

# Određivanje kemijskog sastava bezglutenskog kruha povećane nutritivne vrijednosti

---

**Turk, Martina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*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:159:967986>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Martina Turk**

6481/PT

**ODREĐIVANJE KEMIJSKOG SASTAVA BEZGLUTENSKOG KRUHA**  
**POVEĆANE NUTRITIVNE VRIJEDNOSTI**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Modul:** Analitika prehrambenih proizvoda

**Mentor:** Doc. dr. sc. Marina Krpan

Zagreb, 2016.

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

## ODREĐIVANJE KEMIJSKOG SASTAVA BEZGLUTENSKOG KRUHA POVEĆANE NUTRITIVNE VRIJEDNOSTI

*Martina Turk 6481/PT*

### **Sažetak:**

Potražnja za bezglutenskim proizvodima danas kontinuirano raste radi porasta broja osoba oboljelih od celijakije. Bezglutenski kruh prisutan na tržištu je uglavnom loše kvalitete i ima malu nutritivnu vrijednost. Cilj ovog rada je bio odrediti kemijski sastav, tj. udio vlage, pepela, proteina, masti i šećera u bezglutenskim kruhovima s i bez dodatka brašna žutog graška. Korištene su standardne metode za određivanje pojedinih sastojaka. Rezultati su pokazali da bezglutenski kruh s dodatkom brašna žutog graška sadrži veći udio proteina i mineralnih tvari, a manji udio šećera u odnosu na kruh bez njegovog dodatka. Upotreba tog istog brašna nije uzrokovala značajnu razliku u udjelu masti i vode među analiziranim kruhovima. Dodatak brašna žutog graška povećava prehrambenu vrijednost i poboljšava nutritivni sastav bezglutenskog kruha.

**Ključne riječi:** bezglutenski kruh, brašno žutog graška, celijakija

**Rad sadrži:** 29 stranica, 1 sliku, 7 tablica, 47 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je tiskanom i u elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Doc. dr. sc. Marina Krpan*

**Pomoć pri izradi:** *Saša Ajredini, mag.ing.*

**Rad predan:** srpanj, 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

### THE DETERMINATION OF CHEMICAL STRUCTURE OF GLUTEN-FREE BREAD WITH INCREASED NUTRITIONAL VALUE

*Martina Turk 6481/PT*

**Abstract:**

The demand of gluten-free products is continuously growing due to the increase of the number of people suffering from celiac disease. Gluten-free bread available on the market is usually of poor quality and has low nutritional value. The aim of this paper was to determine chemical structure ie. the amount of moisture, ash, protein, fat and sugar in gluten-free bread with and without yellow pea flour. Standard methods were used to determine individual components. The result showed that gluten-free bread with yellow pea flour added contained higher amount of protein and mineral substances and lower amount of sugar in relation to the bread without added flour. The usage of that certain flour did not cause significant difference in the amount of fat and water among the analysed breads. The supplement of yellow pea flour increases nutritional value and upgrades the nutritional components of gluten-free bread.

**Keywords:** celiac disease, gluten-free bread, yellow pea flour

**Thesis contains:** 29 pages, 1 figure, 7 tables, 47 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Ph.D. Marina Krpan*

**Technical support and assistance:** *Saša Ajredini, BSc*

**Thesis delivered:** July 2016

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Celijakija.....	2
2.2. Svojstva bezglutenskog kruha.....	3
2.3. Sirovine za proizvodnju bezglutenskog kruha i njihova svojstva.....	4
2.3.1. Rižino integralno brašno.....	4
2.3.2. Proseno integralno brašno.....	5
2.3.3. Kukuruz i kukuruzni ekstrudat.....	5
2.3.4. Škrob.....	6
2.3.5. Hidrokolidi.....	6
2.4. Mahunarke- žuti grašak.....	6
2.4.1. Brašno žutog graška.....	7
2.5. Novi trendovi u proizvodnji bezglutenskih kruhova.....	7
2.5.1. Primjena kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskog kruha.....	8
2.6. Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane.....	9
2.6.1. Određivanje udjela vode.....	9
2.6.2. Određivanje udjela pepela i mineralnih tvari.....	9
2.6.3. Određivanje udjela proteina.....	9
2.6.4. Određivanje udjela ugljikohidrata.....	9
2.6.5. Određivanje udjela masti i ulja.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Materijali.....	11
3.2. Metode rada.....	11
3.2.1. Priprema uzorka bezglutenskog kruha za analizu.....	11
3.2.2. Određivanje udjela vlage u kruhu.....	12
3.2.3. Određivanje udjela pepela u sirovinama i kruhu.....	13
3.2.4. Određivanje udjela proteina.....	13
3.2.5. Određivanje udjela masti.....	15
3.2.6. Određivanje udjela šećera volumetrijski po Luff-Schoorl-u.....	16
4. REZULTATI.....	20
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČAK.....	25
7. LITERATURA.....	26

## 1. UVOD

Kruh je stalno prisutna namirnica u prehrani gotovo svih društava već tisućama godina. Svaki korak u njegovoj proizvodnji, od pažljivog izbora sirovina do pripreme i obrade tijesta te procesa pečenja, predstavlja dio umjetnosti koja u konačnici osigurava neograničeno bogatstvo boje, okusa i arome dobivenog proizvoda. Ipak, ne mogu sve osobe bez posljedica uživati u njegovim blagodatima. Prvenstveno se to odnosi na osobe koje boluju od celijakije, genetski predisponirane, kronične upalne bolesti tankog crijeva uzrokovane preosjetljivošću na gluten odnosno na prolamine pšenice, ječma, raži i zobi. Takve osobe biraju bezglutenske proizvode koji ne sadrže gluten, glavni protein koji je odgovoran za elastične karakteristike i poroznost tijesta i koji doprinosi volumenu i strukturi pečenog proizvoda. Ti bezglutenski pekarski proizvodi su lošije tehnološke kvalitete koja se nastoji poboljšati upotrebom različitih vrsta hidokoloida, poput guar gume i hidroksipropilmetilceluloze, tvari koje imitiraju visko-elastična svojstva glutena povećavajući viskoznost tijesta, a pritom i volumen samog proizvoda. S druge strane, sami bezglutenski proizvodi su i nutritivno vrlo siromašni pa je poželjno miješati ili koristiti različite vrste brašna koja su bogata vlaknima, mineralnim tvarima i proteinima.

Brašno žutog graška sadrži visok udio proteina, mineralnih tvari i prehrambenih vlakana. Cilj ovog rada je bio odrediti kemijski sastav, tj. udio vlage, pepela, proteina, masti i šećera u bezglutenskim kruhovima s i bez dodatka brašna žutog graška. Pretpostavka je bila da će bezglutenski kruh s dodatkom brašna graška sadržavati visoki udio proteina i mineralnih tvari, a niži udio šećera, u odnosu na kruh bez tog brašna graška, upravo zbog dobrog nutritivnog sastava samog brašna žutog graška.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Celijakija

Celijakija ili glutenska enteropatija jedna je od najčešćih kroničnih gastroenteroloških autoimunih bolesti koja pogađa genetski podložne pojedince. To je bolest probavnog sustava kod koje dolazi do oštećenja crijevnih resica koje su smještene na sluznici tankog crijeva i ometanja u apsorpciji nutrijenta iz hrane, a uzokovana je preosjetljivošću na gluten odnosno na prolamine: u pšenici glijadin, u raži sekalin, u ječmu hordein i u zobi avenin. Gluten je trivijalni naziv prvenstveno za dvije proteinske frakcije pšenice: glijadin iz skupine prolamina i glutenin iz skupine glutelina. Njegove male količine mogu biti opasne za oboljele pa je potrebna iznimna aktivna briga i edukacija kako bi se prepoznali svi vidljivi i skriveni izvori glutena. Može biti prisutan u različitim prehrambenim proizvodima kao temeljni sastojak ili se može dodati u hranu tijekom njezinog procesiranja. Skriveni izvori glutena su aditivi, konzervansi i različiti stabilizatori koji se nalaze u prerađenoj hrani, lijekovima i drugim proizvodima (Farrell i Kelly, 2002).

Celijakija se obično javlja kod dojenčadi, između šestog i osamnaestog mjeseca života, u vrijeme kad ono uz majčino mlijeko, počinje uzimati i drugu hranu, ali se može pojaviti i u odrasloj dobi. Simptomi celijakije mogu biti različiti te se razlikuju od oboljelog do oboljeloga pojedinca, a uključuju nadimanje i bol u trbuhu, kroničnu dijareju, gubitak tjelesne mase, plinove, svijetlu stolicu, umor, usporen rast (posebice izraženo kod djece), bolove u kostima i zglobovima, grčeve mišića, napadaje, trnce u rukama i nogama, afte, kožni osip, promjene boje zubi i oštećenje zubne cakline itd. (Zarkadas i sur., 2006).

Jedini lijek za oboljele od celijakije je bezglutenska dijeta koje se moraju pridržavati cijeli život. To znači da iz prehrane trebaju izbaciti sve namirnice koje u sebi sadrže žitarice: pšenicu, raž, ječam i zob. Celijakija je neizlječiva bolest, čiji se simptomi mogu povući samo uz dosljedno provođenje bezglutenske dijeta (Caruso i sur., 2013). Oboljelima je dozvoljena konzumacija hrane koja prirodno ne sadrži gluten i posebna bezglutenska hrana koja je prvenstveno namijenjena ovoj populaciji.

Pravilnikom o hrani bez glutena (NN 83/10) propisuje se sastav i označavanje hrane bez glutena, namijenjene osobama intolerantnim na gluten. U članku 3. ovog Pravilnika, između ostalog, govori se i o navođenju količine glutena na samim proizvodima, a ti navodi glase:

- vrlo mali sadržaj glutena - količina glutena ne smije biti veća od 100 mg/kg izraženo na gotov proizvod
- bez glutena - količina glutena ne smije biti veća od 20 mg/kg izraženo na gotov proizvod

Same žitarice, odnosno proizvodi od žitarica služe kao glavni izvor vlakana, biljnih proteina, mineralnih tvari i vitamina, no kod bezglutenskih kruhova navedeni nutrijenti su uglavnom prisutni u malim količinama. Kod kasno dijagnosticirane ili neliječene celijakije, oštećenja na sluznici tankog crijeva mogu dovesti do smanjene apsorpcije vitamina i mineralnih tvari (Kelly, 2010). Osobe koje boluju od celijakije prvenstveno moraju izbjegavati hranu koja sadržava pšenicu, raž, ječam i zob, a upravo te namirnice bogate su vitaminima B skupine, željezom i drugim mineralnim tvarima koji su nužni za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Oboljeli od celijakije su često intolerantni i na laktozu pa izbjegavaju mliječne proizvode koji su bogati kalcijem i vitaminom D, što dovodi do smanjenog unosa tih istih vitamina i mineralnih tvari. Zbog toga je za celijakičare pravilan izbor namirnica i pravilo uravnotežena prehrana od posebnog značaja (Murray, 1999).

Bezglutenski proizvodi se mogu prepoznati po karakterističnom zaštitnom znaku prekriženog klasja pšenice na pakiranju, što garantira da su ti proizvodi zaista bez glutena (Slika 1.).



Slika 1. Oznaka za bezglutenski proizvod (Anonymous 1)

## 2.2. Svojstva bezglutenskog kruha

Kruh je od pamtivijeka neizostavni dio ljudske prehrane i kulture. Zbog porasta broja oboljelih od celijakije povećava se i potražnja za bezglutenskim proizvodima na tržištu. Za celijakičare, osobe koje ne smiju unositi gluten u svoj organizam, od posebnog je značaja da se pronađu proizvodi koji bi predstavljali adekvatnu zamjenu za one pekarske proizvode koji sadrže gluten. Upravo zbog razloga se upotrebljavaju škrob, hidrokoloidi te razne druge



kombinacije kako bi se postigla struktura, okus i ostale karakteristike što sličnije proizvodima koji sadrže gluten.

Gluten je protein koji je prvenstveno odgovoran za elastične karakteristike tijesta, određuje njegova svojstva, omogućava tvorbu i poroznost tijesta te doprinosi volumenu i strukturi pečenog proizvoda. Prilikom miješanja tijesta s vodom, gluten veže vodu, bubri i stvara tzv. glutensku mrežu. Stvorena mreža je rastezljiva, elastična, ali i žilava i u stanju je zadržavati plinove koji nastaju tijekom fermentacije (Klarić, 2010).

S druge strane, žitarice koje ne sadrže gluten, daju tijesto koje je polutekuće konzistencije i ne može zadržati plinove nastale fermentacijom pa je nastali kruh zbijene i mrvljive strukture, nepoželjne boje i okusa i s ostalim kvalitetnim nedostacima (Arendt i sur., 2002). Iz tog razloga je proizvodnja bezglutenskog kruha poprilično zahtjevna. Tijesto je prema viskoznosti sličnije tijestu za biskvit zbog nedostatka glutenske mreže (Cauvain, 1998). Zadržavanje plina u tijestu je teže pa se preporuča upotreba hidrokoloida i škroba za stabilizaciju razvijenih mjehurića plina, a samim time i zadržavanja volumena nastalog fermentacijom u procesu pečenja (Hart i sur., 1970).

Kod proizvodnje bezglutenskih proizvoda, kao zamjenski sastojci za pšenično brašno, najčešće se koriste različiti hidrokoloidi, enzimi, škrob, brašna iz žitarica koje ne sadrže gluten (proso, kukuruz, riža, sijerak) ili pseudožitarica (kvinoja, heljda), izvori proteina (proteini bjelanjaka, mliječni proteini). Kako bezglutenski kruh ima malu nutritivnu vrijednost, poželjno je miješati ili koristiti različite vrste brašna bogatih vlaknima, mineralnim tvarima, vitamina i proteinima, kako bi se ona poboljšala.

## **2.3. Sirovine za proizvodnju bezglutenskog kruha i njihova svojstva**

### **2.3.1. Rižino integralno brašno**

Rižino integralno (cjelovito) brašno se dobiva mljevenjem cjelovitog zrna riže pri čemu sadrži sve njegove dijelove te zbog toga ima veću prehrambenu vrijednost od bijele riže i vrlo je povoljno za ljudsku prehranu. Bogato je proteinima, vitaminima (osobito B skupine iz posija i vitamina E iz klice), mineralnim tvarima i prehrambenim vlaknima. Zbog dobre probavljivosti i hipoalergenih svojstava rižino brašno se vrlo često koristi u proizvodnji bezglutenskih kruhova (Neumann i Bruemmer, 1997). Riža sadrži manje proteina od ostalih žitarica. Aminokiselinski sastav proteina riže je dobar, posebno zbog toga što sadrži 3,5% lizina na ukupnu količinu proteina. Proteini riže su netopljivi u vodi i nesposobni tvoriti viskozno tijesto potrebno da zadrži stvorene mjehuriće CO<sub>2</sub> tijekom fermentacije. U rižinom

brašnu glavna proteinska frakcija je glutelin (orizenin) kojeg ima 80%, dok prolamina ima 3-5% (Ćurić, 1997). Mali udjel prolamina u brašnu uzrokuje nepovoljno stvaranje proteinske mreže pri čemu se stvoreni CO<sub>2</sub> ne može zadržati u tijestu pa je volumen kruha mali, a njegova sredina zbijena (Neumann i Bruemmer, 1997).

### **2.3.2. Proseno integralno brašno**

Proso je žitarica okruglog oblika, kompaktnog zrna, najčešće žute boje. Ne sadrži gluten te je lako probavljiv. Bogat je mineralnim tvarima, posebno željezom, fosforom i magnezijem te je odličan izvor proteina. Proseno integralno brašno dobiva se mljevenjem cijelog zrna prosa te je izuzetno bogato vlaknima (topljiva vlakna) i to čak do 20%. Udjel škroba varira od 62% do 68% sa 17% amiloze (Yanez i sur., 1991). Proseno brašno je slatkog okusa pa se može miješati s brašnima jače arome za balansiranje okusa proizvoda.

### **2.3.3. Kukuruz i kukuruzni ekstrudat**

Kukuruz je jednogodišnja biljka podrijetlom iz srednje Amerike, a prema zasijanim površinama je treća svjetska kultura. Zrno kukuruza se sastoji od ovojnice, endosperma i klice te sadrži 70% do 75% ugljikohidrata, oko 10% bjelančevina, oko 5% ulja, oko 15% mineralnih tvari, oko 2,5% celuloze. Bjelančevine kukuruza biološki su manje vrijedne jer im nedostaju potrebne esencijalne aminokiseline (Gagro, 1997). Kukuruzni proteini sadrže velike količine glutaminske kiseline i leucina (Ćurić, 1997). Kukuruz obiluje prehrambenim vlaknima koja snižavaju povišenu razinu kolesterola u krvi, folnom kiselinom što čuva krvožilni sustav, vitaminom B1 tj. tiaminom, važnim za dobar rad mozga te ugljikohidratima koji nam brzo daju raspoloživu energiju (Ugarčić-Hardi, 2001).

Kukuruzni ekstrudat dobiven je postupkom ekstruzije kod koje je kukuruzna krupica podvrgnuta raznim tehnološkim operacijama, pri čemu su proteini i škrob pod utjecajem tlaka, smicanja i visoke temperature postali lakše probavljivi te kao takvi prihvatljiviji za potrošača. Osim toga, procesom ekstruzije ne dolazi do značajnih degradacija unutar namirnice, što omogućuje očuvanje prehrambene vrijednosti proizvoda i smanjuje gubitka korisnih sastojaka hrane (Camire i sur., 1990).

#### **2.3.4. Škrob**

U proizvodnji pekarskih proizvoda, škrob doprinosi teksturi, izgledu i općoj prihvatljivosti proizvoda na bazi žitarica (Ward i Andon, 2002). Škrob je zapravo složeni ugljikohidrat koji se nalazi u sjemenkama žitarica, korijenu, gomoljima te drugim pričuvnim organima biljaka. Građen je od amiloze i amilopektina te dolazi u obliku škrobnih granula. Podvrgavanjem tijesta pečenju, dolazi do želatinizacije škroba pri čemu granule škroba vežu vodu u većoj količini, bubre i pucaju pri čemu iz njih izlaze ravnolančane molekule amiloze te se razgranati amilopektini međusobno prožimaju i tvore sredinu proizvoda. Na taj način želatinizacija utječe na volumen tijesta i u konačnici na volumen i teksturu sredine kruha. Zbog tekuće konzistencije bezglutenskih tijesta, škrob će imati povoljan utjecaj na takvu formulaciju zbog tvorbe čvrstog gela koji doprinosi boljoj konzistenciji tijesta (Gallagher E., 2009).

#### **2.3.5. Hidrokoloidi**

Hidrokoloidi su polisaharidi velike molekularne mase izolirani iz biljaka i morskih trava ili proizvedeni biotehnološkim postupkom. Već u malim koncentracijama imaju sposobnost utjecati na reologiju i glatkoću proizvoda, stabilizirajući emulzije, suspenzije i pjene. Također utječu na želatinizaciju škroba i povećavaju kvalitetu proizvoda općenito. Osim što se koriste kao zamjena za gluten u formulaciji bezglutenskih kruhova, služe i kao izvor vlakana i zamjena za masti (Rosell i sur., 2001). Njihova glavna karakteristika je razgranatost njihovih lanaca koji imaju sposobnost vezanja velike količine vode, dok međusobnom interakcijom osiguravaju da i vrlo razrjeđene otopine postanu viskozne. Primjena hidrokoloida kod proizvodnje bezglutenskih kruhova je posebno značajna budući da oni u određenoj mjeri imaju sposobnost imitirati viskoelastična svojstva glutena. Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), karboksimetilceluloza (CMC), guar guma, karagenan, ksantan i glukan najčešći su korišteni hidrokoloidi u bezglutenskom kruhu koji povećavaju viskoznost tijesta te tako doprinose zadržavanju razvijenih plinova. Isto tako, oni produžuju trajnost i pozitivno utječu na sveukupnu strukturu i teksturu kruha (Anton i Artfield, 2008).

#### **2.4. Mahunarke - žuti grašak**

Žuti grašak (lat. *Pisum sativum*) je jednogodišnja biljka iz porodice mahunarki, a kao povrtlarska kultura pripada zrnatim mahunarkama.

Nakon žitarica, mahunarke su druga najzastupljenija poljoprivredna kultura na svijetu. To su zapravo jestive sjemenke koje rastu u mahunama i obuhvaćaju širok raspon veličina, oblika i boja. Kao dobar izvor proteina, ugljikohidrata, u vodi topljivih vitamina (posebno vitamina B i C) i mineralnih tvari (kalcij, željezo), mahunarke daju veliki doprinos ljudskoj prehrani (Sreerama i sur., 2012). Žuti grašak ima visok sadržaj proteina zahvaljujući kvržicama u korijenu u kojima se nalaze bakterije (*Bacterium radicum*) koje vežu dušik iz zraka i pretvaraju ga u vrijedne aminokiseline, a potom u proteine. Nadalje, proteini mahunarke bogati su lizinom, a siromašni aminokiselina koje sadrže sumpor, dok je kod žitarica obrnuti slučaj. Zbog toga, kombinacija žitarica i proteina mahunarki osigurava bolji odnos esencijalnih aminokiselina koji je vrlo važan za uravnoteženu prehranu (De la Hera i sur., 2012.; Kadam i sur., 2012). Isto tako, mahunarke sadrže i neke nenutritivne prehrambene spojeve, poput rafinoze, kondenziranih tanina i alkaloida. Većina tih spojeva je termolabilna, tako da se upotrebom toplinskih tretmana mogu ukloniti njihovi negativni učinci (Mazquiz i sur., 2012). Česta konzumacija mahunarki smatra se učinkovitim sredstvom za smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, nekih vrsta raka, prekomjerne tjelesne mase i pretilosti (Han i sur., 2010).

Sve te povoljne karakteristike navele su tehnologe da predlože brašna mahunarki kao alternativu za proizvodnju bezglutenskih proizvoda.

#### **2.4.1. Brašno žutog graška**

Brašno žutog graška je cjelovito brašno koje može zamijeniti pšenično brašno zbog svog dobrog kemijskog i nutritivnog sastava. Ima niski glikemijski indeks te je posebno pogodno za dijabetičare. Prema istraživanju koje su proveli Kohajdová i sur. (2013), u kojem su između ostalog odredili i kemijski sastav brašna graška, vidljivo je da brašno graška sadrži visok udjel proteina. Isto tako ono je odličan izvor prehrambenih vlakana i mineralnih tvari poput željeza. Ne sadrži gluten te je zbog toga poželjan u prehrani osoba koje boluju od celijakije. Može se koristiti u izradi keksa, tjestenine, ali isto tako i u pripremi kruha i peciva.

#### **2.5. Novi trendovi u proizvodnji bezglutenskih kruhova**

Porast broja oboljelih od celijakije i loša kvaliteta bezglutenskih proizvoda navela je istraživače da istraže nove sastojke koji bi oponašali svojstva glutena i poboljšali kvalitetu samih proizvoda. U proizvodnji bezglutenskih proizvoda, osim sirovina navedenih u poglavlju 2.3. ovoga rada, koriste se još brojne druge, poput heljedinog brašna, brašna

amaranta i kvinoje, sojinog brašna i proteina, itd.. Dodatak heljdinog brašna kod proizvodnje bezglutenskih kruhova je obećavajući jer je heljda bogata polisaharidima, proteinima, prehranbenim vlaknima, lipidima i vitaminima B skupine (Christa i Soral-Smietana, 2008). Heljda je lako probavljiva i ne podiže naglo razinu glukoze u krvi, tj. rezultira nižim glikemijskim indeksom zbog manje topljivog i otpornijeg škroba. Posjeduje visoku antioksidativnu aktivnost zbog visokog sadržaja rutina (Angioloni i Collar, 2011).

Zrno amaranta je izvrstan izvor kvalitetnih proteina i lipida, s većim sadržajem mineralnih tvari (kalcija, magnezija, fosfora) i prehranbenih vlakana u odnosu na žitarice (Whittaker i Ologunde, 1990). Nutritivna svojstva navedene pseudožitarice i povoljan glikemijski indeks predstavljaju potencijal za poboljšanje kvalitete bezglutenskih proizvoda (Schoenlechner i sur., 2010).

Sojino brašno ima lagano slatkast okus, bogato je kvalitetnim proteinima i izvrstan je izvor željeza, kalcija i vitamina. Samo brašno je fine teksture, ne sadrži gluten i najčešće se koristi kao dodatak drugim brašnima u pripremi tijesta dajući mu bolji okus i povećavajući hranjivu vrijednost (Ribotta i sur., 2004).

### **2.5.1. Primjena kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskog kruha**

U novije vrijeme se u proizvodnji bezglutenskog kruha počelo koristiti kiselo tijesto zbog brojnih zdravstvenih prednosti za potrošače i pozitivnog djelovanja na kvalitetu kruha. Kiselo tijesto se dobiva dugom fermentacijom smjese brašna i vode uz prisutnost prirodnih ili dodanih mikroorganizama (bakterije mliječno-kiselog vrenja, kvasci), koji se nalaze u aktiviranom stanju ili ih je moguće reaktivirati. Primjena kiselog tijesta u proizvodnji bezglutenskih proizvoda ima mnoge pozitivne učinke na njihovu kvalitetu. Direktno utječe na poboljšanje teksture, povećanje volumena, nastanak prekursora aromatskih tvari, povećanje nutritivne vrijednosti, poboljšanje očuvanja svježine i produženje trajnosti. Istraživanja su pokazala da prevelik udio kiselog tijesta može znatno smanjiti volumen i negativno utjecati ne samo na teksturu, već i na senzorska svojstva kruha. Zbog toga se ono dodaje u umjerenoj količini oko 20%. Nadalje, fermentacijom kiselog tijesta se eventualno gluten prisutan radi kontaminacije može hidrolizirati i na taj način umanjiti toksičnost proizvoda za oboljele od celijakije (Novotni D., 2015).

## **2.6. Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane**

### **2.6.1. Određivanje udjela vode**

Voda je prisutna u namirnicama od 0,05 do 97%, kao vezana ili slobodna voda, a utječe na prehrambene, fizikalne i kemijske osobine namirnica. S obzirom na način određivanja vode, postupci se mogu podijeliti na fizikalne i kemijske. Fizikalni postupci se dijele na indirektne (određivanje vode sušenjem, refraktometrom, na principu električne vodljivosti, na principu dielektrične konstantne) i direktne (određivanje vode azeotropnom destilacijom). U kemijske postupke spada određivanje vode plinskim metodama i Karl-Fisherovim postupkom (Vahčić i sur., 2008).

### **2.6.2. Određivanje udjela pepela i mineralnih tvari**

Svaka namirnica biljnog ili životinjskog podrijetla sadrži mineralne tvari, već i u neprerađenom obliku. Ukupni mineralni ostatak neke namirnice može se odrediti kao udjel pepela koji je zapravo anorganski dio preostao nakon što je spaljena sva organska tvar. Usitnjeni uzorak se najprije karbonizira na plameniku, a zatim mineralizira u mufolnoj peći do postizanja jednolično svijetlo sivog pepela ili do konstantne mase pepela (Vahčić i sur., 2008).

### **2.6.3. Određivanje udjela proteina**

Proteini čine veliku skupinu strukturno vrlo složenih spojeva. Njihov udjel u namirnicama najčešće se određuje indirektno iz udjela dušika i to pomoću Dumasovog postupka, Will-Varrenteoppovg, Meulen-Heslingovog ili Kjeldahlovog postupka. Isto tako proteini se često određuju i raznim bojenim i taložnim reakcijama od kojih su najčešće korištene biuret i ksantoproteinska reakcija, primjena azo bojila, Sørensenova formolna titracija i elektroforeza. Najčešće se primjenjuje Kjeldahlov postupak kojim se određuje ukupni dušik prisutan u –NH skupinama u hrani. Udjel dušika se zatim preračunava u udjel proteina množenjem postotka dušika s odgovarajućim faktorom pretvorbe F (100/x) pri čemu je x postotak dušika u proteinima određene namirnice (Vahčić i sur., 2008).

### **2.6.4. Određivanje udjela ugljikohidrata**

Ugljikohidrati čine skupinu prirodnih tvari koje nalazimo prisutne u biljnom ili životinjskom svijetu pa tako i u hrani. Mogu se podijeliti na osnovu strukture i broja C atoma (monosaharidi, oligosaharidi, polisaharidi) te na temelju njihovih karakterističnih osobina.

Kemijske metode određivanja šećera prvenstveno se temelje na reducirajućim svojstvima šećera, tj. na sposobnosti redukcije iona metala iz vrućih alkalnih otopina soli metala. To svojstvo imaju samo oni šećeri koji u molekuli imaju slobodnu poluacetalnu ili keto skupinu (svi monosaharidi i neki disaharidi) (Vahčić i sur., 2008).

U metodi po Luff-Schoorlu upotrebljava se Luffova otopina kao reagens. Luffov reagens je specifičan jer reagira samo s aldozama i ketozama te je uz to manje alkalna. Kod te metode se u Luffovu otopinu doda otopina šećera, zagrije do vrenja i kuha točno određeno vrijeme. Nakon hlađenja se može određivati ostatak nereduciranog  $\text{Cu}^{2+}$  pri čemu se u otopinu dodaje KI i zakiseli s  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a preostali jod, koji nije reagirao s bakrovim ionom, se titrira otopinom natrijeva tiosulfata uz škrob kao indikator. Istovremeno se radi i slijepa proba te se iz razlike slijepa probe i uzorka izračuna količina tiosulfata i iz tablica očita odgovarajuća količina šećera. Udio saharoze, koja nije reducirajući šećer, može se odrediti tako da se izvrši kiselinska hidroliza pri čemu nastaje invert. Razlika u rezultatu s kiselinskom hidrolizom i bez nje, pomnožena s faktorom 0,95 predstavlja udio saharoze u uzorku (NN 39/09).

### **2.6.5. Određivanje udjela masti i ulja**

Pod pojmom masti podrazumijeva se smjesa estera viših masnih kiselina s glicerolom. Ukoliko su triacilgliceroli na sobnoj temperaturi u tekućem stanju nazivaju se uljima. Jedan od načina određivanja masti je metoda po Soxhletu kod koje se provodi ekstrakcija pomoću otapala čiji se volumen ne mjeri točno, a nakon završene ekstrakcije i otparavanja otapala se cjelokupni ekstrakt suši i važe. Kod metode po Grossfeldu ekstrakcija se provodi s točno mjerenom količinom otapala te se nakon završene ekstrakcije uzima alikvotni dio smjese otapala i ekstrakta, otapalo se otpari, ekstrakt suši i važe te se izračuna udjel masti u uzorku. Metoda po Weibull-Stoldu i metoda po Röse-Gottliebu se koriste kod uzoraka koji su bogati proteinima, a specifične po tome što se prije ekstrakcije provodi hidroliza uzorka (najčešće s jakim kiselinom), pri čemu se razore stanične stijenke (Vahčić i sur., 2008).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijali**

Za pripremu bezglutenskog kruha korištene su sljedeće sirovine: integralno rižino brašno (Advent, Hrvatska), kukuruzni škrob (Agrana, Austrija), integralno proseno brašno (Werz, Njemačka), brašno žutog graška (Only Nature, EU), kukuruzni ekstrudat (Naše Klasje, Hrvatska), biljna mast (Zvijezda, Hrvatska), hidrokoloidi Wellence Gluten Free 47129 i Methocell K4M Food Grade (The Dow Chemical Company, SAD), morska sol (Solana Pag, Hrvatska), prašak za pecivo (Dr.Oetker, Mađarska), emulgator MONO 40 (Juchem, Njemačka), šećer (Viro d.o.o., Hrvatska), instant suhi pekarski kvasac (Di-go, Kvasac d.o.o., Hrvatska), bjelanjak u prahu (Elcon, Prehrambeni proizvodi d.o.o., Hrvatska), vodovodna voda.

U ovom radu korištene su dvije recepture za pripremu bezglutenskog kruha, pri čemu je jedna bila bez brašna graška, a druga s 25% brašna graška na ukupnu masu brašna što znači da su u konačnici analizirana dva kruha- jedan s brašnom žutog graška, a drugi bez tog istog brašna. Za analizu svakog kruha radili smo dvije paralele.

#### **3.2. Metode rada**

##### **3.2.1. Priprema uzorka bezglutenskog kruha za analizu**

Uređaji i pribor:

- Laboratorijski mlinac (First, FA-5482, Austria)
- Analitička vaga, osjetljivost  $\pm 0,0001\text{g}$  (YMC Chyo, Jk-180)

Uzorak bezglutenskog kruha pripremljen je prema standardnoj metodi AACC metodi 62-05 za pripremu uzorka kruha za analizu (AACC, 1961). Pri analizi cijelog kruha uzima se usitnjeni originalni uzorak, a za većinu analiza koristi se prosječni uzorak „zračno osušenog“ uzorka. Reprezentativni uzorak kruha (dobro ohlađen, najmanje sat vremena nakon pečenja) je izvagan na list glatkog papira pri čemu je zabilježena masa papira i reprezentativnog uzorka. Uzorak je zatim narezan na šnite debljine 2-3 mm što pažljivije da ne bi došlo do gubitka dijelova kore ili sredine. Tako pripremljen uzorak stavljen je na zračno sušenje na sobnoj temperaturi 15 do 20 sati. Nakon zračnog sušenja uzorak je izvagan zajedno s papirom i samljeven u laboratorijskom mlinu. Iz razlike mase kruha prije i nakon sušenja dobiva se



masa izgubljene vode koja se dijeli s masom kruha prije sušenja i množi s 100 pri čemu se dobiva postotak gubitka vlage uslijed zračnog sušenja kruha (A).

### 3.2.2. Određivanje udjela vlage u kruhu

Uređaji i pribor:

- Metalna zdjelica sa standardiziranim poklopcem  $\phi$  55mm, visine 15 mm
- Električni sušionik (Instrumentaria, ST-01/02, Zagreb)
- Eksikator sa silikagelom
- Analitička vaga, osjetljivost  $\pm 0,0001$ g (YMC Chyo, Jk-180)
- Laboratorijski mlinac (First, FA-5482, Austria)

Udio vlage u uzorku bezglutenskog kruha određen je prema referentnoj metodi određivanja količine vode u žitaricama i proizvodima od žitarica (HRN ISO, 2010). U prethodnu opranu, osušenu i izvaganu metalnu zdjelicu izvagano je 2-3 g samljevenog uzorka kruha. Otvorena posudica s uzorkom i poklopcem suši se u električnom sušioniku 90 minuta na 130°C do 133°C. Vrijeme sušenja je mjereno od trenutka kad je temperatura sušionika, nakon unošenja posudice, dosegla 130°C do 133°C. Nakon sušenja, posudica s uzorkom se poklopi odgovarajućim poklopcem, brzo izvadi iz sušionika, stavi u eksikator na hlađenje i izvaži s točnošću od 0,001 g nakon hlađenja. Iz razlike mase uzorka prije i nakon sušenja dobiva se masa izgubljene vode koja se dijeli s masom uzorka prije sušenja i množi s 100 pri čemu se dobiva postotak gubitka vlage uslijed sušenja u sušioniku (B).

Udjel vlage u kruhu izračunat je prema jednadžbi 1.

$$\text{Udjel vlage u kruhu (\%)} = A + \frac{[(100 - A) * B]}{100} \quad (1)$$

gdje je: A – postotak vlage dobiven zračnim sušenjem,  
B – postotak vlage dobiven sušenjem u sušnici.

Udjel suhe tvari izračunat je prema jednadžbi 2.

$$\text{Udjel suhe tvari (\%)} = 100\% - \text{udjel vlage u kruhu (\%)} \quad (2)$$

### 3.2.3. Određivanje udjela pepela u sirovinama i kruhu

Uređaji i pribor:

- Keramičke posudice za spaljivanje
- Eksikator sa silikagelom
- Plamenik
- Analitička vaga, osjetljivost  $\pm 0,0001\text{g}$  (YMC Chyo, Jk-180)
- Mufolna peć (Heraeus, KR-170)

Udio pepela u uzorku bezglutenskog kruha određen je prema standardnoj metodi HRN ISO 2171:2010 (HRN ISO, 2010). Prethodno pripremljen, homogenizirani uzorak kruha izvagan je u količini od 3-5 g u prethodnu izžarenu, ohlađenu i izvaganu keramičku posudicu za spaljivanje. Posudica s izvaganim uzorkom najprije se zagrijava na plameniku do potpune karbonizacije uzorka. Zatim je posudica s uzorkom prenesena u mufolnu peć (prethodnu zagrijanu na  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) na spaljivanje. Spaljivanje se provodilo do postizanja svijetlo sivog pepela. Po završetku spaljivanja posudica s uzorkom je stavljena u eksikator na hlađenje, do postizanja sobne temperature, i zatim je izvagana na analitičkoj vagi.

Udjel pepela izračunat je prema jednadžbi 3.

$$\text{Udjel pepela (\%)} = \frac{\text{masa pepela (g)}}{\text{masa uzorka (g)}} * 100 \quad (3)$$

### 3.2.4. Određivanje udjela proteina

Uređaji i pribor:

- Analitička vaga, osjetljivost  $\pm 0,0001\text{g}$  (YMC Chyo, Jk-180)
- Uređaj za mineralizaciju - blok za spaljivanje (Tecator Digestion System 6, 1007 Digester, Foss, UK)
- Uređaj za destilaciju (Kjeltec<sup>TM</sup> 2100, Foss Tecator AB, Švedska)
- Erlenmeyer tikvice, 250 mL
- Menzura, 100 mL
- Graduirana pipeta, 10 mL
- Dispenzeta za koncentriranu  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 12 mL
- Dispenzeta za bornu kiselinu, 25 mL

## Reagensi:

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, konc. (95-97% , Alkaloid, Gram-Mol)
- NaOH, 40% vodena otopina
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, (40 g/L) otopina u demineraliziranoj prokuhanoj vodi s dodatkom indikatora (metilno crvenilo i bromkrezol zeleno)
- Katalizator: Kjeldahl tablete s bakrom (bez žive i selena), 5 g (Merck)
- HCl 0,1 N (titrival, Kefo)

U uzorcima bezglutenskih kruhova udio proteina je određen metodom po Kjeldahlu prema standardnoj metodi HRN ISO 1871:1999 (HRN ISO, 1999). Najprije je provedena mineralizacija uzorka, zatim je uslijedila destilacija i na kraju titracija s klorovodičnom kiselinom. Postupak je proveden tako da je u Kjeldahl kivetu za mineralizaciju odvagano oko 1 g uzorka, dodana jedna tableta Kjeldahl katalizatora i 12 mL koncentrirane sulfatne kiseline te je sadržaj kivete lagano promješšan kako bi se sav uzorak navlažio kiselinom. Kjeldahl kivete su zatim stavljene u blok za spaljivanje. Prije spaljivanja, boja uzorka u Kjeldahl kivetama je bila crvenkasto-smeđa. Zagrijavanje je provedeno postepeno. Sam postupak mineralizacije trajao je tako dugo dok tekućina u kivetama nije poprimila bistru, svjetlo zelenu boju nakon čega su kivete uklonjene iz bloka za spaljivanje i ostavljene hladiti do sobne temperature. Nakon toga je u svaku kivetu dodano 75 mL destilirane vode. Prije same destilacije, Erlenmeyerova tikvica je isprana s malo borne kiseline, a zatim je u nju dodano 25 mL te iste kiseline. Na postolje u destilacijskoj jedinici stavi se Erlenmeyerova tikvica s bornom kiselinom tako da destilacijska cjevčica bude uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta stavi se na za nju predviđeno mjesto i započne s destilacijom pri čemu se 50 mL 40% NaOH dozira u Kjeldahlovu epruvetu. Nakon završetka destilacije destilat je bio zelene boje što je dokaz prisutstva amonijaka. Nakon toga je uzorak u tikvici titriran s 0,1 N HCl, pri čemu je promjena boje uzorka u narančasto-crvenu označila kraj same titracije. Potrošeni volumen HCl je zapisan i korišten za izračun udjela proteina. Isti postupak je ponovljen i sa slijepom probom koja je sadržavala sve osim uzorka.

Najprije je izračunat udio dušika prema formuli 4., a zatim je izračunat postotak proteina prema formuli 5.

$$\% \text{ dušika (N)} = \frac{(a - b) * N_{\text{kis}} * f_{\text{kis}} * 1,4007}{m(\text{uzorka})} \quad (4)$$

$$\% \text{ proteina} = \% \text{N} * 6,25 \quad (5)$$

gdje je: a – volumen HCl utrošen za titraciju uzorka (mL),  
b – volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe (mL),  
 $N_{\text{kis}}$  – molaritet kiseline,  $f_{\text{kis}}$  – faktor kiseline,  
m – masa uzorka (g).

### 3.2.5. Određivanje udjela masti

Uređaji i pribor:

- Laboratorijske čaše, 400 mL
- Graduirana menzura, 100 mL
- Ljjevak
- Uređaj po Soxhletu s tikvicom s okruglim dnom, 250 mL
- Filter papir, promjera 20-25 cm
- Stakleni štapić
- Satno staklo
- Tehnička vaga (Kern, KB-2000-ZN, Njemačka)
- Anlitička vaga (YMC Chyo, Jk-180)
- Električna grijača ploča
- Kuglice za vrenje

Reagensi:

- HCl, konc., 37% (CARLO ERBA Reagents)
- Petroleter (40-65% CARLO ERBA Reagents)

Za određivanje udjela masti u uzorcima bezglutenskog kruha korištena je standardna metoda za određivanje udjela masti HRN ISO 6492:2001 (HRN ISO, 2001). Prije same ekstrakcije masti uzorak je bilo potrebno hidrolizirati s koncentriranom kloridnom kiselinom. U tikvicu volumena 300 mL odvagano je oko 20 g uzorka i pomiješano sa 100 mL hladne destilirane vode, 60 mL koncentrirane HCl i nekoliko komadića plovuća (2-3 komada) te je tikvica zagrijavana 15 min u ključaloj vodenoj kupelji. Zagrijavanje se zatim nastavilo na električnoj grijačkoj ploči, uz stalno miješanje staklenim štapićem do vrenja te je tada tikvica pokrivena satnim staklom i ostavljena kuhati 20 min kako bi se sve svi proteini potpuno otopili. Pokrovno stakalce je zatim isprano s malo vruće vode i cijeli sadržaj tikvice je odmah filtriran kroz prethodno pripremljen, vlažni, naborani filter papir. Tikvica je dobro isprana s vodom, a

zatim je filter papir još dodatno ispiran. Nakon ispiranja, filter papir s uzorkom se prenese na satno staklo, prekriveno čistim filter papirom i stavi u sušionik na sušenje pri 100-105 °C.

Osušeni uzorak je zajedno s filter papirom stavljen u papirnatu čahuru za ekstrakciju i ekstrahiran je pomoću petroletera u aparaturi po Soxletu 3 sata. Nakon ekstrakcije petroleter je otparen (izljevanjem petroletera iz ekstraktora kad se napuni; postupak se ponavljao dok u tikvici nije ostalo oko 0,5-1 mL petroletera koji se onda upario još kratkim zagrijavanjem same tikvice koja nije bila spojena na aparaturu). Tikvica s ekstraktom se suši u sušioniku pri 105°C do konstantne mase, hladi u eksikatoru do sobne temperature i važe.

Udjel masti izračunat je prema formuli 6.

$$\text{Udjel masti (\%)} = \frac{(m_1 - m_2) * 100}{m_0} \quad (6)$$

gdje je:  $m_0$  – masa uzorka (g),

$m_1$  – masa tikvice s ekstraktom (g),

$m_2$  – masa prazne tikvice (g).

### 3.2.6. Određivanje udjela šećera volumetrijski po Luff-Schoorl-u

Za određivanje udjela šećera u uzorcima bezglutenskog kruha korištena je metoda po Luff-Schoorlu (NN 39/09), koja je djelomično modificirana.

Uređaji i pribor:

- Vaga (mjerno područje: 0,1 mg)
- Bunsenov plamenik
- Azbestna mrežica i tronožac
- Erlenmeyer tikvica s brušenim čepom od 300 mL
- Povratno hladilo
- Odmjerne tikvice od 100 i 250 mL
- Vodena kupelj
- Pipete od 10 i 25 mL

## Reagensi:

- Reagens za bistrenje po Carrezu
  - Carrez I: 21,95 g cinkova acetata ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) i 3 g ledene (glacijalne) octene kiseline otopljeno u 100 mL destilirane vode
  - Carrez II: 10,6 g kalijeva heksacijanoferata ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) otopljeno u 100 mL destilirane vode
- Otopina kompleksa bakra po Luff-Schoorlu (Luffov reagens)
  - Otopina natrijeva karbonata (143 g bezvodnog natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) otopljeno u 300-400 mL destilirane vode), otopina limunske kiseline (50 g limunske kiseline ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ ) otopljeno u 50 ml destilirane vode) i otopina bakrenog sulfata (16 g bezvodnog bakrenog sulfata ( $\text{CuSO}_4$ ) otopljeno u 100 ml destilirane vode), dopunjeno do 1000 mL destiliranom vodom.
- 30%-tna otopina KI
- 6 mol/L otopina  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 0,1 M otopina  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (natrij-tiosulfata)
- 2%-tna otopina škroba
- 0,1 mol/L otopina NaOH
- 0,1 mol/L HCl
- 1 mol/L otopina NaOH

## Priprema uzorka:

U čašu volumena 400 mL odvagano je oko 5 g uzorka i dodano 200 mL destilirane vode. Balastne tvari su odstranjene dodavanjem 5 mL Carrez I i 5 mL otopine Carrez II, pri čemu je nakon svakog dodavanja sadržaj dobro promiješan. Cjelokupna količina je prenesena u odmjernu tikvicu volumena 250 mL, tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake, nakon čega je sadržaj tikvice promiješan i filtriran. Dobiven je filtrat I.

## Određivanje reducirajućih (prirodnih) šećera prije inverzije (hidrolize):

U odmjernu tikvicu volumena 100 mL otpipetirano je 25 mL filtrata I i tikvica je do oznake dopunjena s destiliranom vodom. U Erlenmeyer tikvicu volumena 300 mL otpipetirano je 25 mL Luffove otopine i 25 mL razrijeđenog filtrata I (sadržaj u tikvici je bio plave boje). Tikvica, spojena s povratnim hladilom, zagrijavala se na azbestnoj mrežici sve do vrenja, a od trenutka ključanja sadržaj u tikvici se kuhao točno 10 minuta, nakon čega je ohlađen pod mlazom hladne vode (sadržaj u tikvici je bio plavo-zelenkaste boje). U tikvicu je zatim

otpipetirano 10 mL otopine KI, 1 mL škroba i postepeno je dodano 25 mL otopine sumporne kiseline (zbog mogućnosti stvaranja pjene), pri čemu je sadržaj u tikvici poprimio žuto-smeđu boju. Zatim je usljedila titracija s 0,1 mol/L otopinom natrijeva tiosulfata, uz neprekidno miješanje, sve dok nije došlo do pojave bijelo sivkaste boje što je označilo kraj titracije (sljedeća kap tiosulfata u otopini bi napravila oko sebe prozirnu tekućinu).

U istim uvjetima napravljena je i slijepa proba s istom količinom Luffova reagensa, s time što je umjesto razrijeđenog filtrata I dodano 25 mL destilirane vode.

#### Određivanje ukupnih reducirajućih šećera nakon inverzije (hidrolize):

U odmjernu tikvicu volumena 100 mL otpipetirano je 10 mL filtrata I, dodano je 30 mL destilirane vode i 0,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Odmjerna tikvica sa sadržajem je stavljena u vrelu vodenu kupelj na hidrolizu 30 minuta, nakon čega joj je dodan fenolftalein kao indikator te je sadržaj tikvice neutraliziran s 1 mol/L otopinom natrijeva hidroksida do pojave svijetlo roze boje i tikvica je nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Daljni postupak je bio isti kao i pri određivanju reducirajućih šećera, a prvi sljedeći korak je bio pipetiranje 25 mL Luffovog reagensa i 25 mL hidroliziranog uzorka.

Udjel ukupnih reducirajućih šećera izračunat je nakon hidrolize prema sljedećem izrazu: nereducirajući (invertni) šećer = ukupni reducirajući šećer (nakon hidrolize) – reducirajući šećer (prije hidrolize)

Postupak izračuna udjela šećera u uzorcima:

Volumen 0,1 M tiosulfata koji odgovara količini šećera u uzorku (mL) izračunat je prema formuli 7.

$$X = SP - U \quad (7)$$

gdje je: X – volumen 0,1 M tiosulfata koji odgovara količini šećera u uzorku (mL),

SP – volumen 0,1 M tiosulfata pri titraciji slijepa probe (mL),

U – volumen 0,1 M tiosulfata potrošen pri titraciji otopine uzorka.

Prema izračunatoj vrijednosti volumena 0,1 M tiosulfata koji odgovara količini šećera u uzorku je pomoću pripadajuće vrijednosti iz tablice 6. izračunata masa šećera.

Udio ukupnog inverta nakon hidrolize izračunat je prema formuli 8., a udio prirodnog inverta prema formuli 9.

$$\% \text{ ukupnih reducirajućih šećera nakon hidrolize} = \frac{250 \text{ mL} * 100 \text{ mL} * X * 100}{Y * 10 \text{ mL} * 25 \text{ mL} * 1000} \quad (8)$$

$$\% \text{ prirodnog inverta} = \frac{250 \text{ mL} \cdot 100 \text{ mL} \cdot X \cdot 100}{Y \cdot 25 \text{ mL} \cdot 25 \text{ mL} \cdot 1000} \quad (9)$$

gdje je: X = masa šećera očitano iz tablice (mg),

Y = masa uzorka (g).

**Tablica 6.** Vrijednosti za izračunavanje udjela šećera prema Luff-Schoorl-u

0,1 mol/L	Glukoza, fruktoza, invertni šećeri	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	
(mL)	mg	razlika
1	2,4	
2	4,8	2,4
3	7,2	2,4
4	9,7	2,5
5	12,2	2,5
6	14,7	2,5
7	17,2	2,5
8	19,8	2,6
9	22,4	2,6
10	25,0	2,6



#### 4. REZULTATI

U ovom završnom radu određivan je kemijski sastav, tj. udio vlage, pepela, proteina, masti i šećera u bezglutenskim kruhovima s i bez dodatka brašna žutog graška. Udio pojedinih komponenata izražen je na suhu tvar kruha i na sam kruh. Dobiveni rezultati prikazani su u navedenim tablicama.

**Tablica 1.** Udio vlage i suhe tvari u bezglutenskom kruhu s dodatkom i bez dodatka brašna graška

Uzorak	Srednja vrijednost udjela vlage u kruhu (%)	Srednja vrijednost udjela ST* u kruhu (%)
s brašnom graškom	45,06 ± 0,06	54,94 ± 0,06
bez brašna graška	44,83 ± 0,16	55,17 ± 0,16

\*ST- suha tvar

**Tablica 2.** Udio pepela u bezglutenskom kruhu s dodatkom i bez dodatka brašna graška

Uzorak	Srednja vrijednost udjela pepela na ST* (%)	Srednja vrijednost udjela pepela u kruhu (%)
s brašnom graškom	4,56 ± 0,02	2,50 ± 0,02
bez brašna graška	4,32 ± 0,02	2,38 ± 0,02

\*ST- suha tvar

**Tablica 3.** Udio proteina u bezglutenskom kruhu s dodatkom i bez dodatka brašna graška

Uzorak	Srednja vrijednost udjela proteina na ST* (%)	Srednja vrijednost udjela proteina u kruhu (%)
s brašnom graškom	16,29 ± 0,30	8,95 ± 0,30
bez brašna graška	13,53 ± 0,22	7,46 ± 0,22

\*ST- suha tvar

**Tablica 4.** Udio masti u bezglutenskom kruhu s dodatkom i bez dodatka brašna graška

Uzorak	Srednja vrijednost udjela masti na ST* (%)	Srednja vrijednost udjela masti u kruhu (%)
s brašnom graškom	7,23 ± 0,31	3,97 ± 0,31
bez brašna graška	7,48 ± 0,17	4,12 ± 0,17

\*ST- suha tvar

**Tablica 5.a** Udio ukupnog inverta u bezglutenskom kruhu s dodatkom i bez dodatka brašna graška

Uzorak	Srednja vrijednost udjela ukupnog inverta na ST* (%)	Srednja vrijednost udjela ukupnog inverta u kruhu (%)
s brašnom graškom	2,47 ± 0,03	1,36 ± 0,03
bez brašna graška	2,93 ± 0,04	1,62 ± 0,04

\*ST- suha tvar

**Tablica 5.b** Udio prirodnog inverta u bezglutenskom kruhu s dodatkom i bez dodatka brašna graška

Uzorak	Srednja vrijednost udjela prirodnog inverta na ST* (%)	Srednja vrijednost udjela prirodnog inverta u kruhu (%)
s brašnom graškom	1,61 ± 0,12	0,88 ± 0,12
bez brašna graška	1,7 ± 0,09	0,94 ± 0,09

\*ST- suha tvar

## 5. RASPRAVA

Bezglutenski kruhovi, osim što su općenito lošije tehnološke kvalitete, su i nutritivno siromašniji. Kako bi se riješio taj problem, za proizvodnju takvih kruhova, uz sve ostale sastojke, najčešće se koriste različite vrste integralnih brašna. U ovom radu, upravo zbog svog izuzetno dobrog nutritivnog sastava, korišteno je brašno žutog graška pomiješano s ostalim korištenim brašnima.

Analizirana su dva bezglutenska kruha. Jedan je sadržavao 25 % brašna žutog graška (računato na ukupnu masu brašna) i sve ostale sastojke koji su prethodno navedeni na str.11. pod poglavljem 3.1.. Drugi bezglutenski kruh se razlikovao od prethodnog po tome što nije sadržavao brašno graška.

Postotak vode u kruhu ovisi prvenstveno o količini same vode koja je dodana u zamjes za pripremu istog. Taj udio ovisi i o samim sirovinama koje su korištene za njegovu izradu, pri čemu neke od njih mogu sadržavati manji, a neke nešto veći udio vode. Isto tako, postotak vode u samome kruhu ovisi i o uvjetima tijekom pečenja. Prema rezultatima prikazanim u Tablici 1. vidljivo je da udio vode u uzorku kruha s dodatkom brašna graška iznosi 45,06%, dok je kod kruha bez dodatka brašna ta vrijednost bila tek neznatno manja te je iznosila 44,83%. Prema tome slijedi da kruh bez dodatka brašna žutog graška, u ovom slučaju, ima nešto veći udio suhe tvari koja u našem slučaju iznosi 55,17%, dok je kod bezglutenskog kruha s brašnom graška ta vrijednost nešto manja.

Iz podataka u Tablici 2. vidljivo je da udio pepela na suhu tvar u kruhu s dodatkom brašna graška iznosi 4,56% te da je nešto veći u usporedbi s kruhom koji ne sadrži brašno graška gdje taj udio iznosi 4,32%. Glavni razlog tome je taj što žuti grašak, kao mahunarka, sadrži visok udio mineralnih tvari što su dokazali Kaur i sur. (2007) u svome radu. Isto su dokazali i Morad i sur. (1980) u svome radu gdje su odredili kemijski sastav triju mahunarki među kojima je bio i žuti grašak. Prema istraživanju koje su proveli Kohajdová i sur. (2013) vidljivo je da brašno graška sadrži znatno veći udio pepela (3,11%) u odnosu na pšenično brašno (0,45%), što dokazuje da brašno žutog graška doprinosi nutritivnoj vrijednosti bezglutenskog kruha. Prema tome, za uravnoteženu prehranu, poželjno je da se brašno graška kombinira s brašnom nižeg udjela mineralnih tvari.

Što se tiče udjela proteina, prema rezultatima prikazanim u Tablici 3., vidljivo je da bezglutenski kruh koji u svom sastavu sadrži brašno žutog graška ima veći udio proteina

(16,29%) u odnosu na bezglutenski kruh bez brašna gdje taj udio iznosi 13,53%. Ta razlika u njihovim vrijednostima, gledajući udio proteina na suhu tvar, iznosi 2,76%. Razlog razlike je taj što brašno žutog graška, koje smo koristili u pripremi jednog od analiziranih bezglutenskih kruhova, sadržava visoki udio proteina što su dokazali Sreerama i sur. (2012) u svome radu. Kohajdová i sur. (2013) proveli su istraživanje gdje su, između ostalog, odredili i kemijski sastav brašna graška te su uspoređujući pšenično i brašno graška došli do rezultata da je brašno graška imalo gotovo dvostruku veću vrijednost (24,46%) proteina. Proteini mahunarke bogati su lizinom, a siromašni aminokiselinama koje sadrže sumpor, dok je kod žitarica obrnuti slučaj. Zbog toga, kombinacija žitarica i proteina mahunarki osigurava bolji odnos esencijalnih aminokiselina koji je vrlo važan za uravnoteženu prehranu (De la Hera i sur., 2012.; Kadam i sur., 2012.). Upravo zbog visokog udjela proteina u svom sastavu, brašno žutog graška se prvenstveno koristi kako bi se povećala prehrambena vrijednost bezglutenskih kruhova. Također, za pripremu bezglutenskih kruhova korišteno je integralno rižino i proseno brašno koja su, između ostalog, bogata proteinima pa je i to još jedan razlog za dobiveni veći udio proteina u analiziranim kruhovima.

Uspoređujući postotak masti u bezglutenskim kruhovima s i bez dodatka brašna žutog graška, prema rezultatima prikazanim u Tablici 4., vidljivo je da postoji tek mala neznatna razlika u njihovim vrijednostima u iznosu od 0,25% gledajući udio masti računatih na suhu tvar. U slučaju kruha, koji je u svom sastavu sadržavao brašno graška, udio masti na suhu tvar iznosi 7,23%, dok je kod kruha bez brašna graška taj udio nešto veći i on iznosi 7,48%. Isto vrijedi i za dobiveni postotak masti u samome kruhu, gdje je u slučaju kruhu bez dodatka brašna graška taj postotak nešto veći.

Prilikom određivanja udjela šećera u bezglutenskim kruhovima s i bez brašna graška, korištena je metoda po Luff-Schoorlu, a dobiveni rezultati prikazani su kao postotak ukupnog inverta u Tablici 5.a te kao postotak prirodnog inverta u Tablici 5.b. Uspoređujući rezultate za udio ukupnog inverta izraženog na suhu tvar kruha, vidljivo je da bezglutenski kruh napravljen bez dodatka brašna žutog graška sadrži nešto veći udio šećera od 2,93%, u odnosu na kruh s brašnom graškom gdje taj udio iznosi 2,47%. U tom slučaju razlika u udjelu ukupnog inverta iznosi 0,46%, što nam govori da se upotrebom brašna graška značajno smanjuje udio ukupnog inverta jer samo brašno sadrži vrlo male količine šećera (Kohajdová i sur. (2013)). Gledajući rezultate u Tablici 5.b za prirodni invert također je vidljivo da je u bezglutenskom kruhu bez brašna žutog graška udio šećera nešto veći i iznosi 1,70%, dok je kod kruha s brašnom taj postotak nešto manji i iznosi 1,61%, pa prema tome njihova razlika u

udjelu prirodnog inverta iznosi 0,09% što je znatno manje u odnosu na razliku kod ukupnog inverta. U svakom slučaju bilo je i za očekivati da će vrijednost za ukupni invert biti veća od vrijednosti za prirodni invert jer sam ukupni invert podrazumijeva sve šećere koji su prisutni u samome kruhu.

Kvaliteta bezglutenskog kruha prvenstveno ovisi o sirovinama korištenim u njegovoj izradi. Integralno rižino i proseno brašno te kukuruzni ekstrudat obogaćuju kruh s proteinima, škrobom, prehrambenim vlaknima, vitaminima i mineralnim tvarima pa je time zadovoljena prehrambena vrijednost i nutritivni sastav bezglutenskog kruha kao namirnice namijenjene oboljelima od celijakije. Dodatkom brašna žutog graška dodatno se povećava udio proteina i mineralnih tvari, a smanjuje količina šećera u takvim kruhovima, jer samo brašno ima izrazito povoljan kemijski sastav. Također, ono doprinosi ljudskome zdravlju pa se preporuča kao alternativa za proizvodnju bezglutenskih proizvoda.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

- Brašno žutog graška zbog izrazito povoljnog kemijskog sastava može se koristiti u proizvodnji bezglutenskih kruhova s ciljem povećanja prehrambene vrijednosti i poboljšanja nutritivnog sastava samog kruha.
- Upotreba brašna žutog graška u proizvodnji bezglutenskih kruhova rezultira povećanjem udjela proteina i mineralnih tvari u tom istom kruhu, dok s druge strane uzrokuje smanjenje količine šećera.
- Na osnovu dobivenih rezultata vidljivo je da korišteno brašno žutog graška, uz ostale upotrebljene sirovine, nije uzrokovalo veliku razliku u udjelu masti i vlage kod analiziranog bezglutenskog kruha s dodatkom brašna graška i bezglutenskog kruha pripremljenog bez tog istog brašna.

## 7. LITERATURA

- AACCI Method 62-05.01. Preparation of Sample: Bread U: Approved methods of analysis, 11th ed. St. Paul, AACCI International, 1961.
- Angioloni, A., Collar, C. (2011) Nutritional and functional added value of oat, kamut, spelt, rye and buckwheat versus common wheat in breadmaking. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 1283-1292.
- Anonymous 1 (2013) Gluten-free, < <https://theseasideinn.com/gluten-free/>>. Pristupljeno 26. lipnja 2016.
- Anonymous 2 (2013) Proso - bezglutenska, visokovrijedna i lako probavljiva žitarica, < <https://www.fitness.com.hr/prehrana/nutricionizam/Proso.aspx>>. Pristupljeno 10. lipnja 2016.
- Anonymous 3 (2011) Celijakija - nepodnošljivost organizma na gluten, <<http://www.lucas-int.hr/hr/clanci-vise/znanost/celijakija-nepodnosljivost-organizma-na-gluten-9>>. Pristupljeno 29. svibnja 2016.
- Anton, A. A., Artfield, S. D. (2008) Hydrocolloids in gluten-free breads: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **59**, 11-23.
- Arendt, E. K., O'Brien, C. M., Schober, T., Gormley, T. R., Gallagher, E. (2002) Development of gluten-free cereal products. *Farm Food* **12**, 21-27.
- Camire, M. E., Camire, A., Krumhar, K. (1990) Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. *Food Sci. Nutr.* **29**, 35-57.
- Caruso, R., Pallone, F., Stasi, E., Romeo, S., Monteleone, G. (2013) Appropriate nutrient supplementation in celiac disease. *Ann Med.* **45**, 522-531.
- Cauvain, S. P. (1998) Other cereals in breadmaking. U: *Technology of Breadmaking*, (Cauvain, S. P., Young, L. S., ured.) Blackie Academic & Professional, London, str. 330-346.
- Christa, K., Soral-Šmietana, M. (2008) Buckwheat grains and buckwheat products – nutritional and prophylactic value of their components – a review. *Czech J. Food Sci.* **26**, 153-162.
- Ćurić, D. Tehnologija proizvodnje i prerade brašna (interna skripta). Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (1997).
- De la Hera, E., Ruiz-Paris, E., Oliete B., Gómez, M. (2012) Studies on the quality of cakes made with wheat-lentil composite flours. *LWT-Food Sci.* **49**, 48-54.
- Farrell, R. J., Kelly, C. P. (2002) Celiac sprue. *N. Eng. J. Med.* **346**, 180-188.
- Gallagher, E. (2009) *Gluten-Free Food Science and Technology*, A John Wiley & Sons, New Delhi, India.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., Arendt, E. K. (2004) Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 143-152.

- Gargo, M. (1997) Ratarstvo obiteljskog gospodarstva – Žitarice i zrnate mahunarke. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
- Han, J., Janz, J. A. M., Gerlat, M. (2010) Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Res. Int.* **43**, 627-633.
- Hart, M. R., Graham, R. P., Gee, M., Morgan, A. I. (1970) Bread from sorghum and barley flours. *J. Food Sci.* **35**, 661-665.
- HDC (2007) Croatian Society for Coeliac Disease. HDC - Hrvatsko društvo za celijakiju, <http://www.celijakija.hr>. Pristupljeno 29. svibnja 2016.
- HRN EN ISO 2171:2010, Žitarice - Određivanje ukupnog pepela spaljivanjem (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 712:2010, Žitarice i proizvodi od žitarica - Određivanje količine vode (osnovna referentna metoda).
- HRN ISO 1871:1999, Poljoprivredni prehrambeni proizvodi - Općenite upute za određivanje dušika Kjeldahlovom metodom (osnovna referentna metoda).
- HRN ISO 6492:2001, Stočna hrana - Određivanje udjela masti (osnovna referentna metoda).
- Kadam, M. L., Salve R. V., Mehrajfatema, Z. M., More, S. G. (2012) Development and evaluation of composite flour for missi roti / chapatti. *Food Proc. Technol.* **3**, 134-140.
- Kaur, M., Sandhu, K. S., Singh, N. (2007) Comparative study of the functional, thermal and pasting properties of flours from different field pea (*Pisum sativum* L.) and pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) cultivars. *Food Chem.* **104**, 259-267.
- Kelly, C. (2010) Common and Uncommon Presentations of Celiac Disease. U: Real Life with Celiac Disease: Troubleshooting and Thriving Gluten-Free (Dennis, M., Leffler, D., ured.), AGA Press, Bethesda, Maryland.
- Klarić, F. (prevoditelj) 2010: Priručnik o pekarstvu i slastičarstvu (Bulić I., ured.), Biblioteka Kruh za život, TIM ZIP doo Zagreb ; Original: Albrecht T., Ehrlinger, HG., Willeke, E., Schild E. (2009) Fachkunde in Lernfeldern, Backer/Backerin, Praxis und Theorie, Fachbuchverlag Panneberg GmbH&Co.KG, Han Gruitzen, Deutschland.
- Kohajdová, Z., Karovicová, J., Magala, M. (2013) Rheological and qualitative characteristics of pea flour incorporated cracker biscuits. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **5**, 11-17.
- Morad, M. M., Leung, H. K., Hsu, D. L., Finney, P. L. (1980) Effect of germination on physicochemical and bread-baking properties of yellow pea, lentil, and faba bean flours and starches. *Cereal Chem.* **57**, 390-396.
- Murray, J. A. (1999) The widening spectrum of celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 354-365.



- Muzquiz, M., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Guillamón, E., Pedrosa, M. (2012) Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochem. Rev.* **11**, 227-244.
- Neumann, H., Bruemmer, J. M. (1997) Investigations with the production of gluten free bread and roll specialities. *Getreide Mehl Brot.* **51**, 50-55.
- Novotni D. (2015) Pekarski proizvodi bez glutena, <<http://www.pekarskiglasnik.com/pekarstvo/90-pekarstvo-2/pekarske-crstice/94-pekarski-proizvodi-bez-glutena>>. Pristupljeno 26. lipnja 2016.
- Pravilnik o hrani bez glutena (2010) *Narodne novine* **83**, Zagreb (NN 83/10).
- Pravilnik o šećerima i metodama analiza šećera namijenjenih za konzumaciju (2009) *Narodne novine* **39**, Zagreb (NN 39/09).
- Ribotta, P. D., Ausar, S. F., Morcillo, M. H., Perez, G. T., Beltramo, D. M., Leon, A. E. (2004) Production of gluten-free bread using soybean flour. *J. Sci. Food Agr.* **84**, 1969-1974
- Rosell, C. M., Rojas, J. A., Benedito de Barber, C. (2001) Influence of Hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloid* **15**, 75-81.
- Schoenlechner, R., Drausinger, J., Ottenschlaeger, V., Jurackova, K., Berghofer, E. (2010) Functional properties of gluten-free pasta produced from amaranth, quinoa and buckwheat. *Plant Foods Hum Nutr.* **65**, 339-349.
- Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratape, V. M., Singh, V. (2012) Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chem.* **131**, 462-468.
- Ugarčić–Hardi, Ž. Poznavanje sirovina u prehrambenoj industriji. Biljni dio: Žitarice, mahunarke, uljarice (interna skripta). Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayer-a u Osijeku, Osijek (2001).
- Vahčić, N., Hruškar M., Marković, K. Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane (interna skripta). Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (2008).
- Vici, B., Belli L., Biondi, M., Polzonetti, V. (2016) Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin. Nutr.* **30**, 1-6.
- Ward, F. M., Andon, S. A. (2002) Hydrocolloids as film formers, adhesives, and gelling agents for bakery and cereal products. *Cereal Food World* **47**, 52-55.
- Whitaker, P., Ologunde, M. O. (1990) Study of iron bioavailability in a native nigerian grain amaranth cereal for young-children, using a rat model. *Cereal Chem.* **67**, 505-508.

- Yanez, G. A., Walker, C. E., Nelson, L. A. (1991) Some chemical and physical properties of proso millet (*Panicum miliaceum*) starch. *J. Cereal Sci.* **13**, 299-305.
- Zarkadas, M., Cranney, A., Case, S., Molloy, M., Switzer, C., Grahm, I. D., Butzner, J. D., Rasjid, M., Warren, R. E., Burrows, V. (2006) The impact of a gluten-free diet on adults with coeliac disease: results of a national survey. *J. Hum. Nutr. Dietet.* **19**, 41-49.