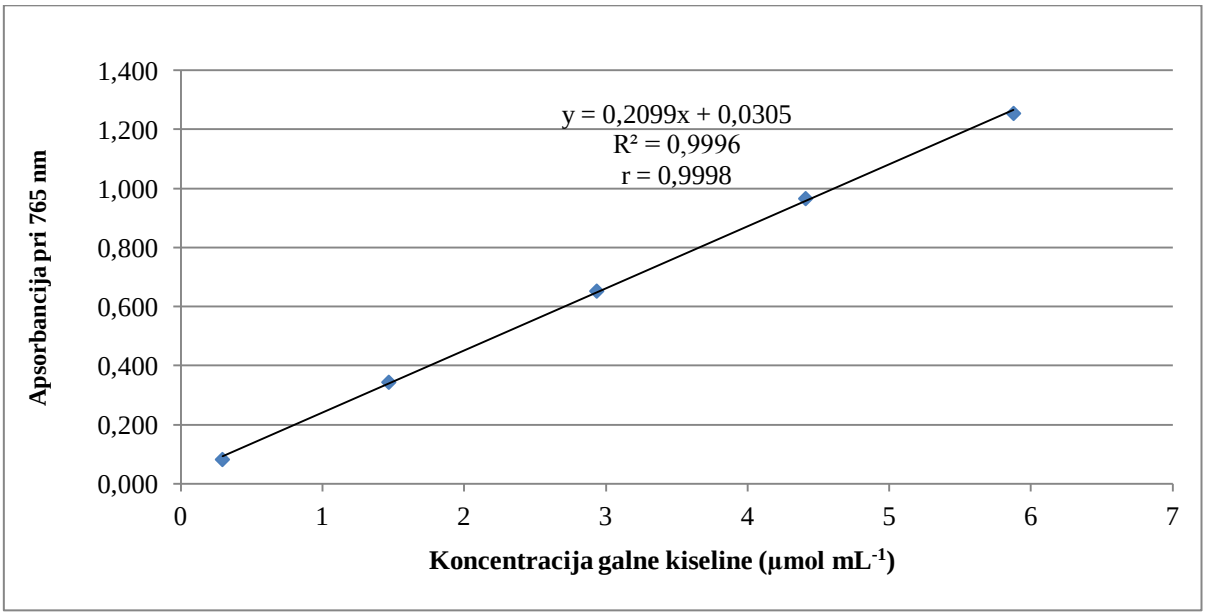
Sukladno očekivanjima, svi uzorci su imali relativno visok udio suhe tvari kao posljedica postupka liofilizacije tijekom pripreme uzoraka za analizu. Dobiveni rezultati su važni zbog kasnijeg izražavanja rezultata metoda, koji su prikazani na masu suhe tvari uzorka.

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA

Za prikazivanje rezultata udjela ukupnih fenolnih spojeva korišten je ekvivalent mase ferulinske i galne kiseline na masu suhe tvari uzorka. Baždarni dijagrami za kvantifikaciju udjela ukupnih fenolnih spojeva u obliku ekvivalenata ferulinske i galne kiseline prikazani su na slikama 9 i 10.



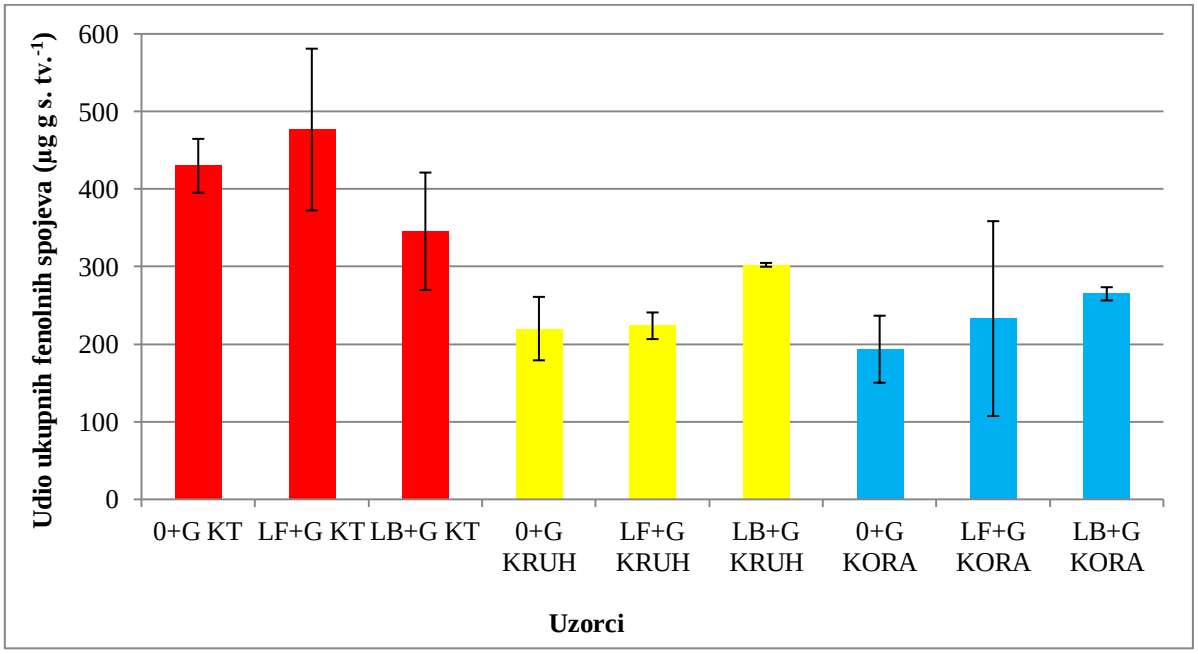
Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji ferulinske kiseline



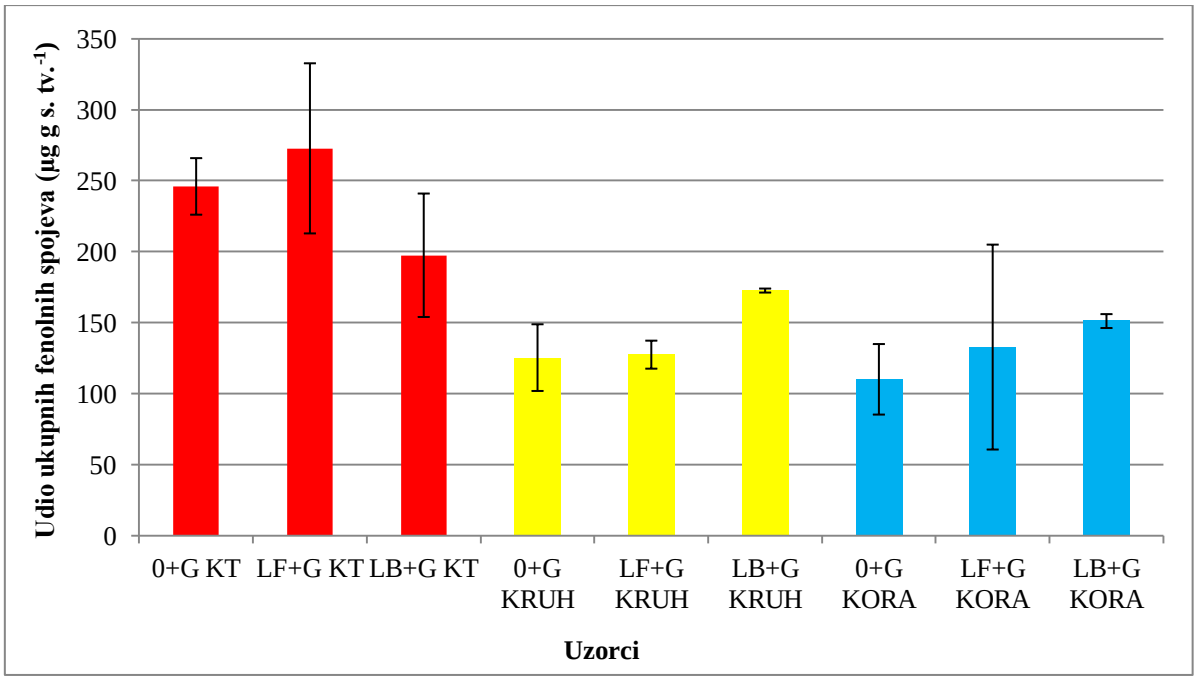
Slika 10. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline

S obzirom da su na slikama prikazani baždarni dijagrami i jednadžbe pravca iz kojih je vidljivo da je koeficijent korelacije ≥ 0,999, može se zaključiti da su baždarni dijagrami linearni.

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima prikazani su na slikama 11 i 12.



Slika 11. Udio ukupnih fenolnih spojeva izražen u obliku ekvivalenata ferulinske kiseline na masu suhe tvari uzorka



Slika 12. Udio ukupnih fenolnih spojeva prikazan u obliku ekvivalenata galne kiseline na masu suhe tvari uzorka

U usporedbi s tijestom bez procesa fermentacije pomoću bakterija mliječne kiseline, vidljivo je da je sadržaj ukupnih fenolnih spojeva izraženih kao ekvivalent mase ferulinske kiseline neznatno povišen za 10,5 % (10,9 % za ekvivalent galne kiseline) u uzorcima kiselog tijesta fermentiranog s *L. fermentum*, dok je kod kiselog tijesta fermentiranog s *L. brevis* došlo do smanjenja sadržaja ukupnih fenolnih spojeva za 19,7 % (identično za ekvivalent galne kiseline). Moguće je da je do toga došlo zbog drugačijeg metabolizma bakterijskih sojeva, tj. zbog mogućeg metaboliziranja fenolnih spojeva od strane *L. brevis* (Curiel i sur., 2010). U navedenom radu je provedena analiza metabolizma različitih vrsta komercijalno dostupnih cimetnih kiselina kod različitih sojeva bakterije mliječne kiseline *L. brevis* izoliranih iz ljudskih fekalija, ustiju i iz procesa malolaktičke fermentacije vina. Korištena je HPLC metoda za analizu sastava fenolnih kiselina i njihovih produkata razgradnje od strane navedenih sojeva bakterija. Sojevi su pokazali metaboličku aktivnost za ferulinsku kiselinu, kofeinsku kiselinu i p-kumarinsku kiselinu. Dekarboksilacija ferulinske kiseline je zabilježena kao slabija od ostalih, ali je i dalje prisutna. Pretpostavlja se da je kod *L. brevis* prisutan gen odgovoran za sintezu dekarboksilacijskog enzima za fenolne kiseline. Nadalje, primjećena je i metabolička aktivnost prema galnoj kiselini te se može zaključiti da određeni sojevi *L. brevis* pokazuju metaboličko djelovanje prema određenim fenolnim spojevima u hrani. Kao krajnji produkti metaboličkog puta galne kiseline određeni su pirogalol i katehol, s obzirom da ih navedeni sojevi *L. brevis* nisu metabolizirali kada su bili prisutni u podlozi. Ti spojevi pokazuju izuzetnu sposobnost antioksidativnog djelovanja, o čemu će se raspraviti kasnije u radu.

U usporedbi s uzorcima kruha bez dodatka kiselog tijesta, kod uzorka kruha proizvedenog s dodatkom tijesta fermentiranog s *L. brevis* došlo je do značajnog povećanja sadržaja ukupnih fenolnih spojeva izraženog kao ekvivalent ferulinske kiseline za 37,4 % (37,7 % za ekvivalent galne kiseline), dok kod uzorka kruha dobivenog s dodatkom tijesta fermentiranog s *L. fermentum* nije došlo do značajne promjene sadržaja ukupnih fenolnih spojeva (porast od 1,7 % za ekvivalent ferulinske kiseline i galne kiseline).

Kod uzoraka kore kruha došlo je do povećanja udjela ukupnih fenolnih spojeva izraženih kao ekvivalent ferulinske kiseline kod oba uzorka s korištenim kulturama bakterija (20,5 % kao ekvivalent ferulinske kiseline i 20,6 % kao ekvivalent galne kiseline za uzorak s *L. fermentum*; te 37 % kao ekvivalent ferulinske kiseline i 37,3 % kao ekvivalent galne kiseline za uzorak s *L. brevis*) u odnosu na koru kruha bez dodatka kiselog tijesta, što predstavlja značajno povećanje.

Kod kore kruha, u odnosu na uzorke kruha, došlo je do povećanja udjela ukupnih fenolnih spojeva izraženih kao ekvivalent ferulinske i to kod uzorka kore kruha gdje su korištene kulture bakterija *L. fermentum* porast od 4,1 % (4,2 % za ekvivalent galne kiseline), a za uzorak s *L. brevis* je uočeno smanjenje udjela od 12,4 % (12,5 % za ekvivalent galne kiseline), dok je kod uzorka kore kruha bez dodatka kiselog tijesta uočen pad od 12,1 % (12,2 % za ekvivalent galne kiseline).

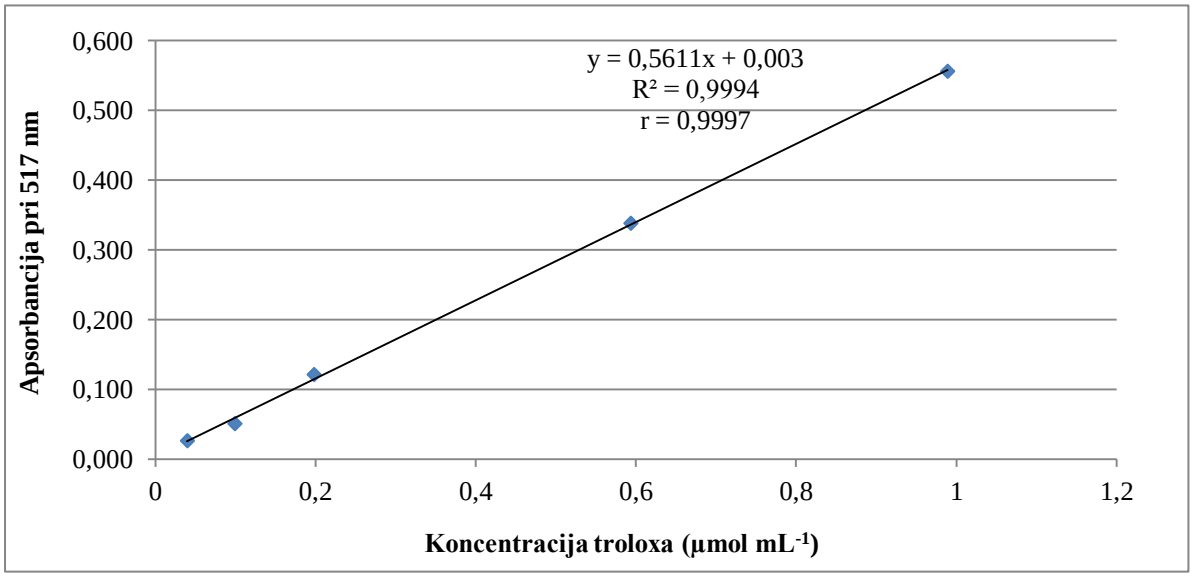
Vidljivo je da je fermentacija tijesta s *L. fermentum* utjecala na povećanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u svim uzorcima, tj. u kiselom tijestu, kruhu i kori kruha, dok je fermentacija tijesta s *L. brevis* rezultirala smanjenjem sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u kiselom tijestu, ali je došlo do povećanja udjela fenolnih spojeva u kruhu i kori kruha u odnosu na kruh bez dodanog kiselog tijesta.

Smanjenje udjela ukupnih slobodnih fenolnih spojeva u kruhu i kori kruha u odnosu na kiselo tijesto izraženo kao ekvivalent ferulinske kiseline (u usporedbi sa sadržajem u kiselom tijestu) utvrđeno je za sve uzorke, i to smanjenje od 48,8 % (49 % za ekvivalent galne kiseline) kod kruha dobivenog iz tijesta bez dodatka kiselog tijesta te smanjenje od 55 % (55,3 % za ekvivalent galne kiseline) u kori istog kruha. Nadalje kod uzoraka kiselog tijesta fermentiranog s *L. fermentum* uočeno je smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva u kruhu za 53,1 % (53,3 % za ekvivalent galne kiseline), a u kori kruha je zabilježeno smanjenje od 51,1 % (51,3 % za ekvivalent galne kiseline). Kod uzoraka kiselog tijesta fermentiranog s *L. brevis* uočeno je smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva u kruhu za 12,5 % (12,6 % za ekvivalent galne kiseline), a u kori kruha je zabilježeno smanjenje od 23,4 % (23,5 % za ekvivalent galne kiseline).

Primjena kisele fermentacije tijesta povećava količinu slobodnih fenolnih spojeva u tijestu, a smanjenje udjela ukupnih fenolnih spojeva u kruhu i kori kruha je najvjerojatnije posljedica degradacije određenih fenolnih spojeva poput fenolne kiseline uslijed utjecaja visokih temperatura kod pečenja tijesta (Han i Koh, 2011). U radu istih autora se navodi korištenje HPLC tehnike za analizu slobodnih fenolnih spojeva iz metanolnih ekstrakta uzoraka, a gubitak slobodnih fenolnih spojeva nakon termičke obrade tijesta je bio manji od 26 %.

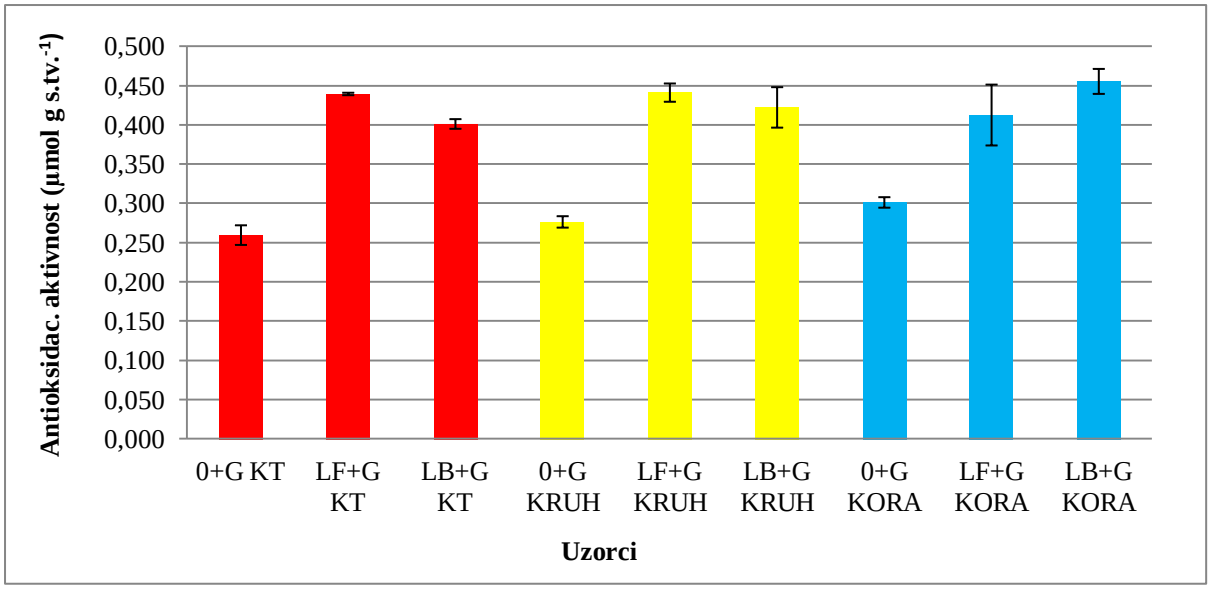
4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Baždarni dijagram za kvantifikaciju antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom je prikazan na slici 13.



Slika 13. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji troloxa

S obzirom da je na slici prikazan baždarni dijagram i jednadžba pravca iz koje je vidljivo da je koeficijent korelacije ≥ 0,999, može se zaključiti da je baždarni dijagram linearan. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom su prikazani na slici 14.



Slika 14. Antioksidacijska aktivnost uzoraka kiselog tijesta, kruha i kore određena DPPH metodom

Iz rezultata je vidljivo da je fermentacija tijesta pomoću kultura bakterija mliječne kiseline imala značajan utjecaj na povećanje antioksidacijske aktivnosti svih uzoraka kiselog tijesta te kruha i kore kruha dobivenih uz dodatak istog tijesta. Rezultati nisu dosljedni očekivanome, a očekivana je dosljednost s rezultatima TPC metode, s obzirom da fenolni spojevi pokazuju antioksidacijsku aktivnost i trebaju biti nositelji antioksidacijske aktivnosti u uzorcima. Moguće objašnjenje je sinteza antioksidativnih spojeva kao krajnjih produkata metabolizma bakterije *L. brevis*, kao što je komentirano u rezultatima određivanja ukupnih fenolnih spojeva (sinteza spojeva poput pirogalola i katehola (Curiel i sur., 2010). Ti spojevi pokazuju određenu antioksidacijsku aktivnost, o čemu je više rečeno u istraživanju Ordoudi i Tsimidou (2006), koji su proveli analizu antioksidacijske aktivnosti određenih fenolnih spojeva. Utvrdili su da pirogalol ima dobru antioksidacijsku aktivnost te da je moguće da je u uzorcima kruha i kore kruha došlo do pada vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva nakon procesiranja kiselog tijesta, a da je istovremeno došlo do povećanja antioksidacijske aktivnosti istih. Također, moguć je utjecaj strukture i međusobne interakcije spojeva s antioksidacijskom aktivnošću, o čemu će biti više riječi u rezultatima i raspravi FRAP metode.

Kod uzoraka kiselog tijesta (u usporedbi s tijestom koje nije fermentirano pomoću bakterija mliječne kiseline), došlo je do porasta antioksidacijske aktivnosti kod oba fermentirana uzorka, i to porast od 68,8 % kod uzorka tijesta fermentiranog s *L. fermentum* te porast od

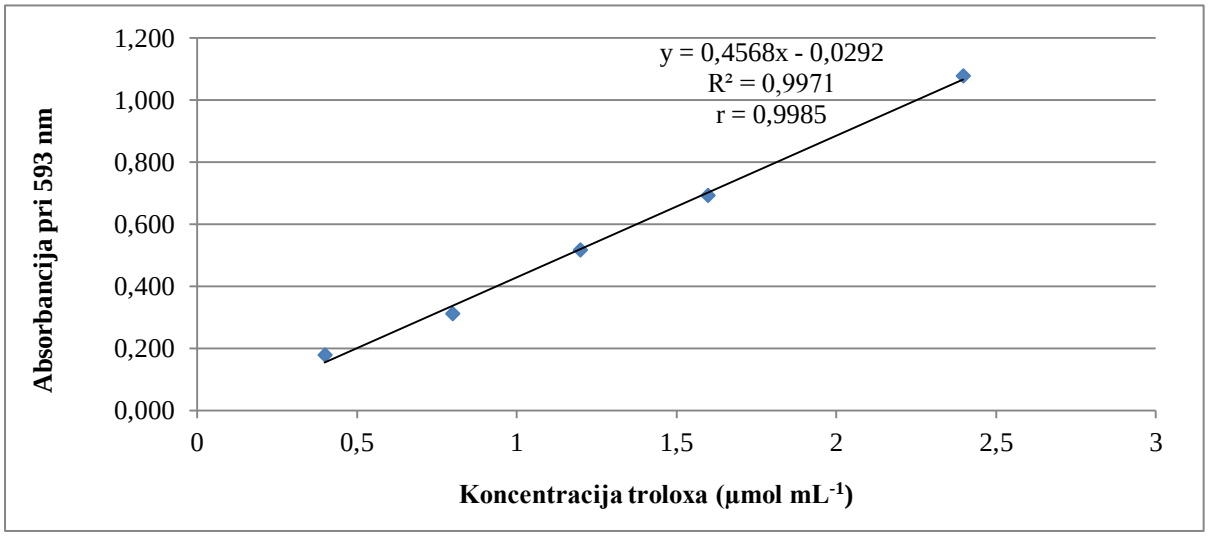
54,2 % kod uzorka tijesta fermentiranog s *L. brevis* što je u skladu s dosadašnjim spoznajama da fermentacijom tijesta bakterijama mliječne kiseline možemo postići povećanje antioksidacijske aktivnosti (Banu i sur., 2010). U navedenom radu je provedena analiza utjecaja fermentacije tijesta različitim bakterijama mliječne kiseline na antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom, a utvrđeno je da određene vrste bakterija mliječne kiseline mogu utjecati na promjenu antioksidacijske aktivnosti kiselog tijesta i kruha dobivenog iz tog tijesta u koje je dodano kiselo tijesto. Zaključeno je da može doći do povećanja antioksidacijske aktivnosti s obzirom da dolazi do povećanja količine fenolnih spojeva koje je lako ekstrahirati.

U usporedbi s uzorcima kruha, antioksidacijska aktivnost kore kruha bez dodatka kiselog tijesta je veća za 9,1 %, dok je kod kore kruha s dodatkom kiselog tijesta fermentiranog s *L. fermentum* antioksidacijska aktivnost manja za 6,3 %, a kod kore kruha s dodatkom kiselog tijesta fermentiranog s *L. brevis* antioksidacijska aktivnost veća za 7,8 %.

Dobiveni rezultati se mogu djelomično objasniti kroz to da pri termičkoj obradi dolazi do proizvodnje melanoidinskih spojeva kao produkata Maillardovih reakcija neenzimskog tamnjenja, a koji iskazuju određenu antioksidacijsku aktivnost (Wijewickreme i Kitts, 1998). Proteini i ugljikohidrati u tijestu mogu postati reaktanti za Maillardove reakcije, a do nastajanja produkata Maillardovih reakcija najbrže dolazi u kori kruha, što je logično s obzirom da je najbliže izložena toplini pri pečenju (Michalska i sur., 2008).

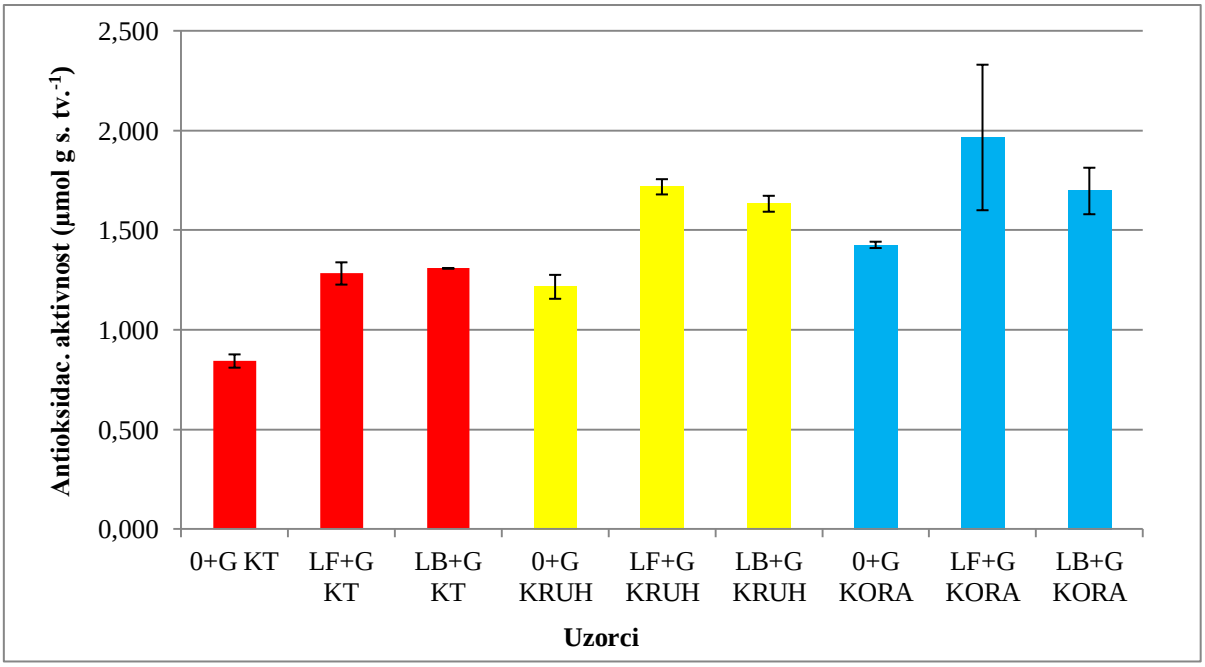
4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Baždarni dijagram za kvantifikaciju antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom je prikazan na slici 15.



Slika 15. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 593 nm o koncentraciji troloxa

S obzirom da je na slici prikazan baždarni dijagram i jednadžba pravca iz koje je vidljivo da je koeficijent korelacije ≥ 0,99, može se zaključiti da je baždarni dijagram linearan. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom su prikazani na slici 16.



Slika 16. Antioksidacijska aktivnost uzoraka kiselog tijesta, kruha i kore određena FRAP metodom

Iz rezultata je vidljivo da su dodatak i fermentacija pomoću kultura bakterija mliječne kiseline u kiselo tijesto imali utjecaj na povećanje antioksidacijske aktivnosti svih uzoraka kiselog tijesta te kruha i kore kruha dobivenih iz takvog tijesta. Kao što je bio slučaj i kod DPPH metode, rezultati nisu u skladu s očekivanim, a očekivana je dosljednost s rezultatima TPC metode, obzirom na to da bi fenolni spojevi trebali biti nositelji antioksidacijske aktivnosti, .

Moguće objašnjenje je isto kao kod metode određivanja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH, a to je sinteza antioksidativnih spojeva kao krajnjih produkata metabolizma bakterije *L. brevis*, kao što je objašnjeno u raspravi rezultata metode DPPH, gdje je zaključeno da na povećanje antioksidacijske aktivnosti mogu utjecati antioksidativni spojevi koje sintetizira *L. brevis*.

Nadalje, važno je uzeti u obzir i da različit omjer između sadržaja ukupnih fenolnih spojeva uzoraka i njihove antioksidacijske aktivnosti može proizlaziti iz toga što metoda određivanja sadržaja ukupnih fenolnih spojeva ne uključuje sve spojeve s antioksidacijskom aktivnošću te što postoji mogućnost sinergističkog djelovanja antioksidansa čija antioksidacijska aktivnost onda ne ovisi o njihovoj koncentraciji, već i o njihovoj strukturi i međusobnoj interakciji (Piluzza i Bullitta, 2011).

Kod uzoraka kiselog tijesta (u usporedbi s tijestom bez fermentacije pomoću bakterija mliječne kiseline), došlo je do porasta antioksidacijske aktivnosti kod oba fermentirana uzorka, i to porast od 52 % kod uzorka tijesta s dodatkom tijesta fermentiranog s *L. fermentum*, te porast od 55,1 % kod uzorka tijesta s korištenom fermentacijom s *L. brevis* što je u skladu s dosadašnjim spoznajama da fermentacijom tijesta bakterijama mliječne kiseline možemo postići povećanje antioksidacijske aktivnosti (Banu i sur., 2010).

U usporedbi s uzorcima kruha, antioksidacijska aktivnost kore kruha dobivenog bez dodatka kiselog tijesta je veća za 17,3 %, dok je kod kore kruha s dodatkom tijesta fermentiranog s *L. fermentum* antioksidacijska aktivnost veća za 14,4 %, a kod kore kruha s dodatkom tijesta fermentiranog s *L. brevis* antioksidacijska aktivnost veća za 3,9 %.

Shodno rezultatima analize antioksidacijske aktivnosti uzoraka DPPH metodom, i ovdje se može zaključiti da su za povećanje antioksidacijske aktivnosti najvjerojatnije odgovorni određeni produkti Maillardovih reakcija, što je najočitije u kori kruha.

Razlike između rezultata metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti se mogu objasniti drugačijim principima na kojima se temelje metode, tj. metoda DPPH uključuje sposobnost vezanja slobodnih radikala od strane antioksidansa, dok FRAP metoda uključuje sposobnost antioksidansa da reducira ion željeza (mjeri redukcijski kapacitet), iako su obje rekacije temeljene na mehanizmu izmjene elektrona (redoks reakcije).

Prema Thaipong i sur. (2006) koji su uspoređivali rezultate različitih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka metanolnog ekstrakta guava voća, utvrđeno je da rezultati između DPPH metode i FRAP metode ne pokazuju značajna odstupanja (u usporedbi s metodama ABTS i ORAC).

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada je bilo provesti analizu udjela ukupnih slobodnih fenolnih spojeva te odrediti antioksidacijsku aktivnost DPPH i FRAP metodom u uzorcima bezglutenskog kiselog tijesta, kruha i kore kruha.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Fermentacijom tijesta pomoću bakterije mliječne kiseline *L. fermentum* povećava se udio fenolnih spojeva u kiselom tijestu.
2. Kruh s dodatkom kiselog tijesta fermentiranog s *L. brevis* imao je povišen udio slobodnih fenolnih spojeva u usporedbi s kruhom bez kiselog tijesta.
3. U usporedbi s korom kruha bez kiselog tijesta, kora kruha s dodatkom kiselog tijesta fermentiranog s *L. fermentum* i *L. brevis* imala je povišen udio slobodnih fenolnih spojeva.
4. Dodatak kiselog tijesta fermentiranog s *L. fermentum* i *L. brevis* pozitivno utječe na antioksidacijsku aktivnost bezglutenskog kiselog tijesta te kruha i kore kruha pripremljenih s njegovim dodatkom.

6. LITERATURA

Anonymous (2017), <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound>. Pristupljeno 07. rujna 2017.

Arendt, E. K., Moroni, A., Zannini, E. (2011) Medical nutrition therapy: use of sourdough lactic acid bacteria as a cell factory for delivering functional biomolecules and food ingredients in gluten free bread. *Microb. Cell Fact.* **10-1** (S15), 1-9.

Arnao, M. B. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol*. **11**, 419–421.

Agboola, S. O., Mofolasayo, O. A., Watts, B. M., Aluko, R. E. (2010) Functional properties of yellow field pea (*Pisum sativum L.*) seed flours and the *in vitro* bioactive properties of their polyphenols. *Food Res. Int.* **43**, 582-588.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.

Banu, I., VasiLean, I., Aprodu, I. (2010) Effect of lactic fermentation on antioxidant capacity of rye sourdough and bread. *Food Sci. Tecnol.* **16-6**, 571-576.

Benzie, I. F., Strain, J. J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method. Enzymol.* ***299***, *15-27.*

Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Method. Enzymol*. **186**, 343–355.

Bors, W., Michel, C., Saran, M. (1994) Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Method. Enzymol*. **234**, 420–429.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev*. **56**, 317–333.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.

Briani, C., Samaroo, D., Alaedini, A. (2008) Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun. Rev*. **7-8**, 644–650.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Bio. Med.* **22**, 749–760.

Capriles, V. D., Martini, L. A., Areas, J. A. G. (2009) Metabolic osteopathy in celiac disease: importance of a gluten-free diet. *Nutr. Rev*. **67-**10, 599–606.

Capriles, V. D., Areas, J. A. (2014) Novel approaches in gluten-free breadmaking: interface between food science, nutrition, and health. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **13**, 871-890.

Casanovas, E. M., Fasciglione, G., Barassi, C. A. (2015) *Azospirillum* spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: Handbook for Azospirillum, (Cassan i sur., ured.), Springer International Publishing Switzerland, str. 447-467.

CDF (2017) Celiac Disease Foundation, <https://celiac.org/celiac-disease/understanding-celiac-disease-2/what-is-celiac-disease/>. Pristupljeno 07. rujna 2017.

Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993) An introduction to free radicals chemistry. *Br. Med. Bull.* **49,** 481-493.

CL (2017) Chemistry Libretexts, <https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/17%3A_Radical_reactions/17.2%3A_Radical_chain_reactions>. Pristupljeno 07. rujna 2017.

Contreras-Guzman, E. S., Strong, F. C. (1982) Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion. *J. Assoc. Of. Ana. Chem*. **65,** 1215–1222.

Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. (2000) Natural products (secondary metabolites). U Biochemistry & molecular biology of plants, (Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.L. ured.), American society of plant physiologists, Beltsville, MD, SAD, str. 1250–1318.

CU (2017) Lactic Acid Bacteria – Homofermentative and Heterofermentative, *Dairy Foods Science Notes*, **10-08.** Stocking Hall, Ithaca, NY

Curiel, J. A., Rodríguez, H., Landete, J. M., De Las Riveas, B., Muńoz, R. (2010) Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chem.* ***120***, 225-229.

De Angelis, M., Rizzello, C. G., Alfonsi, G., Arnault, P., Cappelle, S., Tossut, P., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2007) Use of sourdough lactobacilli and oat fibre to decrease the glycemic index of white wheat bread. *Brit. Jur. Nutr.* **98**, 1196–1205.

De Vuyst, L., Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Fems Microbiol. Rev.* **23**, 153-177.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox. Sign.* ***18-14***, 1818–1892.

Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Ćetković, G. (2002) Antioxidants in food. *Chem. Ind.* **56-3**, 105-112.

Elias, L. G., De Fernandez, D. G., Bressani, R. (1979) Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. *J. Food Sci.* **44-2**, 524-527.

Fasano, A., Catassi, C. (2012) Celiac disease. *N. Engl. J. Med.* **367-25**, 2419–2426.

Gobbetti, M. (1998) The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Tech.* **9**, 267–274.

Gómez, M., Oliete, B., Rosell, C. M., Pando, V., Fernandez, E. (2008) Studies on cake quality made of wheat–chickpea flour blends. *Food Sci.Technol.* **41**, 1701–1709.

Gülçin, İ. (2012) Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch. Toxicol.* **86**, 345-391.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York .

Hammes, W. P., Ganzle, M. G. (1998) Sourdough breads and related products. U: Microbiology of Fermented Foods, (Wood, B. J. B., ured.), Blackie Academic and Professional, London, vol. 1, str. 199–216.

Han, H. M., Koh, B. K. (2011) Antioxidant activity of hard wheat flour, dough and bread prepared using various processes with the addition of different phenolic acids. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 604-608.

Hansen, A., Hansen, B. (1996) Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Z. Lebensm. Unters. For.* **202**, 244–249.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856.

Kagnoff, M. (2005) Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* **128-4-1**, 10–18.

Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiva higijene rada toksikologije* **55,** 279-290.

Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Tech.* **48-4**, 412-422.

Kiš, M. (2012) Utjecaj mliječno-kisele fermentacije na antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost kiselog tijesta, Diplomski rad, PBF.

Li, L., Harflett, C., Beale, M. H., Ward, J. L. (2009) Phenolic acids. U: Analysis of bioactive components in small grain cereals (Shewry, P. R., Ward, J. L., ured.), AACC International Inc, St. Paul, str. 41-52.

Lu, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., Chen, C. (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* **14-4,** 840-860.

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L., Rangel, A. O. (2006) Automatic method for the determination of Folin–Ciocalteu reducing capacity in food products. *J. Agric. Food Chem.* **54,** 5241–5246.

Mathew, S., Abraham, T. E., Zakaria, Z. A. (2015) Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *J. Food Sci. Technol.* **52-9**, 5790-5798.

Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H., Del Castillo, D. (2008) Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *J. Cereal Sci.* **48**, 123-132.

Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. K. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* **130**, 1036–1043.

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

Mugula, J. K., Nnko, S. A. M., Narvhus, J. A., Sorhaug, T. (2003) Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 187-199.

Nionelli, L., Rizzello, C. G. (2016) Sourdough-based biotechnologies for the production of gluten-free foods. *Foods* **5-65**, 1-14.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A Comparative Study. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 3122-3128.

Penić, J. (2010) Aktivno kiselo tijesto – za jedinstvene i visokokvalitetne pekarske proizvode. *Novi pekar*, 12-15.

Piluzza, G., Bullitta, S. (2011) Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm. Biol.* **49-3**, 240-247.

Prakash, A. (2001) Antioxidant activity. *Med. Lab. Anal. Prog.* **19-2,** 1–6.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 4290−4302.

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 Radic. Res.* **22**, 375-383.

Riley, P. A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **65-1**, 27-33.

Robards, K., Antolovich, M. (1997) Analytical chemistry of fruit bioflavonoids a review. *Analyst* **122**, 11R–34R.

Sigma-Aldrich (2017) Trolox, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813 ?lang=en&region=HR>. Pristupljeno 07. rujna 2017.

Sigma-Aldrich (2017) TPTZ, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1253 ?lang=en&region=HR>. Pristupljeno 07. rujna 2017.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*. **16**, 144–158.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol*. **299**, 152–178.

Strobel, S., Busuttil, A., Ferguson, A. (1983) Human intestinal mucosal mast cells: expanded population in untreated coeliac disease. *Gut* **24**, 222-227.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food. Compos. Anal.* **19**, 669-675.

Wang, N., Daun, J. K., Malcolmson, L. (2003) Relationship between physicochemical and cooking properties, and effects of cooking on antinutrients, of yellow field peas (Pisum sativum). *J. Sci. Food Agr.* **83**, 1228–1237.

Wijewickreme, A. N., Kitts, D. D. (1998) Oxidative reactions of model Maillard reaction products and α-tocopherol in a flour-lipid mixture. *J. Food. Sci.* **63-3**, 466-471.

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou Y., Zheng, J., Zhang, J. J., Li, H. B. (2017) Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int. J. Mol. Sci.* **18-1**, 96-101.

Yu, L., Perret, J., Davy, B., Wilson, J., Melby, C. L. (2002) Antioxidant properties of cereal products. *J. Food. Sci.* **67-7**, 2600-2603.