

# Sadržaj akrilamida u različitim vrstama kruha nakon tostiranja

---

**Stanković, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:159:023638>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2021.

Ana Stanković

**SADRŽAJ AKRILAMIDA U  
RAZLIČITIM VRSTAMA KRUHA  
NAKON TOSTIRANJA**

Rad je izrađen u Kabinetu za procese pripreme hrane Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marije Badanjak Sabolović, Laboratoriju za tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa, Služba za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, Nastavni zavod za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“ pod stručnim vodstvom dr. sc. Adele Krivohlavek.

## ZAHVALA

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Mariji Badanjak Sabolović, na strpljenju, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada. Zahvaljujem se i Žitu d.o.o. na suradnji i donaciji radnog materijala.*

*Neizmjereno sam zahvalna svojim roditeljima i braći Antoniju i Aleksandru te mojem Tilenu na bezuvjetnoj podršci i ljubavi tijekom čitavog mog akademskog puta.*

*Također, velika zahvala ide mojim Debelim mačkama i cijeloj PBF porodici jer su mi studentske dane učinili posebnima te svim ostalim prijateljima i rodbini koji su uvijek bili uz mene.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Kabinet za procese pripreme hrane  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### SADRŽAJ AKRILAMIDA U RAZLIČITIM VRSTAMA KRUHA NAKON TOSTIRANJA

*Ana Stanković*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
JMBAG: 0058208247

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je utvrditi koncentraciju akrilamida nakon tostiranja u različitim vrstama tost kruha. Uzorci pšeničnog, punozrnatog pšeničnog, pirovog, proteinskog i raženog tost kruha tostirani su 60, 75 i 90 sekundi. Nakon tostiranja, na tostiranim uzorcima je instrumentalno određena tekstura i boja te udio suhe tvari. Sadržaj akrilamida je određen tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti s dvostrukim spektrometrom masa (UPLC/MS-MS metodom), a aminokiseline asparagin, koja je prekursor za nastajanje akrilamida u proizvodima na bazi žitarica, HPLC metodom. Provedeno je i senzorsko ocjenjivanje tostiranog kruha pomoću panela. Prema dobivenim rezultatima, duljom toplinskom obradom povećava se sadržaj akrilamida. Vrijednosti sadržaja akrilamida uzoraka su u granicama referentnih vrijednosti koje propisuje Uredba Europske komisije, osim za raženi tost tostiran 90 sekundi ( $119 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Dulje vrijeme tostiranja utječe na povećanje tvrdoće uzoraka, a najveću tvrdoću ima raženi tost ( $1,71 \text{ N}$ ). Najveća promjena boje nakon tostiranja određena je kod pšeničnog tosta nakon 90 s tostiranja. Senzorska analiza pokazala je bolju prihvaćenost dulje tostiranog kruha, a najbolje je ocijenjen raženi kruh tostiran 90 s. Statistički značajna linearna korelacija utvrđena je između koncentracije asparagina u netostiranim uzorcima i koncentracije nastalog akrilamida u uzorcima tosta nakon tostiranja.

**Ključne riječi:** *akrilamid, tost kruh, asparagin, tostiranje, tekstura*

**Rad sadrži:** 68 stranica, 27 slika, 11 tablica, 88 literaturna navoda, 2 priloga

**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. Marija Badanjak Sabolović

**Pomoć pri izradi:** Roko Marović, mag. nutr.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Filip Dujmić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Marija Badanjak Sabolović (mentor)
3. prof. dr. sc. Suzana Rimac Brnčić (član)
4. doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjenski član)

**Datum obrane:** 28. listopada 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Section for Food Preparation Processes  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### ACRYLAMIDE CONTENT IN DIFFERENT TYPES OF BREAD DURING TOASTING

*Ana Stanković*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
JMBAG: 0058208247

**Abstract:** The aim of this study was to determine the acrylamide concentration caused by the different toasting time of different types of toast bread. Toast bread samples (wheat bread, whole wheat bread, spelt bread, protein bread and rye) were toasted for 60, 75 and 90 seconds. After toasting, the texture and color of the toasted samples were measured instrumentally and the dry matter was determined. The amount of acrylamide was determined by Ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC/MS-MS method) and the concentration of the amino acid asparagine, known to be a precursor for acrylamide formation in cereal-based products, was determined by HPLC method. The sensory properties of the toasted breads were evaluated using a panel. The results show that longer thermal treatment produces more acrylamide. The values of acrylamide concentration in the samples are within the reference values prescribed by the European Commission Regulation, except for rye toast toasted for 90 seconds ( $119 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Longer toasting time increases the hardness of the samples, and rye toast (1.71 N) shows the highest hardness. In comparison to untoasted bread, the greatest difference in color was observed in wheat toast after 90 s of toasting. Sensory analysis showed better acceptance of longer toasted bread, and rye bread toasted for 90 s was rated best. A statistically significant linear correlation was found between the concentration of asparagine in untoasted samples and the concentration of acrylamide formed in toast samples after toasting.

**Keywords:** *acrylamide, toast bread, asparagine, toasting, texture*

**Thesis contains:** 68 pages, 27 figures, 11 tables, 88 references, 2 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Marija Badanjak Sabolović, PhD, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Roko Marović, mag. nutr.

#### Reviewers:

1. Filip Dujmić, PhD, Assistant professor
2. Marija Badanjak Sabolović, PhD, Assistant professor
3. Suzana Rimac Brnčić, PhD, Full professor
4. Teuta Murati, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** October 28<sup>th</sup>, 2021

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. KRUH.....	2
2.1.1. Tost kruh .....	5
2.2. AKRILAMID .....	7
2.2.1. Mehanizmi nastajanja akrilamida u hrani .....	8
2.2.2. Čimbenici koji utječu na nastanak akrilamida u hrani .....	9
2.2.3. Toksičnost i kancerogenost akrilamida.....	11
2.3. PRISUTNOST AKRILAMIDA U RAZLIČITOJ HRANI.....	12
2.4. AKRILAMID U KRUHU I OSTALIM PEKARSKIM PROIZVODIMA.....	14
2.4.1. Unos akrilamida putem pekarskih proizvoda.....	14
2.4.2. Čimbenici koji utječu na stvaranje akrilamida u pekarskim proizvodima.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.2. METODE.....	18
3.2.1. Priprema uzoraka .....	18
3.2.2. Određivanje teksture .....	20
3.2.3. Određivanje udjela suhe tvari .....	24
3.2.4. Određivanje boje .....	25
3.2.5. Određivanje slobodne aminokiseline asparagin HPLC metodom .....	27
3.2.6. Određivanje akrilamida UPLC-MS/MS metodom .....	28
3.2.7. Senzorska analiza.....	32
3.2.8. Statistička obrada podataka.....	32
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	33
4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA TEKSTURE.....	34
4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA SUHE TVARI .....	39
4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA BOJE .....	41
4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA SLOBODNOG ASPARAGINA.....	45
4.5. REZULTATI ODREĐIVANJA AKRILAMIDA .....	46
4.6. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE.....	51
5. ZAKLJUČCI.....	58
6. LITERATURA.....	60
7. PRILOZI.....	



# 1. UVOD

Tostiranje je popularna metoda toplinske obrade kruha u cijelome svijetu, a najčešće se koristi pri pripremi doručka. Na tržištu se nalazi mnogo vrsta tost kruha pripremljenih od različitih vrsta brašna. Tost kruh prilikom tostiranja postaje hrskavi izvana, dok se u sredini zadržava mekana tekstura. Tijekom procesa tostiranja, uz pozitivne senzorske promjene okusa i arome dolazi i do posmeđivanja čiji stupanj može varirati ovisno o preferenciji potrošača. Posljedica takve toplinske obrade kruha je odvijanje određenih kemijskih reakcija koje rezultiraju nastankom nekih nepoželjnih spojeva, među kojima je i akrilamid koji je klasificiran kao potencijalno kancerogen spoj za ljude. Zbog toga je bitno obratiti pozornost na namirnice u kojima može doći do njegovog nastanka tijekom toplinske obrade pri višim temperaturama. Prekursori za nastanak akrilamida su reducirajući šećeri i slobodna aminokiselina asparagin te oni u uvjetima visoke temperature sudjeluju u Maillardovim reakcijama neenzimskog posmeđivanja. Značajniji unos akrilamida u organizam moguć je konzumiranjem nekoliko skupina namirnica koje mogu sadržavati veće koncentracije akrilamida, a to su: proizvodi od krumpira kao što je pomfrit ili čips, proizvodi na bazi žitarica (kruh, žitarice za doručak) ili kava (pržena ili zamjene za kavu). Svima im je zajedničko da sadrže prekursore za nastanak akrilamida te su prilikom procesa proizvodnje ili prerade podvrgnute termičkoj obradi. Nastanak akrilamida u tim namirnicama je neizbježan, no uz provedbu određenih mjera, propisanih od strane Europske komisije, prilikom pripreme ili proizvodnje moguće je smanjiti nastanak akrilamida u gotovom proizvodu. Europska komisija je za kritične skupine namirnica propisala i dopuštene referentne vrijednosti akrilamida.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj trajanja tostiranja (60, 75 i 90 sekundi) na sadržaj akrilamida u različitim vrstama tost kruhova (pšenični, punozrnati, pirov, proteinski na bazi durum pšenice i raženi sa sjemenkama) te utvrditi prelaze li vrijednosti sadržaja akrilamida u tostiranom kruhu propisane referentne vrijednosti s obzirom na vrstu tost kruha i duljinu tostiranja (Uredba EK, 2017). U netostiranim uzorcima je određen sadržaj aminokiseline asparagin HPLC metodom, a na tostiranim uzorcima je instrumentalno određena tekstura, boja te udio suhe tvari, a provedeno je i senzorsko ocjenjivanje tostiranog kruha pomoću panela.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KRUH

Kruh je jedna od osnovnih namirnica ljudske prehrane, a povijest njegove konzumacije seže od samih početaka civilizacije (Albrecht i sur., 2010). Ono što danas poznajemo pod pojmom kruh, rezultat je tehnološkog napretka tijekom tisuća godina. Prema Pravilniku o žitaricama i proizvodima od žitarica (NN 81/16), kruh je pekarski proizvod proizveden miješanjem, oblikovanjem, fermentacijom i pečenjem tijesta umiješenog od brašna, vode, soli i pekarskog kvasca. Prema vrsti upotrijebljenih sastojaka ili vrste brašna, kruh može biti pšenični, raženi, kukuruzni, pirov, miješani ili neki iz skupine posebne vrste kruha. Prema metodi, proizvodnja kruha može se podijeliti na obrtničku, čija je proizvodnja u cijelosti ručna, i industrijsku, kojim se proizvodi svježi kruh, ispečen u tvornici ili dopečen kruh. Masa kruha mora biti veća od 250 g, a ukoliko je masa manja, riječ je o pecivu (Pravilnik, 2016).

Duga povijest i široka rasprostranjenost te namirnice utjecale su na nastanak različitih vrsta kruhova koji se međusobno razlikuju po obliku, veličini, teksturi, kori, boji, okusu i mirisu. Tako postoje tipične vrste za svako podneblje, primjerice talijanska ciabatta, francuski baget, švicarski ili finski raženi kruh, hamburger pecivo itd.

Osnovne sirovine za proizvodnju kruha su brašno, voda, pekarski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) i sol. Uz njih, mogu se dodati i pomoćne sirovine i poboljšivači u svrhu bolje strojne obradivosti, skraćivanja procesa miješenja, bolje kvalitete tijekom čuvanja, bolje arome, mekše strukture, odnosno općenito za poboljšanje fizikalnih, senzorskih i nutritivnih svojstava kruha.

U mlinske proizvode od pšenice ubrajaju se brašno, krupica i prekrupa, a dobivaju se mljevenjem krušne pšenice (*Triticum aestivum*), tvrde pšenice (*Triticum durum*), krupnika ili pira (*Triticum aestivum ssp. spelta*) i khorosana (*Triticum turgidum ssp. turanicum*) (Pravilnik, 2016).

U kemijskom sastavu najčešće korištenog pšeničnog brašna najveći udio zauzima škrob (70 – 75 %) koji ima bitnu ulogu za tvorbu strukture u pečenju zbog svojstva bubrenja, želatinizacije te retrogradacije. Ostatak čine voda (12 –14 %), proteini (10 –12 %), neškrobni polisaharidi, oligosaharidi i šećeri, u niskim koncentracijama lipidi (1 –2 %), mikronutrijenti i fitokemikalije. Kemijski sastav zrna, odnosno brašna varira ovisno o sorti, vremenskim prilikama i agronomskim uvjetima uzgoja (Serna-Saldivar, 2010).

Pšenično brašno u svojem sastavu sadrži gluten, smjesu dvaju u vodi netopivih proteina, gliadina i glutenina. Kod zamijesa tijesta (miješanja brašna s vodom) gliadin i glutenin vežu vodu, bubre i stvaraju trodimenzionalnu glutensku mrežu, gdje su molekule međusobno povezane disulfidnim, vodikovim i hidrofobnim vezama. Raznovrstnost nastalih veza doprinosi specifičnim kohezivno visoko-elastičnim svojstvima glutenske mreže. Zbog takvih svojstava, nastala glutenska mreža sposobna je zadržati plin ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) koji se stvara tijekom fermentacije u tijestu. Kvaliteta glutena ovisi o omjeru koncentracije gliadina i glutenina te se jedino prilikom optimalnih koncentracija može očekivati poželjna elastičnost i rastezljivost tijesta te posljedično i prozračan, mekan i ukusan proizvod (Novotni, 2011). Osim pšeničnog brašna, gluten se nalazi i u pirovom brašnu te u manjim količinama u ječmenom i raženom brašnu, a u zobi se nalazi u zrnju, no u specijaliziranim prodavaonicama moguće je pronaći zobeno brašno bez glutena (Čukelj, 2007). Niža koncentracija glutena očituje se u teksturi kruha koja je gruba i zbijena te se takva brašna često miješaju s pšeničnim kako bi se poboljšala ta senzorska svojstva.

Sol se dodaje za poboljšanje okusa proizvoda, ali i kako bi se pojačala glutenska mreža, kontrolirala brzina fermentacije i produljila trajnost proizvoda. Pekarski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) osigurava dizanje tijesta fermentirajući šećere glukozu i maltozu koji se prirodno nalaze u brašnu do etanola i CO<sub>2</sub>. Za pekarstvo se koriste svježi prešani, suhi aktivni te tekući s raznim varijacijama djelovanja, ovisno o poželjnim svojstvima konačnog proizvoda (Cauvain, 2003).

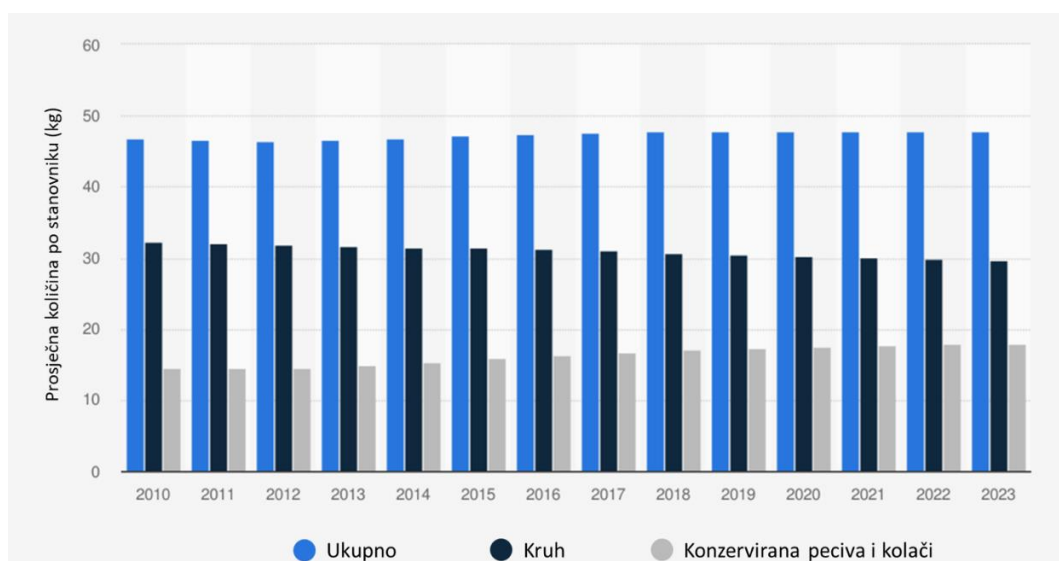
Voda se u sastavu tijesta može se nalaziti u slobodnom (interakcije sa škrobom) ili vezanom obliku (u sastavu glutena) (Gavrilović, 2011). Tijekom procesa pečenja kruha dolazi do različitih promjena uslijed kojih vlažno, neprobavljivo tijesto postaje lako probavljiv proizvod. Makroskopski gledano, pečenje kruha uzrokuje očvršćivanje tijesta, odnosno pretvorbe pjenaste strukture ispunjene molekulama plina u spužvastu strukturu kruha. Na temperaturama višim od 60 °C, dolazi do povećanja viskoznosti tijesta uslijed denaturacije proteina i oslobađanja vezane vode te bubrenja škroba. Zbog isparavanja vode, CO<sub>2</sub> i etanola, smanjuje se volumen tijesta i formira se stabilna struktura sredine kruha s porama manjim od < 3 μm koju čine denaturirani proteini i nabubreni i djelomično želatinizirani škrob. Potpuno učvršćivanje teksture postignuto je kada temperatura unutrašnjosti dosegne 95 °C. Hlađenjem kruha dolazi do reorganizacije škrobnih polisaharida i do pojave retrogradacije čija pojava uz migraciju vode ima ključnu ulogu u starenju kruha (Hug-Iten i sur., 1999).

Nutritivna vrijednost kruha ovisi o recepturi, prvenstveno o vrsti upotrijebljenog brašna, ali i samom procesu proizvodnje. Idealnim kruhom smatra se onaj koji je dobar izvor proteina i prehrambenih vlakana, vitamina, magnezija, elemenata u tragovima i antioksidansa te ima niski glikemijski indeks. Količina pojedinih nutrijenata (u 100 g kruha) u određenim vrstama kruha prikazana je u tablici 1.

**Tablica 1.** Procjena sastava pojedinih vrsta kruha (prema: Albrecht i sur., 2010)

nutrijent (u 100 g)	pšenični kruh iz cijelog zrna (integralni)	bijeli pšenični kruh	raženi kruh
<b>ugljikohidrati (g)</b>	41	48	48
<b>proteini (g)</b>	7	8	6
<b>prehrambena vlakna (g)</b>	8	4	6
<b>masti (g)</b>	1	1	1
<b>željezo (mg)</b>	2	1	3
<b>kalcij (mg)</b>	65	60	30
<b>vitamin B1 (µg)</b>	250	85	180
<b>vitamin B2 (µg)</b>	150	60	110

U Europi tržište kruha i pekarskih proizvoda čini 16,5 % ukupnog prehrambenog tržišta. Procjenjuje se da je prosječna godišnja potrošnja kruha i pekarskih proizvoda oko 50 kg po stanovniku što je prikazano na slici 1, koja prikazuje procjenu prosječne potrošnje kruha i pekarskih proizvoda (ukupno, kao i pojedinačno) u Europi u razdoblju od 2010. do 2023., temeljeno na podacima prikupljenim do 2018. godine.

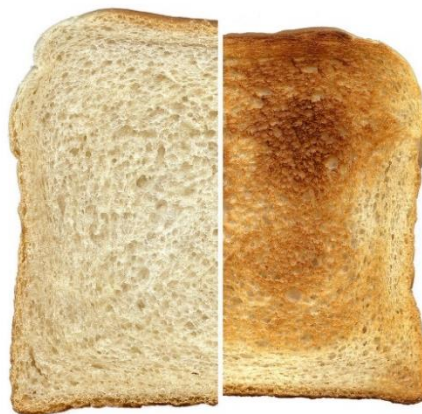


**Slika 1.** Prosječna potrošnja kruha i pekarskih proizvoda u Europi po stanovniku od 2010. do 2023. godine (Statista, 2019)

Drugi izvor procjenjuje da se u Europi konzumira oko 181 grama kruha na dan, što je za usporedbu oko 66 kg po stanovniku godišnje (Mandić Andačić i sur., 2020). Na prva tri vodeća mjesta po količini potrošnje kruha u danu su Bugarska (301 g), Češka (244 g) te Njemačka (219 g). Prema podacima Hrvatskog zavoda za statistiku, 2011. godine konzumacija je iznosila 73,9 kg po stanovniku godišnje, što je oko 202 g kruha i pekarskih proizvoda po stanovniku dnevno. Ćurić i suradnici (2013) procjenjuju da je godišnja potrošnja kruha u Hrvatskoj oko 80 kg po stanovniku, a u radu Mandić Andačić i suradnika (2020) iznose podatak o dnevnoj konzumaciji kruha i pekarskih proizvoda u količini od 167 g dnevno, što preračunato iznosi oko 60 kg proizvoda po stanovniku godišnje. Hrvatska agencija za hranu je tijekom 2011. i 2012. godine provela istraživanje “Prehrambene navike odrasle populacije u RH” te je na uzorku od 1942 ispitanika došla do srednje vrijednosti unosa kruha i pekarskih proizvoda od 153,52 g na dan.

### 2.1.1. Tost kruh

Tost je kruh produljene svježine, narezan i pretpakiran te namijenjen pečenju, odnosno tostiranju, a svrstava se u kategoriju posebnih vrsta kruha (Pravilnik, 2016). Karakteristično za tost je ujednačen, četverokutan oblik, svijetlosmeđa tanka kora, sredina mora biti ravnomjerna, fino porozna, a okus neutralan, pomalo sladak te hrskava i prhka tekstura. Trajnost tosta mora biti najmanje 6 dana, ali može se doseći i trajnost od par tjedana.



**Slika 2.** Prikaz razlike istog uzorka tost kruha prije i nakon tostiranja: netostirani (lijeva polovica slike) i tostirani tost (desna polovica slike) (Zenz, 2005)

Na slici 2 prikazana je promjena boje tosta prilikom tostiranja. Toplinskim tretmanom tostiranja dolazi do isparavanja vode te se stvaraju uvjeti pogodni za odvijanje Maillardovih reakcija i karamelizacije. To su kemijske reakcije neenzimskog posmeđivanja i najbitnije su reakcije u procesu proizvodnje pekarskih proizvoda (Capuano i sur., 2009). Tostiranjem, tost kruh

poprima smeđu boju, a uz to se pojavljuju i ostala poželjna senzorska svojstva tosta kao što su hrskava tekstura, miris i okus (Belkova i sur., 2021).

Povijest tostiranja kruha stara je gotovo kao i samo otkriće kruha kada su se šnite pekle na vrućem kamenju, na otvorenoj vatri ili pomoću raznih pomagala da bi se produžila trajnost i poboljšao okus kruha. Iako se konzumirao i u starom Egiptu i u antičkoj Grčkoj, posebnu popularnost stekao je u Rimskom Carstvu te odatle potječe njegov internacionalni naziv, koji je izvedenica iz latinske riječi *tostum* što znači izgorjeti, zapaliti. U Velikoj Britaniji se u 16. st. komadić pečenog tosta umakao u vrč piva ili vina kako bi se isprobao okus napitka i kako bi se eliminirali svi loši sastojci i time poboljšao okus napitka. Kasnije, u 18. st. tost se ubacivao u piće kako bi se odala čast osobi kojoj se nazdravljalo. Vremenom je taj običaj ubacivanja tost kruha u piće sasvim izostao, ali se zadržalo samo izgovaranje riječi *toast*, koja u ovom kontekstu prevedena na hrvatski znači *nazdravlje!*

Pojavom tosteru na tržištu (1926. godine) u Americi, popularnost tosta još je više porasla te je diljem Amerike i Europe postao i ostao nezaobilaznom namirnicom za doručak. O popularnosti tosta svjedoči činjenica da je sastavni dio tradicionalnog doručka u Ujedinjenom Kraljevstvu, dok je u Kanadi prema statističkim podacima tost kruh glavna namirnica u otprilike 30 % doručaka (Statista, 2014). Najčešće se konzumira premazan maslacem, no često se koriste i druge vrste namaza. Konzumiranje tostiranog kruha preporučuje se oboljelima od dijabetesa zbog nižeg glikemijskog indeksa od običnog kruha. Također, vrlo je učinkovit kod dijareje pa ga se preporučuje uvesti u prehranu uz bananu, rižu i pire od jabuke. Razlog tomu je nastanak retrogradiranog škroba tijekom hlađenja i starenja kruha koji usporava probavljanje škroba te on u takvom obliku prolazi neprobavljen kroz tanko crijevo (Katalinić, 2011).

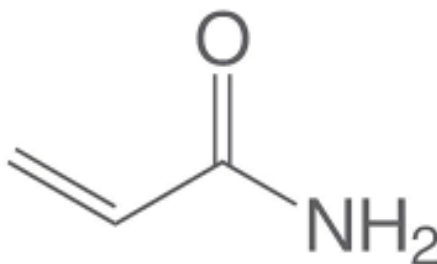
Princip rada većine tosteru na tržištu je isti, a to je zagrijavanje pomoću infracrvenih zraka koje emitira grijaće tijelo, najčešće nikromirana žica omotana oko metalne zavojnice. Većina uređaja ima ugrađene i električne senzore koji reguliraju trajanje tostiranja na način da se prilikom postizanja određene temperature prekida proces pečenja. Ovisno o načinu stavljanja tosta u uređaj, tosteri se dijele na horizontalne (preklopni toster) i vertikalne. Prema razini automatizacije, tosteri se mogu podijeliti na mehaničke (najjednostavniji u pogledu rada i dizajna, potrebno je ručno okretanje tosta prilikom pečenja), poluautomatske (termostatskim prekidačem se isključuje zagrijavanje i tostove je potrebno ručno izvaditi) i automatske (uz termostatski prekidač postoji i mjerač vremena te se nakon isteka odabranog vremena, tost

„izbacuje“ pomoću opruge). Snaga tostera varira između 500 i 1800 W, a temperature koje se postižu tijekom tostiranja su od 90 do 250 °C.

Na tržištu je najrašireniji tost od pšeničnog brašna, no uslijed povećane potražnje tržišta za nutritivno bogatijim proizvodima, mogu se naći i pšenični tost iz cijelog zrna, raženi tost sa sjemenkama, tost s krumpirovim tijestom, tost iz pirovog brašna ili brašna durum pšenice i drugi. U usporedbi s običnim bijelim kruhom, u tost se dodaje više masnoće, 5 – 7 % na količinu brašna te se time postiže mnogo finija i ujednačenija sredina, puniji i aromatičniji okus kao i duža svježina i sočnost proizvoda. Dodatak šećera u koncentraciji od 1 – 2 % na ukupnu količinu brašna omogućuje ujednačeno posmeđivanje te postizanje karakterističnog okusa. Prema recepturi, dodaje se mlijeko koje čini 1/3 tekućine za zamjes ili 20 – 40 g na 1 kg brašna ukoliko se koristi mlijeko u prahu čime sredina tosta postaje finija, nježnija, okus puniji, a sam proizvod duže ostaje sočan. Za zaštitu od plijesni, tijestu za tost se dodaje kiselina u obliku konzervansa ili kiselog tijesta. Razlika u samom procesu proizvodnje je duže vrijeme miješenja tijesta nego za pripremu običnog kruha (Albrecht i sur., 2010) te korištenje kalupa s poklopcem prilikom pečenja. Najčešće se koriste linijske peći, a temperatura grijača je  $250 \pm 10$  °C, no budući da je riječ o linijskim pećima, toplina se raspodijeli po pećnici i pada prema izlazu. Vrijeme pečenja je oko 45 min, što je malo duže od klasičnog kruha (oko 30 min) (Magdić i sur., 2000).

## 2.2. AKRILAMID

Akrilamid (AA) je čvrsta tvar bijele boje, bez mirisa, molekulske mase  $71,08 \text{ g mol}^{-1}$  (Šarkanj i sur., 2010). Kemijska formula je  $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ , odnosno IUPAC-ovom nomenklaturom je to 2-propenamid (slika 3). Akrilamid ima dvije funkcionalne skupine, amidnu i vinilnu što mu omogućuje sudjelovanje u različitim reakcijama (EFSA, 2015). Zbog svoje polarnosti, jako je dobro topiv u vodi, etanolu i metanolu, a slabije topiv u kloroformu (Eriksson, 2005).



**Slika 3.** Kemijska strukturna formula akrilamida (EFSA, 2015)

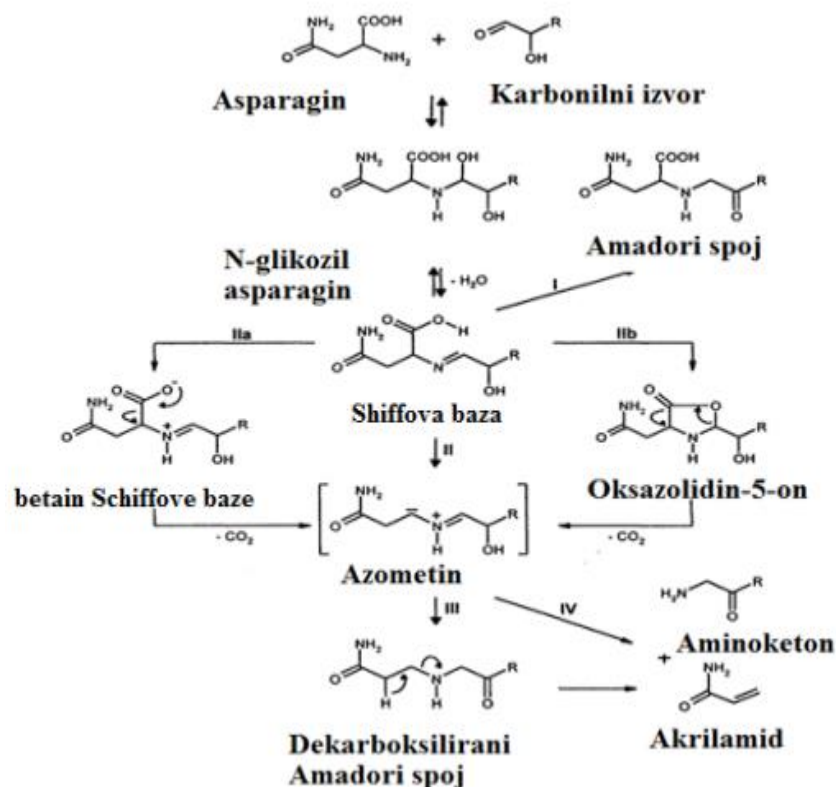
### 2.2.1. Mehanizmi nastajanja akrilamida u hrani

Akrilamid, osim industrijskim načinima dobivanja, može nastati i u procesu pripreme hrane. Iako točan mehanizam nastajanja akrilamida još uvijek nije u potpunosti definiran, poznato je da nastaje u Maillardovim reakcijama neenzimskog posmeđivanja hrane u kojoj sudjeluju slobodna aminokiselina asparagin (Asn) (najčešće) i reducirajući šećer (Eriksson, 2005). Maillardove reakcije odvijaju se tijekom termičke obrade hrane ili skladištenja i uzrokuju degradaciju proteina te mijenjaju njihovu probavljivost i dostupnost. Optimalni uvjeti za njihovo odvijanje su neutralno do blago lužnato područje pH, srednji sadržaj vlage (aktivitet vode 0,5 – 0,8) i temperatura iznad 120 °C, no mogu se odvijati i pri znatno nižim temperaturama, već pri 50 °C (Kutzli i sur., 2021). Završni produkti Maillardovih reakcija su smeđi pigmenti melanoidini te ovisno o kojoj vrsti namirnice se radi, oni mogu biti poželjni ili ne. Kod pečenja pekarskih proizvoda, mesa ili prženja kave, nastanak boje i arome melanoidina predstavlja pozitivnu pojavu, no bitno je spriječiti te reakcije kada promjene negativno utječu na kvalitetu proizvoda.

Maillardove reakcije mogu se podijeliti u tri faze. Inicijalna faza započinje reverzibilnom reakcijom kondenzacije aldoze s aminom, pri čemu uz izdvajanje vode nastaje Schiffova baza, koja prelazi u N-supstituirani glikozamin. Nakon toga dolazi do ireverzibilne Amadori pregradnje (ili Heynsove pregradnje ukoliko je početni šećer ketoza) koja je katalizirana kiselinom i događa se spontano već pri 25 °C. U drugoj fazi stvaranja međuprodukata dolazi do dehidracije i fragmentacije šećera te degradacije amino kiselina, odnosno Streckerove degradacije. Dehidracija šećera može se odvijati u kiselim uvjetima pa nastaje furfural, dok u neutralnim ili alkalnim uvjetima nastaju reduktoni. Dealdolizacijom ili oksidacijskim cijepanjem dolazi do fragmentacije šećera pa nastaju produkti: glikoaldehid, gliceraldehid, acetol, dihidroksiaceton, etanol, propanol, octena, mliječna i mravlja kiselina, formaldehid itd. U Streckerovoj degradaciji se aminokiseline oksidiraju do aldehida, CO<sub>2</sub> ili amonijaka koji se odmah transformira u druge spojeve. U trećoj fazi nastaju obojeni produkti i to u reakciji aldolne kondenzacije gdje aldehidi nastali u prethodnim fazama međusobno reagiraju te nastaju benzokvinoni koji dalje sudjeluju u reakcijama nastanka melanoidina. U finalnoj fazi melanoidini nastaju i reakcijom aldehyd-amin kondenzacije i to već pri niskim temperaturama. Melanoidini su polimeri visoke molekulske mase koji u svojem sastavu sadrže heterociklički prsten poput piridina, pirazina i imidazola te oko 3 – 4 % dušika (Nursten, 2005).



Postoji više predloženih glavnih puteva nastanka akrilamida. Mottram i suradnici (2002) smatraju da je to Streckerova degradacija, Lineback i sur. (2012) kao glavni put nastanka akrilamida predlažu razgradnju šećera kataliziranu aminokiselinama, a spominje se i Asparagin put (slika 4) koji predviđa reakciju karbonilnih spojeva s asparaginom te nastanak N-glikozilasparagina koji dehidracijom postaje Schiffova baza. Dekarboksilacijom Schiffove baze nastaje azometin iz kojeg eliminacijom imina nastaje akrilamid, a druga mogućnost je da iz Schiffove baze nastane Amadori produkt čijom dekarboksilacijom nastaje akrilamid (Taeymans i sur., 2004).

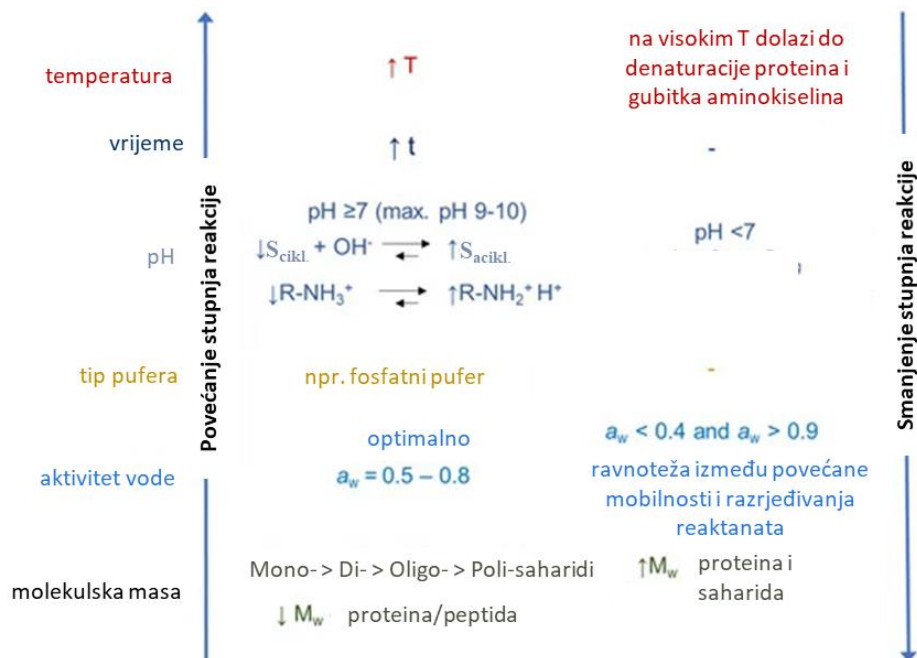


**Slika 4.** Nastanak akrilamida iz asparagina u prisutnosti  $\alpha$ -hidroksikarbonila (Mandić Andačić, 2019)

### 2.2.2. Čimbenici koji utječu na nastanak akrilamida u hrani

Na količinu nastalog akrilamida utječu temperatura i vrijeme zagrijavanja, prisutnost vode, pH i koncentracija prisutnog slobodnog asparagina i reducirajućih šećera (Ahrné i sur., 2007). Stadler i suradnici (2002) utvrdili su povećanje nastanka akrilamida porastom temperature od 120 °C do 170 °C, nakon čega slijedi pad u njegovom nastanku. Razlog tomu je djelomična

eliminacija akrilamida pri temperaturama višim od 160 °C, a njegova rezidualna količina ovisi o temperaturi i trajanju izlaganja (Wedzicha i sur., 2005). Neka istraživanja potvrđuju da se može formirati i na temperaturama ispod 100 °C, posebice u postupku sušenja na 65 – 130 °C (Eriksson, 2005). Temperatura pri kojoj dolazi do nastanka akrilamida nije specifična već ovisi o sadržaju vlage u hrani (EFSA, 2015). Elmore i suradnici (2005) su istraživali utjecaj vode na nastanak akrilamida te zaključili da se tijekom toplinske obrade tijesta količina vode smanjuje, a sadržaj akrilamida povećava, ali samo kod intenzivnog zagrijavanja, kada unutrašnja temperatura tijesta prelazi 100 °C. Maksimalna vrijednost nastanka akrilamida dostignuta je pri pH 7 ili višem (Elbashir i sur., 2014), a razlog tome je što su općenito Maillardove reakcije ovisne o pH vrijednosti, jer su pri nižim pH vrijednostima amino grupe aminokiseline kao pekursora protonirane i prema tome nedostupne za daljnje reakcije. Na slici 5 prikazan je utjecaj različitih parametara na Maillardove reakcije, a time i nastanak akrilamida. Intenzitet Maillardovih reakcija povećava se ako su reaktanti manje molekulske mase, aktivitet vode 0,5 – 0,8 kao i postojanje npr. fosfatnog pufera u sustavu. Također, intenzitet im se povećava pri pH vrijednosti većoj ili jednakoj 7 (maksimalno do 10), produljenjem trajanja toplinske obrade i pri povišenim temperaturama (do određene granice, prije nego dođe do denaturacije proteina i gubitka aminokiselina) (Kutzli i sur., 2021).



**Slika 5.** Shematski prikaz utjecaja različitih parametara na stupanj Maillardove reakcije ( $M_w$ : molekulska masa,  $a_w$ : aktivitet vode,  $S_{\text{cikl.}}$ : ciklički saharidi,  $S_{\text{acikl.}}$ : aciklički saharidi (prema: Kutzli i sur., 2021)

Prekursori akrilamida su aminokiseline (asparagin, alanin, arginin, cistein, glutamin i metionin) i mono ili disaharidi (reducirajući šećeri glukoza i fruktoza i nereducirajući šećeri poput saharoze) (Xu i sur., 2014). Od spomenutih aminokiselina najveću tendenciju za interakciju sa šećerima ima asparagin (Mottram i sur., 2002). Potvrdu o ključnoj ulozi asparagina u nastajanju akrilamida u hrani dali su rezultati istraživanja koje su proveli Zyzak i suradnici (2003), koji ukazuju na to da je amino skupina bočnog lanca asparagina uklopljena u amidnu vezu nastalog akrilamida. Rezultati istraživanja o utjecaju reducirajućih šećera na nastanak akrilamida daju različite rezultate. Istraživanja Stadlera i suradnika (2002) ukazuju na to da su keto šećeri kao što je fruktoza učinkovitiji od aldehid šećera (npr. glukoze) što se objašnjava višom reaktivnosti fruktoze uslijed niže točke taljenja i veće molekulske pokretljivosti, dok Eriksson (2005) to pripisuje činjenici da fruktoza ima dvije  $\alpha$ -hidroksilne grupe. S druge strane, rezultati Schieberlea i suradnika (2005) dobiveni grijanjem jednake smjese asparagina i pet različitih monosaharida te dva disaharida, pokazali su kako najveći utjecaj na nastanak akrilamida ima glukoza. Isto tako, pokazali su da i nereducirajući šećeri poput saharoze mogu sudjelovati u nastanku akrilamida, a razlog tome je što ona hidrolizira pod utjecajem topline, pri čemu nastaju reducirani monosaharidi.

### 2.2.3. Toksičnost i kancerogenost akrilamida

Međunarodna agencija za istraživanje raka svrstala je akrilamid u grupu 2A, odnosno spojeve potencijalno kancerogene za ljude (IARC, 1994). Zbog sumnje da uzrokuje karcinom kod ljudi, akrilamid predstavlja važan zdravstveni problem (JECFA, 2011). Neurotoksičnost akrilamida je jedini toksični učinak koji je dokazan na ljudima (Zamani i sur., 2017), dok su razvojna i reproduktivna toksičnost i kancerogenost zamijećeni samo kod glodavaca (EFSA, 2015). Prilikom unosa akrilamida u organizam štakora, on se distribuira u različita tjelesna tkiva: mišiće, kožu, krv, jetra, a mali postotak nađen je u mozgu i leđnoj moždini (Matoso i sur., 2019). Tijekom metabolizma, akrilamid se prevodi u glicidamid koji može djelovati kao snažan agens koji oštećuje DNA (Maan i sur., 2020). Europska agencija za sigurnost hrane EFSA (engl. European Food Safety Authority) je svoje mišljenje o izloženosti akrilamidu putem prehrane i riziku nastanka raka donijela na temelju 36 publikacija proizašlih iz 16 epidemioloških istraživanja, uzimajući u obzir različite vrste raka. U većini slučajeva nema dosljednih dokaza o povezanosti rizika od nastanka raka i izloženosti akrilamidu. Nekoliko istraživanja ukazuje na povećani rizik od raka bubrežnih stanica, raka jajnika i endometrija te na niži stupanj prebolijevanja raka dojke kod žena nepušača koje su prije dijagnoze unosile visoke koncentracije akrilamida putem hrane. U svakom slučaju, može se zaključiti da trenutni

epidemiološki i toksikološki dokazi nisu dovoljni da bi se akrilamid proglasio kancerogenim za ljude, no svakako su potrebna dodatna istraživanja kako bi se to moglo i sigurno dokazati (EFSA, 2015; Lipworth i sur., 2013).

### **2.3. PRISUTNOST AKRILAMIDA U RAZLIČITOJ HRANI**

Unos akrilamida u organizam moguć je iz različitih izvora kao što su voda, tlo, duhanski dim (Smith i sur., 2000), zrak, kozmetički proizvodi i ambalaža (Zhang i Zhang, 2007), no najznačajniji unos je putem hrane. O njegovom prisustvu u određenim kategorijama hrane, prva je izvijestila Švedska nacionalna agencija za hranu (SNFA, 2002). Oni su prilikom istraživanja o akrilamidu u duhanskom dimu zamijetili njegovu visoku razinu u krvi osoba koje su pripadale kontrolnoj skupini, odnosno nepušačima te se počela ispitivati mogućnost unosa akrilamida putem hrane, što je kasnije i potvrđeno (Tareke i sur., 2002). Isti tim suradnika, Tareke i sur., (2002), zaključio je da se radi o hrani bogatoj ugljikohidratima, obrađenoj na visokoj temperaturi. U tablici 2 prikazane su referentne vrijednosti razine akrilamida u hrani na koju treba usmjeriti pozornost zbog prisutnosti visokih koncentracija akrilamida (Uredba EK, 2017).

Akrilamid se u hrani nalazi isključivo kao rezultat obrade hrane, nikako kontaminacijom iz okoliša. Također, nije pronađen u sirovoj, kuhanoj ili hrani obrađenoj u mikrovalnoj pećnici, a vrlo male količine su pronađene u hrani životinjskog podrijetla (Eriksson, 2005). Najviše ga se može naći u termički obrađenim proizvodima biljnog porijekla kao što su proizvodi od krumpira (čips i pomfrit), proizvodi od žitarica (kruh, keksi, žitarice za doručak) i kava (EFSA, 2015). Razlog tome je što oni sadrže prirodno prisutne prekursore potrebne za nastanak akrilamida, ali i visoka temperatura kojoj su svi spomenuti proizvodi podvrgnuti prilikom procesa proizvodnje (Rydberg i sur., 2005). EFSA (2015) procjenjuje da se prosječna izloženost akrilamidu putem hrane za odrasle, adolescente i starije osobe kreće u rasponu od 0,6 do 2,0 µg po kilogramu tjelesne mase u danu. Zabrinjavajuće je što je kod djece i adolescenata izloženost, kada se uračuna prosječna tjelesna masa, viša u odnosu na odrasle (Dybing i sur., 2005) i iznosi između 0,5 – 1,9 µg po kilogramu tjelesne mase u danu (EFSA, 2015).

U prehrambenoj industriji na globalnoj razini javlja se tendencija smanjivanja akrilamida te je pripremljen vodič o strategiji smanjenja udjela akrilamida u određenim kategorijama hrane. Pripremila ga je organizacija FoodDrinkEurope koja zastupa Europsku prehrambenu industriju (FDE, 2013). Razvoj strategije vrlo je izazovan iz razloga što s jedne strane nastajanje akrilamida u prehrambenom proizvodu treba svesti na najmanju moguću razinu, a s druge

strane, potrebno je zadržati poželjna organoleptička svojstva gotovog proizvoda (Stadler i Struder, 2016). U najnovijem izdanju vodiča (Acrylamide Toolbox 2019), u 4 grupe razvrstano je 14 parametara pomoću kojih se može utjecati na koncentraciju akrilamida u hrani. Glavne grupe su usmjerene na: agronomski aspekt sirovina, odnosno odabir sorti s manjim udjelom prekursora (asparagina i reducirajućih šećera), oblikovanje recepata i postupaka pripreme, uvjete procesiranja (podešavanje parametara Maillardovih reakcija) i završnu preradu kod krajnjih korisnika. Bitno je naglasiti da se ne mogu svi parametri koristiti za sve kategorije proizvoda.

**Tablica 2.** Prikaz referentnih vrijednosti za razinu akrilamida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u hrani (prema Uredbi EK, 2017)

Prehrambeni proizvod	Referentne vrijednosti [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]
<b>Pomfrit</b>	500
<b>Čips od svježih krumpira i krumpirovog tijesta</b> <b>Krekeri na bazi krumpira</b> <b>Ostali proizvodi od krumpirova tijesta</b>	750
<b>Meki kruh</b>	
a) kruh na bazi pšenice	50
b) meki kruh koji nije na bazi pšenice	100
<b>Žitarice za doručak (osim kaše od zobnih pahuljica)</b>	
a) proizvodi od posija i žitarice od cjelovitog zrna, ekspanzirane žitarice	300
b) proizvodi na bazi kukuruza, zob, pira, ječma i riže	150
c) proizvodi na bazi pšenice i raži	300
<b>Keksi i vafli</b>	350
<b>Krekeri osim krekeri na bazi krumpira</b>	400
<b>Hruskavi kruh</b>	350
<b>Medenjaci začinjani đumbirom</b>	800
<b>Proizvodi slični drugim proizvodima iz ove kategorije</b>	300
<b>Pržena kava</b>	400
<b>Instant (topljiva) kava</b>	850
<b>Zamjene za kavu</b>	
a) zamjene za kavu isključivo na bazi žitarica	500
b) zamjene za kavu isključivo na bazi cikorijske	4000
<b>Dječja hrana, prerađena hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu, osim keksa i dvopeka</b>	40
<b>Keksi i dvopek za dojenčad i malu djecu</b>	150

## 2.4. AKRILAMID U KRUHU I OSTALIM PEKARSKIM PROIZVODIMA

Pekarski proizvodi čine skup različitih proizvoda kojima je osnova za proizvodnju brašno od različitih vrsta žitarica, a međusobno se razlikuju zbog različitih omjera sastojaka koji se koriste u proizvodnji i različitih metoda pripreme koje se primjenjuju (Mandić Andačić, 2019). Udio akrilamida u pekarskim proizvodima može varirati od nezamijećene količine kao npr. u krušnim mrvicama, niskih udjela u kruhu i pecivima ( $5 - 160 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), izuzetak je hruskavi kruh koji sadrži značajne udjele akrilamida ( $<30 - 2085 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) pa do više od  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$  u krekerima i kolačima. Za tost kruh literatura govori o širokom rasponu detektiranih koncentracija akrilamida ( $<30 - 1430 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Mesias i Morales, 2016). Referentne vrijednosti za razinu akrilamida u pojedinim pekarskim proizvodima propisani su Uredbom Europske komisije i prikazani u tablici 3. Akrilamid je u većini pekarskih proizvoda prisutan samo u kori jer prilikom pečenja voda vrlo brzo isparava iz površinskih slojeva tijesta, pa temperatura u kori, za razliku od unutrašnjih dijelova, može doseći vrlo visoke vrijednosti koje omogućuju odvijanje Maillardovih reakcija i stvaranje akrilamida (Vanin i sur., 2009).

### 2.4.1. Unos akrilamida putem pekarskih proizvoda

EFSA (2011) je izvijestila da unos akrilamida putem kruha i pekarskih proizvoda može iznositi od 20 % do 60 % ukupnog prosječnog unosa akrilamida, što odgovara rasponu od  $0,13 \mu\text{g}$  do  $0,31 \mu\text{g}$  po kilogramu tjelesne mase u danu za odrasle potrošače. Mandić Andačić i suradnici (2020) proveli su istraživanje o izloženosti akrilamidu putem kruha i pekarskih proizvoda za odraslu hrvatsku populaciju i utvrdili da se dnevno putem kruha i pekarskih proizvoda unosi oko  $0,16 \mu\text{g}$  akrilamida po kilogramu tjelesne mase u danu. Budući da za Hrvatsku ne postoji podatak o ukupnoj izloženosti akrilamidu putem prehrane, nije moguće odrediti postotak unosa akrilamida putem pekarskih proizvoda. Slično istraživanje proveli su Mojska i suradnici (2010) koji su zaključili da je izloženost Poljaka akrilamidu oko  $0,19 \mu\text{g}$  po kilogramu tjelesne mase u danu što čini 45 % ukupne izloženosti akrilamidu putem prehrane. Uzimajući u obzir sličnost tog istraživanja i njihove podatke, Mandić Andačić i suradnici (2020) zaključili su da je doprinos kruha i pekarskih proizvoda ukupnoj izloženosti akrilamidu za hrvatsko stanovništvo oko 37,2 % ukupnog unosa akrilamida, što je u rasponu dozvoljenog unosa kojeg je propisala EFSA.

### 2.4.2. Čimbenici koji utječu na stvaranje akrilamida u pekarskim proizvodima

Konačni sadržaj akrilamida u gotovom pekarskom proizvodu najviše ovisi o upotrijebljenim sirovinama budući su one izvor prekursora za stvaranje akrilamida, ali i o samim uvjetima

toplinske obrade (temperatura, vrijeme), jer o njima ovisi stupanj Maillardovih reakcija (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016). U proizvodima od žitarica je brašno glavni izvor slobodnog asparagina i kako je njegova koncentracija znatno niža od koncentracije reducirajućih šećera (Keramati i sur., 2011), udio asparagina predstavlja limitirajući faktor za nastanak akrilamida (Claus i sur., 2008). Asparagin je prisutan u svim žitaricama, a njegova koncentracija u sirovini ovisi o vrsti žitarice, kasnije brašna, sorti, stupnju ekstrakcije brašna, godini žetve, obradi tla (gnojidbi) te klijanju. Procjena prisutnosti asparagina u različitim vrstama žitarica i njihovim frakcijama prikazane su u tablici 3 (Mandić Andačić, 2019). Ražena brašna sadrže više asparagina od ostalih brašna zbog visokog udjela prehrambenih vlakana i pepela (Capuano i sur., 2009). Isto tako, brašna od cjelovitog zrna imaju više asparagina u odnosu na prosijana. Najviši udio asparagina je u pšeničnoj klici jer klijanjem zrna dolazi do degradacije škroba i proteina pri čemu se oslobađaju prekursori akrilamida (Mesias i Morales, 2016).

**Tablica 3.** Količina asparagina prisutna u različitim vrstama žitarica i njihovim frakcijama (prema: Mandić Andačić, 2019)

Žitarica	Asparagin (mg kg <sup>-1</sup> )
<b>pšenično zrno</b>	190-374
<b>pšenične mekinje</b>	911-1480
<b>pšenične klice</b>	4900
<b>pšenično brašno</b>	115-500
<b>cjelovito pšenično brašno</b>	255-450
<b>zobeno zrno</b>	55-1400
<b>zobeno brašno</b>	500
<b>kukuruzno brašno</b>	600-1070
<b>raženo zrno</b>	1070
<b>raženo brašno</b>	320-880
<b>ražene mekinje</b>	3000
<b>cjelovito raženo brašno</b>	1100
<b>rižino zrno</b>	230
<b>rižino brašno</b>	15-75
<b>pirovo brašno</b>	105-600
<b>zrno durum pšenice</b>	430-840

Primjena enzima asparaginaze se pokazala jednim od najučinkovitijih načina smanjenja udjela akrilamida u proizvodima od žitarica. Primjenom asparaginaze može se postići smanjenje udjela akrilamida za čak 35 – 90 %, ovisno o vrsti proizvoda te količini dodanog enzima i trajanju termičke obrade (Curtis i Halford, 2016).

Surdyk i suradnici (2004) zaključili su da dodatak fruktoze pšeničnome kruhu ne utječe na promjenu sadržaja akrilamida u proizvodu, dok su Gökmen i suradnici (2007) uočili da povećanje količine saharoze u proizvodu s 10 na 35 grama u receptu za kolačiće rezultira nastajanjem gotovo dvostruko veće količine akrilamida tijekom pečenja. U vodiču se navodi da je uspješna mjera smanjenja nastajanja akrilamida zamjena fruktoze ili sastojaka koji sadrže fruktozu (sirup, med) s glukozom ili nereducirajućim šećerima (FDE, 2019).

Sredstva za dizanje tijesta također mogu utjecati na krajnju koncentraciju akrilamida u proizvodu. Najčešće se koriste pekarski kvasac ili kemijski spojevi natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) i amonijev hidrogenkarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Za amonijev hidrogenkarbonat je potvrđeno da potiče nastanak akrilamida poticanjem fragmentiranja šećera, a s time i nastanak glioksala i gliceraldehida koji formiraju više akrilamida u reakciji s asparaginom (Amrein, 2005; Amrein i sur., 2004). Na udio akrilamida utječu i masti i ulja koja se dodaju zbog organoleptičkih svojstava kruha, a istraživanja Capuano i suradnika (2009) ukazala su na više udjele akrilamida u proizvodima u kojima je korišteno suncokretovo ulje od onih s palminim uljem. Od ostalih sastojaka tijesta, sol ima znatan inhibicijski učinak na stvaranje akrilamida u pekarskim proizvodima tijekom toplinske obrade, no prevelike količine soli mogu poništiti taj učinak (Claus i sur., 2008). Osim navedenog, lakto-fermentacija koja se koristi kod tehnologije kiselog tijesta dovodi do smanjenja udjela akrilamida, vjerojatno zbog snižavanja pH vrijednosti (Claus i sur., 2008), kao i duljina fermentacije koja može značajno smanjiti nastanak akrilamida čak za 60 – 90 % (Fredriksson i sur., 2004).

Od procesnih parametara su za nastanak većih količina akrilamida u pekarskim proizvodima najviše zaduženi visoka temperatura i vrijeme pečenja kao i sam način prijenosa topline, odnosno vrsta pećnice (Claus i sur., 2008). Osim navedenog, nastanku pogoduju i svi ostali parametri potrebni za odvijanje Maillardovih reakcija. Boja površine (kore) gotovog proizvoda smatra se ključnim faktorom u senzorskoj analizi (Pedreschi i sur., 2006), a usko je povezana i s udjelom akrilamida, posebno pri temperaturama pripreme iznad 200 °C (Keramat i sur., 2011). Pri višim temperaturama i duljem vremenu pečenja razvija se intenzivnija smeđa boja na površini kruha, kao i veće količine nastalog akrilamida (Gökmen i sur., 2008).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za potrebe ovog istraživanja koristilo se pet različitih vrsta tost kruhova: a) pšenični, b) punozrnati, c) pirov, d) proteinski i e) raženi (slika 6). Svi uzorci su od istog proizvođača Žito d.o.o. iz Ljubljane, dobiveni direktno iz njihovog proizvodnog pogona. Prosječne hranjive vrijednosti preuzete su s deklaracije proizvoda i navedene u tablici 4. Do upotrebe su uzorci bili skladišteni na suhom i hladnom mjestu, a nakon otvaranja premješteni u hladnjak te iskorišteni sljedećeg dana.



a) Pšenični tost



b) Punozrnati pšenični tost



c) Pirov tost



d) Proteinski tost



e) Raženi tost sa sjemenkama

**Slika 6.** Prikaz različitih vrsta tost kruha (vlastita fotografija)

**Tablica 4.** Prosječni kemijski sastav različitih vrsta tost kruha (deklaracija proizvoda)

Prosječna hranjiva vrijednost za 100 g tosta	PŠENIČNI	PUNOZRNATI PŠENIČNI	PIROV	PROTEINSKI	RAŽENI SA SJEMENKAMA
<b>energija</b>	1166 kJ / 275 kcal	1207 kJ / 286 kcal	1146 kJ / 272 kcal	1024 kJ / 242 kcal	1420 kJ / 339 kcal
<b>masti</b>	2,6 g	4,7 g	5,0 g	2,6 g	11 g
<b>od kojih zasićene masne kiseline</b>	0,5 g	0,7 g	2,1 g	0,49 g	2,6 g
<b>ugljikohidrati</b>	52 g	45 g	42 g	35 g	42 g
<b>od kojih šećeri</b>	5,4 g	4,3 g	4,1 g	3,5 g	4,5 g
<b>vlakna</b>	2,5 g	6,3 g	5,4 g	3,3 g	14 g
<b>bjelančevine</b>	9,8 g	13 g	12 g	18 g	11 g
<b>sol</b>	1,2 g	1,2 g	1,3 g	1,11 g	1,2 g
<b>SASTOJCI</b>	pšenično bijelo brašno, voda, kiselo tijesto, kvasac, obrano mlijeko u prahu, suncokretovo ulje, šećer, kuhinjska sol, fermentirano pšenično brašno, regulator kiselosti E 575, askorbinska kiselina	pšenično brašno od cjelovitog zrna 56 %, voda, kiselo tijesto, raženo brašno, pšenični gluten, kvasac, obrano mlijeko u prahu, suncokretovo ulje, kuhinjska sol, šećer, fermentirano pšenično brašno, regulator kiselosti E 575, askorbinska kiselina	pšenično brašno od cjelovitog zrna pira 41 %, voda, pšenično brašno od pira 27 %, kiselo tijesto, palmino ulje, kvasac, obrano mlijeko u prahu, fermentirano pšenično brašno, regulator kiselosti E 575, askorbinska kiselina	krupica od durum pšenice, voda, pšenični gluten, mliječne bjelančevine, kvasac, fermentirano pšenično brašno, regulator kiselost E 575, askorbinska kiselina, pšenično durum kiselo tijesto, suncokretovo ulje, kuhinjska sol, šećer	raženo brašno 26,5 %, pšenično brašno, voda, sjemenke 15 % (suncokret 6 %, lan 6 %, sezam 3 %), kiselo tijesto, pšenični gluten, palmina mast, kvasac, obrano mlijeko u prahu, šećer, kuhinjska sol, fermentirano pšenično brašno, regulator kiselosti E 575, askorbinska kiselina

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprema uzoraka

Za toplinsku obradu uzoraka (tostiranje) korišten je vertikalni toster TECHNO, marke Brandani, Italija, jačine 800W sa 6 različitih stupnjeva jačine (slika 7). Promjenjiva varijabla u ovom eksperimentu bila je vrijeme, a tostiranje je provedeno na prvom stupnju jačine toster. Kako bi uvjeti toplinske obrade bili ujednačeni, prvi se uzorak nije uzimao u daljnju analizu, zbog zagrijavanja grijača toster na radnu temperaturu. Svaka vrsta tost kruha tostirana je u 3 serije, a vrijeme tostiranja bilo je 60, 75 i 90 s. Između svake serije napravljena je pauza od 3

minute kako bi se osiguralo da grijači tijekom svake serije budu na približno jednakoj temperaturi. Radi jednostavnijeg prikaza podataka svakom uzorku dodijeljena je oznaka, a tumačenje oznaka prikazano je u tablici 5.

**Tablica 5.** Tablica oznaka pojedine vrste tosta s obzirom na duljinu tostiranja

<b>VRSTA TOSTA</b>	<b>DULJINA TOSTIRANJA (SEKUNDE)</b>	<b>OZNAKA</b>
<b>PŠENIČNI</b>	netostirani	<b>A0</b>
	60	<b>A60</b>
	75	<b>A75</b>
	90	<b>A90</b>
<b>PUNOZRNATI</b>	netostirani	<b>B0</b>
	60	<b>B60</b>
	75	<b>B75</b>
	90	<b>B90</b>
<b>PIROV</b>	netostirani	<b>C0</b>
	60	<b>C60</b>
	75	<b>C75</b>
	90	<b>C90</b>
<b>PROTEINSKI</b>	netostirani	<b>D0</b>
	60	<b>D60</b>
	75	<b>D75</b>
	90	<b>D90</b>
<b>RAŽENI</b>	netostirani	<b>E0</b>
	60	<b>E60</b>
	75	<b>E75</b>
	90	<b>E90</b>

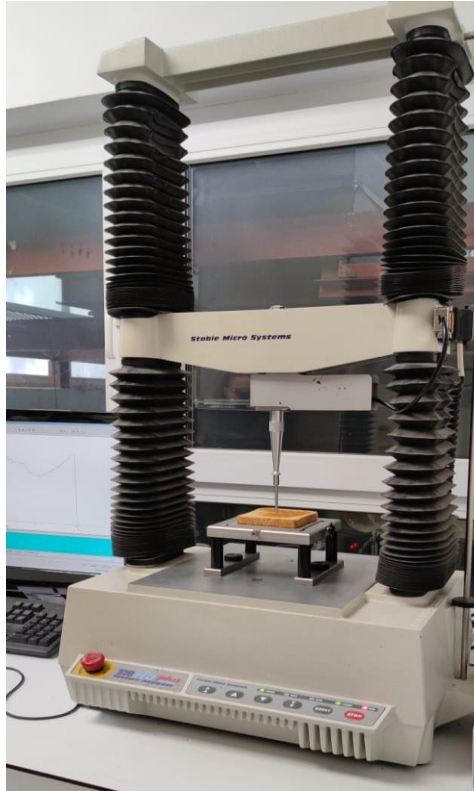


**Slika 7.** Toster TECHNO (Brandani, Italija) (vlastita fotografija)

Za potrebe određivanja koncentracije akrilamida i suhe tvari, uzorci su usitnjeni električnom sjeckalicom Pimmy 350W (Ariete, Firenca).

### 3.2.2. Određivanje teksture

Za određivanje teksture korišten je teksturometar marke Texture Analyser, tip TA.HDPlus (Stable Micro Systems, Velika Britanija) prikazan na slici 8. Prije samog određivanja teksture, odabran je odgovarajući program rada te su podešeni radni parametri (brzina, dubina i sila prodiranja sonde). Za tostirane uzorke tekstura je određena pomoću penetracije sonde. Neposredno nakon tostiranja, tost kruh postavljen je na podlogu uređaja te se penetracija radila na 3 različita mjesta. Pri tome je mjernim senzorom praćen otpor koji se javlja u materijalu uzorka uslijed prodiranja sonde kroz uzorak, a rezultati su prikazani na računalu pomoću službenog programa TE 32 Texture Exponent. Tekstura je određena i nakon potpunog hlađenja uzoraka.



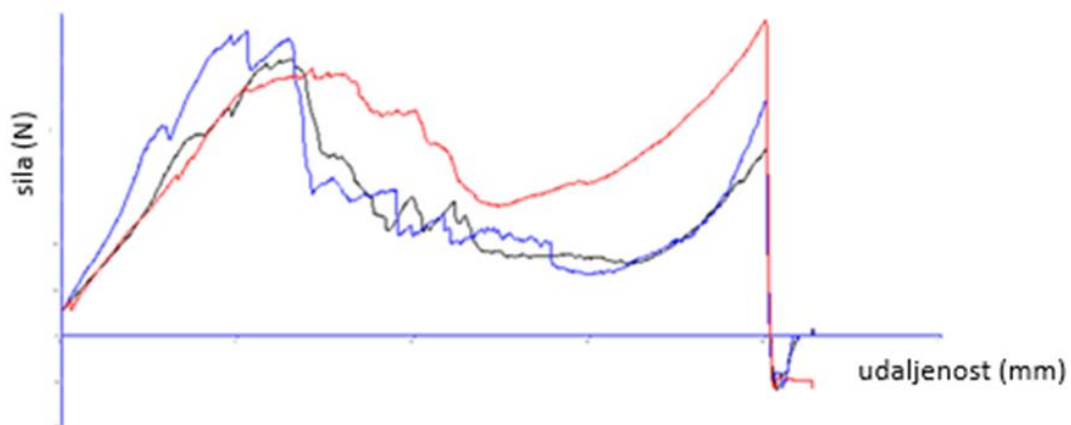
**Slika 8.** Analizator teksture TA.HDPlus, Stable Micro Systems, Velika Britanija (vlastita fotografija)

Radni parametri određivanja teksture tostiranih uzoraka penetracijom:

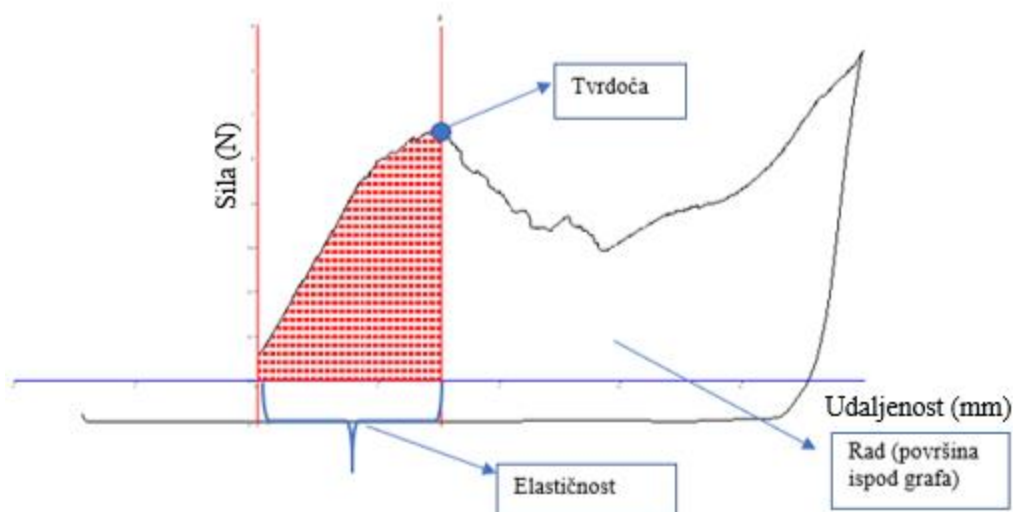
- Promjer sonde: 2 mm
- Mjerna ćelija: 5 kg
- Pre-test brzina prodiranja sonde:  $1 \text{ mm s}^{-1}$
- Test brzina prodiranja sonde:  $0,5 \text{ mm s}^{-1}$
- Post-test brzina prodiranja sonde:  $10 \text{ mm s}^{-1}$
- Dubina prodiranja: 10 mm
- Okidna sila: 10 g

Rezultati određivanja teksture su prikazani pomoću tri parametra: tvrdoća (N), elastičnost (mm) i upotrijebljeni rad (N mm). Tvrdoća predstavlja silu koja je potrebna da se probije površina uzorka, očitava se direktno iz dobivenog grafa primijenjene sile i vremena, a predstavlja najveći pik na generiranom dijagramu. Elastičnost se dobije određivanjem udaljenosti od početnog trenutka analize do trenutka probijanja uzorka odnosno vrijednosti maksimalne sile na y-osi, a

predstavlja progib površine uzorka prije samog probijanja sonde. Rad potreban za probijanje površine uzorka predstavlja rad koji je potrebno upotrijebiti za zagriz i izračunava se u službenom programu uređaja („Exponent Stable Micro Systems ver. 6.1.18.0.“), a predstavlja površinu ispod krivulje. Za svaki uzorak računa se prosječna vrijednost dobivenih navedenih parametara te se ona koristi za daljnje istraživanje. Na slici 9 je prikazan primjer karakterističnog grafa za određivanje teksture (uzorak A75) s paralelnim mjerenjima. Na y-osi se u sustavu primijenjena sila-vrijeme očita maksimalna sila koja je potrebna da se probije površina uzorka i to se interpretira kao tvrdoća uzorka. Kad sonda probije uzorak, javlja se i bočno trenje koje se očituje laganim porastima upotrijebljene sile i nakon toga slijedi nagli pad, sve dok sonda ne naiđe na donju koranicu uzorka te dolazi do ponovnog rasta upotrijebljene sile za penetraciju. Elastičnost se iščitava iz sustava upotrijebljena sila-udaljenost na x-osi, a na istom grafu se određuje i upotrijebljeni rad kao površina ispod grafa te je primjer takvog grafa prikazan na slici 10.



**Slika 9.** Primjer izgleda karakterističnog grafa za određivanja teksture penetracijom za tri paralelna mjerenja kod uzorka A75



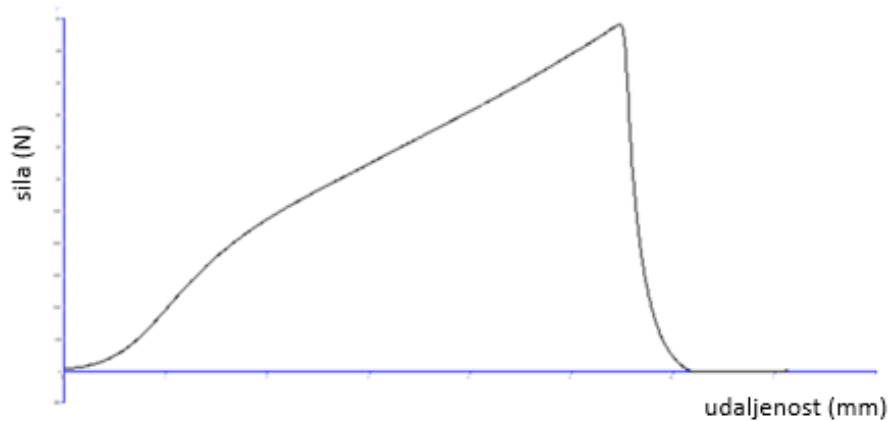
**Slika 10.** Primjer karakterističnog grafa za određivanje rada i elastičnosti (uzorak A75)

Tekstura netostiranih uzoraka je određena kompresijom po standardnoj metodi American Association of Cereal Chemists (AACC) 74-09.01. Na podlogu uređaja stavljene su dvije šnite tost kruha nakon čega je izvršena kompresija. Provedena je jedna serija ispitivanja teksture. Ovaj tip testa služi kao imitacija senzorskog ispitivanja sredine kruha pritiskom ili gnječenjem pomoću prstiju (Novotni, 2001).

Radni parametri određivanja teksture ne tostiranih uzoraka kompresijom:

- Promjer sonde: 36 mm
- Mjerna ćelija: 5 kg
- Pre-test brzina prodiranja sonde:  $1 \text{ mm s}^{-1}$
- Test brzina prodiranja sonde:  $1,7 \text{ mm s}^{-1}$
- Post-test brzina prodiranja sonde:  $10 \text{ mm s}^{-1}$
- Napor: 40 % deformacije
- Okidna sila: 5 g

Rezultati su dobiveni u sila-vrijeme koordinatnom sustavu kao čvrstoća u mjernoj jedinici (g) kao što je zadano po službenoj metodi. Na slici 11 prikazan je karakterističan graf iz kojeg se iz odnosa upotrijebljena sila-vrijeme može dobiti čvrstoća uzorka.



**Slika 11.** Primjer dobivenog rezultata određivanja teksture kompresijom (uzorak A0)

### 3.2.3. Određivanje udjela suhe tvari

Sva hrana sastoji se od različitog omjera vode i suhe tvari. Suha tvar definira se kao cjelokupni sadržaj tvari iz sastava proizvoda koji ne isparava po definiranim uvjetima. Za određivanje udjela suhe tvari uzoraka korištena je standardna metoda sušenja pri 105 °C do konstantne mase (AACC metoda 62-05.01). Na analitičkoj vagi s točnošću +/- 0,0002 g izvagana je masa prazne aluminijske posudice s poklopcem, a nakon toga se u posudicu doda oko 2,5 g prethodno homogeniziranog uzorka te se zabilježi točna masa. Posudice s uzorkom suše se u laboratorijskom sušioniku pri 105 °C u trajanju od 2 sata. Potom se stavljaju u eksikator te nakon hlađenja izvažu. Postupak sušenja i hlađenja se ponavlja sve dok razlika između dva uzastopna vaganja nije manja od 0,001 g. Za svaki uzorak radi se paralelno određivanje. Uzima se srednja vrijednost dvaju rezultata, a dobivena vrijednost zaokružuje se na dva decimalna mjesta.

Udio ukupne suhe tvari računa se pomoću sljedeće formule:

$$WT(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad [1]$$



- $W_T$  – udio ukupne suhe tvari (g na 100 g)
- $m_0$  – masa posudice s poklopcem (g)
- $m_1$  – masa posudice i poklopca s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g)
- $m_2$  – masa posudice i poklopca s uzorkom nakon sušenja (g)

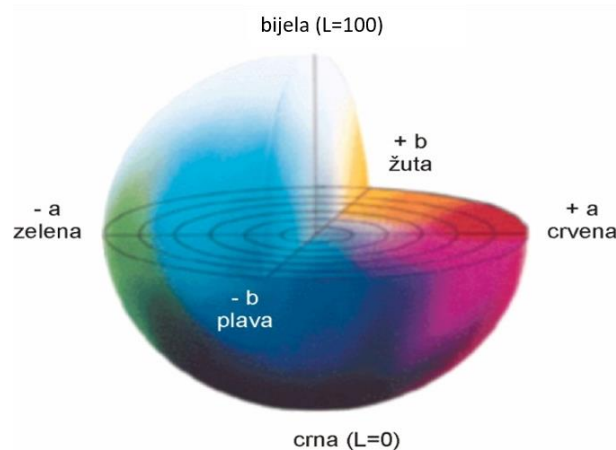
#### 3.2.4. Određivanje boje

Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) određeni su kolorimetrom (CHROMA METER CR-5, Konica Minolta, Japan) (slika 12). Kolorimetar je uređaj kojim se određuje intenzitet boje određenih tvari i ne ovisi o subjektivnoj vizualnoj procijeni obojenosti.



**Slika 12.** Prikaz kolorimetra CHROMA METER CR-5, Konica Minolta

Princip mjerenja je određivanje stupnja reflektirane svjetlosti od mjerne površine te se rezultati opisuju u CIE Lab sustavu opisivanja boja (slika 13). Svaka boja se u tom sustavu može prikazati kao točka u trodimenzionalnom sustavu i jednoznačno se odrediti uz pomoć triju koordinata. Vrijednost koordinate  $L^*$  predstavlja mjeru svjetline te se iskazuje vrijednostima od 0 (crno) do 100 (bijelo). Koordinata  $a^*$  predstavlja odnos udjela crvene (+100) i zelene boje (-100), dok koordinata  $b^*$  ukazuje na odnos plave (-100) i žute boje (+100) u uzorku. Iz dobivenih vrijednosti može se izračunati ukupna razlika obojenosti ( $\Delta E$ ) te ona predstavlja mjeru odstupanja obojenosti nekog uzorka u usporedbi s referentnim.



**Slika 13.** Grafički prikaz CIE Lab sustava opisivanja boja (Randelović, 2009)

Prije mjerenja, uređaj je kalibriran bijelim (100 % refleksije) i crnim standardom (0 % refleksije). Svjetlo reflektirano od uzorka sakuplja se u integrirajućoj sferi te se dobivene koordinate prikazuju kao  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti. Zbog neravnomjernog obojenja, boja uzorka određuje se u dvije serije da bi se izbjegla pogreška nastala uslijed tostiranja. Računa se srednja vrijednost za sve dobivene vrijednosti parametara boje. Izračunate srednje vrijednosti korištene su za izračun razlike u obojenosti ( $\Delta E^*$ ) tostiranih uzoraka prema referentnom netostiranom uzorku za svaki tost posebno.

Vrijednost  $\Delta E^*$  računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2} \quad [2]$$

Gdje je:

- $L^*$  - svjetlina boje ispitivanog uzorka u  $L^*a^*b^*$  sustavu
- $a^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka
- $b^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka
- $L^*_{ref}$  - svjetlina boje referentnog uzorka
- $a^*_{ref}$  - parametri boje referentnog uzorka
- $b^*_{ref}$  - parametri boje referentnog uzorka

### 3.2.5. Određivanje slobodne aminokiseline asparagin HPLC metodom

HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography) ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je često korištena metoda u analitičkoj kemiji jer se koristi za pročišćavanje, identifikaciju, analizu i kvantifikaciju raznih spojeva (Soman i sur., 2008). Princip rada je prolazak uzorka dodanog u mobilnu fazu kroz kolonu napunjenu odgovarajućim matriksom (stacionarna faza) pod visokim pritiskom. Interakcije koje se događaju između mobilne i stacionarne faze omogućavaju razdvajanje uzorka na sastavnice.

Certificirani referentni materijal asparagin odvaže se na analitičkoj vagi osjetljivosti 0,01 mg. 10 mg certificiranog referentnog materijala odvaže se u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni se vodom do oznake. Daljnjim razrjeđivanjem u vodi pripreme se radne otopine standarda neposredno prije početka same analize.

Ekstrakcija je provedena tako da se izvaže 1 g homogeniziranog uzorka u koji se doda 5 mL 0,1 M HCl. Smjesa se promiješa na rotacijskoj tresilici 30 sekundi u ultrazvučnoj kupelji 1h, nakon čega se centrifugira 15 minuta pri 4500 okr min<sup>-1</sup>. Dobiveni supernatant se filtrira kroz membranski filter. Za kvalitativno i kvantitativno određivanje slobodnih aminokiselina u ekstraktu koristi se tekućinska kromatografija visokog razlučivanja s fluorescencijskim detektorom.

Prije razdvajanja tekućinskom kromatografijom obrnutih faza na koloni Zorbax Eclipse-AAA analiti su derivatizirani. Derivatizacija primarne aminokiseline Asn vrši se smjesom 3-merkaptopropionske kiseline (3-MPA) i ftaldehida (OPA). Početna smjesa za derivatizaciju primarnih aminokiselina priređena je na način da je otopini OPA masene koncentracije 10 mg mL<sup>-1</sup> u 0,02 M boratnom puferu (pH 10,2) dodano 1,0 % 3-MPA. Radna smjesa za derivatizaciju primarnih aminokiselina pripravljena je razrjeđivanjem 20 µL početne smjese sa 140 µL 0,1 M boratnog pufera. Derivatizacija je provedena uporabom automatskog injektora: uzimanjem 2,5 µL boratnog pufera i 0,5 µL uzorka te njihovim miješanjem. Nakon pripreme uzorka i miješanja na kolonu je injektirano 18 µL. Temperatura kolone pri analizi održavana je na 40 °C, a temperatura odjeljka za injektiranje uzoraka na 15 °C. Protok pokretne faze bio je 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Primijenjeno je gradijentno ispiranje s dva eluenta; A: 40 mM natrij-hidrogenfosfat (pH 7,8), B: metanol/ acetonitril/ voda (45:45:10). Gradijentni program bio je: 0 – 57 % B tijekom 1,9 – 18,1 min, 57 – 100 % B tijekom 18,1 – 18,6 min, 100 % B tijekom 18,6 – 22,3 min, 100 – 0% B tijekom 22,3 – 23,2 min i 0% B tijekom 23,2-26,0 min. Primarne aminokiseline eluirane s tekućinsko-kromatografske kolone detektirane su i kvantitativno

određene fluorescencijskim detektorom pri valnoj duljini pobuđivanja od 340 nm i valnoj duljini emisije od 450 nm.

Metoda za određivanje aminokiseline asparagin je validirana. Validacijom metode postignuta je granica kvantifikacije (LOQ) metode od 0,03 mg kg<sup>-1</sup>. Prisutnost aminokiseline asparagin u otopini uzorka utvrđuje se usporedbom vremena zadržavanja (Rt) analita koji se nalaze u uzorku s onim referentne tvari.

Količina slobodne aminokiseline asparagin u uzorku izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\omega_a = \frac{\gamma_{oč} \cdot V(\text{ekstrakta})}{m(\text{uzorka})} [\text{mg kg}^{-1}] \quad [3]$$

Gdje je:

- $\omega_a$  – izračunati maseni udio aminokiseline u uzorku (mg kg<sup>-1</sup>)
- $\gamma_{oč}$  – očitana masena koncentracija aminokiseline iz baždarnog pravca (ng mL<sup>-1</sup>)
- $V_{tikvice}$  – volumen ekstrakta pripremljenog uzorka (mL)
- $m_{uzorka}$  – masa uzorka uzetog u postupak (g)

### 3.2.6. Određivanje akrilamida UPLC - MS/MS metodom

Korištena metoda za kvantitativno određivanje akrilamida u uzorcima tosteva je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti s dvostrukim spektrometrom masa (UPLC-MS/MS, engl. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer). Metoda je razvijena u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“, odnosno Laboratoriju za kemijske analize hrane, validirana i akreditirana kao vlastita metoda. Koristi se za određivanje akrilamida u uzorcima hrane u rasponu od 20 do 8000 µg kg<sup>-1</sup>.

Za kvantifikaciju akrilamida u uzorku, primijenjena je metoda unutarnjeg standarda. Unutarnji standard je spoj koji je strukturom sličan ispitivanom analitu, no nije prirodno prisutan u uzorku koji se analizira, a lako se razdvaja od traženog analita. Primjenom metode unutarnjeg standarda smanjuje se utjecaj matriksa, iskorištenja i utjecaj odziva detektora. U toj metodi potrebno je izračunati faktor odziva (engl. response factor, RF). RF predstavlja omjer površina pika kvalifikacijskog iona (QI) AA i QI-AA-IS pomnožen s masenom koncentracijom AA-IS.

Koncentracija prisutnog akrilamida očita se s kalibracijskog pravca odnosa faktora odziva i masenog udjela AA ( $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

**Tablica 6.** Popis certificiranih materijala za UPLC

NAZIV	KRATICA	ČISTOĆA [%]	PROIZVOĐAČ
<b>Akrilamid</b>	AA	$\geq 99,0$	dr.Ehrenstofer GmbH, Augsburg, Njemačka
<b>Akrilamid 1,2,3-<sup>13</sup>C3</b>	AA-IS	$\geq 99,0$	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA

Certificirani referentni materijal akrilamida za izradu standardnih otopina prikazan je u tablici 6. Standarde otopine napravljene su razrjeđivanjem materijala u metanolu, a daljnjim razrjeđivanjem standardnih otopina pripremljene su radne otopine standarda u koncentracijama  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  te ostale koncentracije otopina za potrebe izrade kalibracijskog pravca. Pripremljene radne otopine standarda potrebno je čuvati na tamnom i hladnom mjestu.

Za određivanje akrilamida u uzorcima tosteva je pri sobnoj temperaturi odvagan 1 g homogeniziranog uzorka u kivete za centrifugu od 50 mL. U uzorak je dodano  $20 \mu\text{L }^{13}\text{C3 AA-IS}$  ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i 5 mL heksana. Smjesa je izmiješana na vorteksu, dodaje se 20 mL smjese voda/acetonitril (1:1) te se sve skupa još jednom miješa na vorteksu. Nakon toga je dodana smjesa soli za QuEChERS i ponovno je izmiješana na vorteksu. Kivete su nakon toga stavljene na centrifugu 15 min pri  $4600 \text{ okr min}^{-1}$  i po završetku se uzme 5 mL alikvota acetonitrilnog ekstrakta koji se prebace u bočice s d-SPE solima da bi se uklonili šećeri, masnoće i polarne organske kiseline. Zatim se centrifugira 5 min pri  $4600 \text{ okr min}^{-1}$  te uparava ekstrakt u struji dušika pri  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pripremljeni ekstrakti otope se u  $500 \mu\text{L}$  vode i profiltriraju u bočice za automatski autouzorkivač. U tablici 8 prikazani su svi spomenuti materijali.

Kvantitativno određivanje akrilamida provodi se UPLC-MS/MS metodom. To je instrumentalna tehnika koja kombinira mogućnost fizičkog razdvajanja tekućinske kromatografije i mogućnost analize mase kod masene spektrometrije. Primjena te tehnike vrlo je raširena zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti, a općenito je usmjerena na opće otkrivanje

i potencijalnu identifikaciju kemijskih spojeva prisutnih u složenim smjesama. Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), ali i UPLC-a, tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze noseći sastavnice uzorka (Nigović, 2014). UPLC kolone punjene su znatno manjim česticama (1,7 – 1,8  $\mu\text{m}$ ) od HPLC kolona (3 – 10  $\mu\text{m}$ ) te UPLC za razliku od HPLC-a postiže tlakove do 1000 bara, dok je HPLC ograničen na 400 bara. Iz tog razloga, UPLC se smatra novim razdobljem tekućinske kromatografije (Fountain, 2011). Razdvajanje komponenti iz smjese se događa zbog kemijskih interakcija između analita i stacionarne faze u koloni. Ovisno o jačini tih interakcija, dolazi i do različitih vremena zadržavanja pojedine komponente smjese (Gray i Lawrence, 2008). Analiti se razdvajaju tekućinskom kromatografijom obrnutih faza (nepolarna stacionarna faza i polarna mobilna faza) na koloni Luna C18. Temperatura kolone prilikom analize je 30 °C. Injektira se 10  $\mu\text{L}$  uzorka, a mobilna faza se sastoji od otapala: A-0,1 % otopina mravlje kiseline i B-metanol. Primjenjuje se gradijentno ispiranje po programu prikazanom u tablici 7.

**Tablica 7.** Prikaz gradijentnog ispiranja; A-0,1 % otopina mravlje kiseline, B-metanol

Vrijeme (min)	A %	B %	Protok ( $\text{mL min}^{-1}$ )
0,5	98	2	0,2
6	10	90	0,2
8	10	90	0,2
8,5	98	2	0,2
15	98	2	0,2

Kod masene spektrometrije se princip razdvajanja komponenti smjese i detekcija nabijenih čestica temelji na omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Osnova rada svakog spektrometra mase je utjecaj magnetskog polja na kretanje nabijene čestice kroz medij te različito skretanje molekule u magnetskom polju ovisno o omjeru mase i naboja. Da bi se to postiglo, spektrometar masa mora se sastojati od 3 dijela: izvor ionizacije koji prevodi uzorak u ionizirano i plinovito stanje, analizator, koji razdvaja molekule prema omjeru mase i naboja i detektor, koji kvantificira analit, odnosno molekularni ion za svaki omjer mase i naboja (Chace i Kalas, 2005). Dvostruka ili tandemaska spektrometrija masa omogućuje dodatnu analizu iona, na način da se izazove namjerna dodatna fragmentacija iona i na taj način unaprijedi razdvajanje. Isto tako, na taj način se može kvalitetnije odrediti struktura analiziranog iona spajanjem fragmenata (Seger i Griesmacher, 2007).

Akrlamidi eluirani s tekućinsko-kromatografske kolone detektiraju se i kvantitativno određuju dvostrukim spektrometrom masa u MRM (engl. Multiple Reaction Monitoring) načinu rada uz pozitivnu ionizaciju elektro raspršenjem. Napon na kapilari postavljen je na 22 V, a kolizijska energija (CE) je 10 V. Prate se tranzicije određenih iona akriamida i drugih za <sup>13</sup>C3-akrilamid.

**Tablica 8.** Popis certificiranih materijala u UPLC

NAZIV	KRATICA	ČISTOĆA [%]	PROIZVOĐAČ
<b>N-heksan</b>		GC ECD	Merck, Kenilworth, USA
<b>Acetonitril</b>	ACN	UHPLC	ITW Reagents, Barcelona, Španjolska
<b>Metanol</b>		HPLC	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
<b>Metanol</b>		HPLC	Panreac, Appli Chem, Darmstadt, Njemačka
<b>Mravlja kiselina</b>		98 % p.a.	Scharlau, Barcelona, Španjolska
<b>Smjesa soli za QuEChERS; MgSO<sub>4</sub> (4g)+ NaCl (0,5g)</b>			Bekolut, Hauptstuhl, Njemačka
<b>Smjesa soli za d-SPE MgSO<sub>4</sub> (1200 g) + PSA (400 mg)</b>			

### 3.2.7. Senzorska analiza

Senzorska svojstva uzoraka tosteva ocijenjena su uz pomoć panela koji čine 8 nasumično odabranih članova u rasponu godina od 17 do 58. Panel čine 4 muška i 4 ženska člana te je nekim članovima to bila prva senzorska analiza, a neki su već ranije sudjelovali u sličnim senzorskim ispitivanjima. Netostirani uzorci ocjenjivani su 9-bodovnom hedonističkom skalom ocjenama od 1 („nimalo mi se ne sviđa“) do 9 („izuzetno mi se sviđa“) (Meillgard i sur., 2006). Ocjenjivana senzorska svojstva su: boja, miris, tekstura i okus. Za senzorsko ocjenjivanje tostiranih uzoraka korištena je deskriptivna senzorska analiza (QDA) za 4 senzorska svojstva (boja, miris, tekstura i okus) opisanih pomoću 13 deskriptora: karakteristična boja, karakterističan miris, mliječni miris, miris po pečenom, po zagorenom, mrvljivost, hrskavost, karakterističan okus, kiseli, gorki, slatki, slani okus te okus po zagorenom. Ocjenjen je intenzitet deskriptora ocjenama od 1 („nimalo izraženo svojstvo“) do 9 („izuzetno jako izraženo svojstvo“). Senzorska analiza provedena je neposredno nakon pripreme uzoraka (tostiranja). Primjer ocjenjivačkog listića nalazi se u Prilogu 1.

### 3.2.8. Statistička obrada podataka

Za obradu podataka korišten je XLSTAT statistički računalni program (verzija 2021.2.2, Addinsoft) za MS Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD). Za analizu korelacije među varijablama korišten je Pearsonov test korelacije. Pearsonov koeficijent korelacije mjeri linearnu povezanost dvije brojčane varijable te se snaga povezanosti određuje pomoću ljestvice vrijednosti koeficijenata, gdje vrijednost 0 označuje da linearne povezanosti nema, a 1 označuje potpunu (funkcijsku povezanost). Rezultati senzorske analize obrađeni su pomoću DOE (engl. Design of Experiment) načina rada i rezultati su dobiveni opcijom Product characterization koja se zasniva na ANOVA (engl. Analysis of Variance) modelu. U svim se slučajevima vrijednost  $p \leq 0,05$  smatrala statistički značajnom.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj trajanja tostiranja različitog trajanja (60, 75 i 90 sekundi) na nastanak akrilamida u različitim vrstama tost kruhova (pšenični, punozrnati pšenični, pirov, proteinski na bazi durum pšenice i raženi sa sjemenkama). Ovisno o sirovinama koje se koriste za izradu tost kruha, netostirani tost kruhovi sadrže različite koncentracije asparagina koji je limitirajući prekursor u reakciji nastanka akrilamida u proizvodima od žitarica. Iz tog razloga određene su koncentracije slobodnog asparagina u netostiranim uzorcima (rezultati su prikazani na slici 21) te je praćena povezanost s nastalim koncentracijama akrilamida. Osim toga, određena je promjena boje i teksture u tost kruhu nakon toplinske obrade te udio suhe tvari, a provedena je i senzorska analiza kako bi se rezultati instrumentalnih mjerenja fizikalnih parametara mogli usporediti s promjenama senzorskih svojstava nastalih prilikom termičke obrade. Provedena je statistička obrada podataka.

Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama i grafički.

Rezultati određivanja koncentracije akrilamida u 5 različitih vrsta tost kruhova tostiranih različiti vremenski period prikazani su na slici 22.

Tekstura je za tostirane uzorke opisana svojstvima tvrdoće, elastičnosti i utrošenog rada, a za netostirane uzorke mjerena je čvrstoća po standardnoj metodi. Rezultati teksture tostiranih uzoraka prikazani su na slici 14, a promjene u vrijednostima parametara teksture koje su se dogodile uslijed hlađenja tosteva na sobnu temperaturu prikazane su na slikama 15, 16 i 17.

Rezultati određivanja teksture kompresijom za netostirane uzorke prikazani su na slici 18.

Parametri boje uzoraka prikazani su u tablici 9, a rezultati određivanja udjela suhe tvari su prikazani slikom 19.

Prikaz rezultata hedonističke senzorske analize provedene za netostirane uzorke prikazan je na slici 26, a rezultati deskriptivne senzorske analize za tostirane uzorke prikazani su u tablici 11. Primjer grafički pojednostavljenog prikaza rezultata deskriptivne sensorike prikazan je za uzorak pšeničnog tosta na slici 27.

#### 4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA TEKSTURE

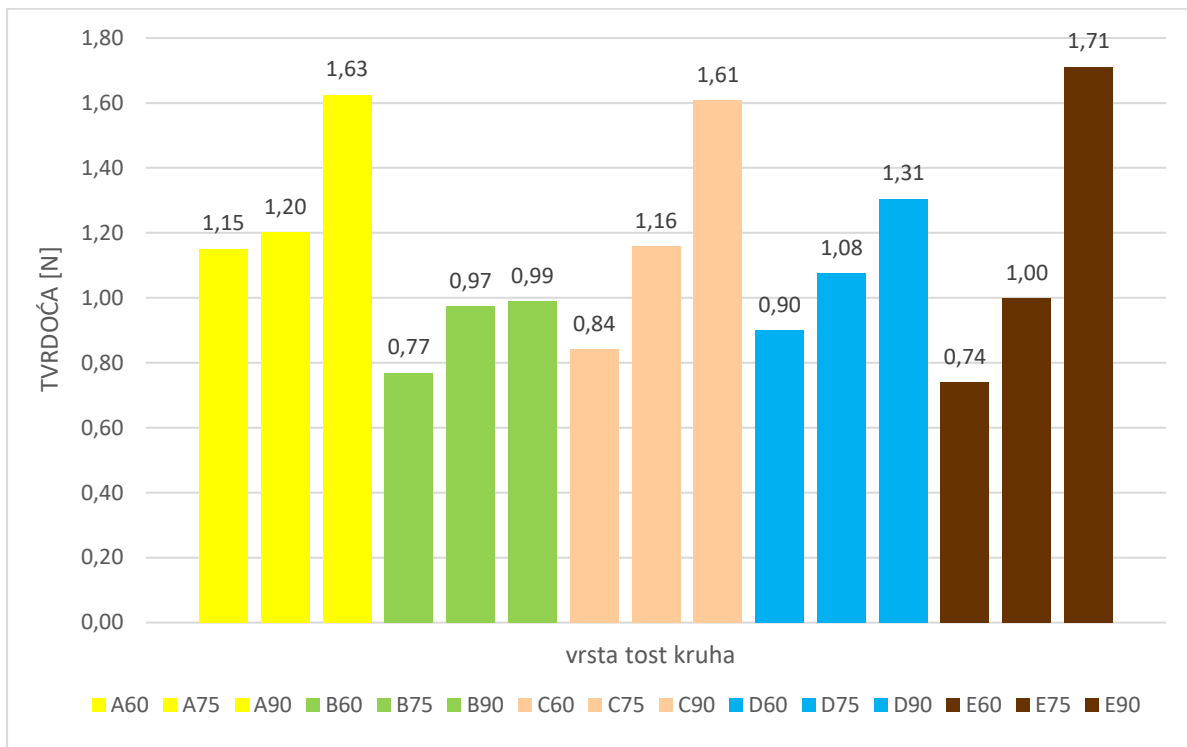
Nutritivni i funkcionalni učinci tostiranja su široko istraživani, no na kvalitetu tost kruha ponajviše utječe tekstura (Eckgardt i sur., 2013). Tekstura tost kruha je specifična zbog nastanka hrskave korice s jedne strane te mekane unutrašnjosti s druge strane.

Rezultati određivanja teksture nakon tostiranja prikazani su na slici 14 i međusobno se razlikuju ovisno o vrsti tost kruha i duljini trajanja tostiranja. Duljim tostiranjem tvrdoća uzoraka raste. Usporedbom različitih vrsta tosteva međusobno, najniže vrijednosti tvrdoće određene su uzorcima punozrnatih tosteva, dok najviše vrijednosti imaju uzorci pšeničnog tosta.

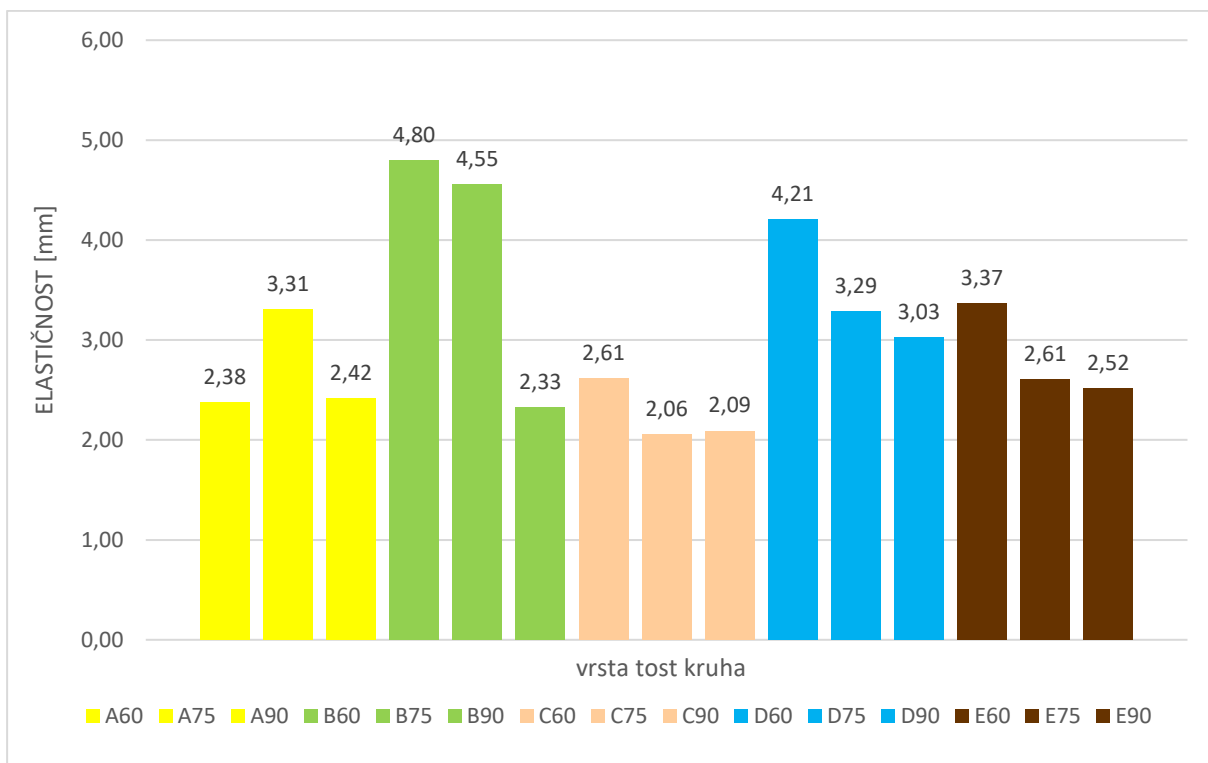
Povećanje čvrstoće tijekom tostiranja tosteva pripisuje se isparavanju vode tijekom zagrijavanja te je to uzrok raznih konformacijskih promjena u makromolekulama unutar tosta. Smanjenje udjela vode također je usko povezano s povećanjem čvrstoće uslijed starenja kruha (Monteau i sur., 2017). Tijekom procesa tostiranja dolazi do različitih kemijskih reakcija, a promjene koje se događaju kod molekula visoke molekulske mase kao što je biopolimer škrob, smatraju se odgovornim za reološke promjene kruha (Funami, 2011). To se temelji na činjenici da do očvršćivanja unutrašnje strukture kruha dolazi zbog postupnog smanjenja mobilnosti biopolimera tijekom pečenja. Difuzija vode u unutrašnjosti kruha je spora, a uz to, razlog smanjenoj mobilnosti biopolimera je i konkuriranje molekula biopolimera i slobodnih -OH skupina susjednih ostataka glukoze za vodu (Schiraldi i sur., 1996).

Prema dobivenim rezultatima elastičnosti, može se primijetiti da ona pada s porastom duljine tostiranja, osim iznimke kod pšeničnog tosta, gdje je najelastičniji uzorak A75 te kod pirovog gdje su vrijednosti za uzorke C75 i C90 gotovo jednake. Najveću elastičnost kod svih uzoraka ima punozrnati tost, a najmanju pirov. Kod usporedbe upotrijebljenog rada, također se može zamijetiti trend porasta duljim vremenom tostiranja. Jedini izuzetak je punozrnati tost gdje uzorak B75 ima veću vrijednost od preostala dva (B60 i B90), a kod proteinskog tosta su vrijednosti za D60 i D75 gotovo identične. Od svih tostiranih uzoraka, najveći rad upotrijebljen je za E90, a najmanji za B60.

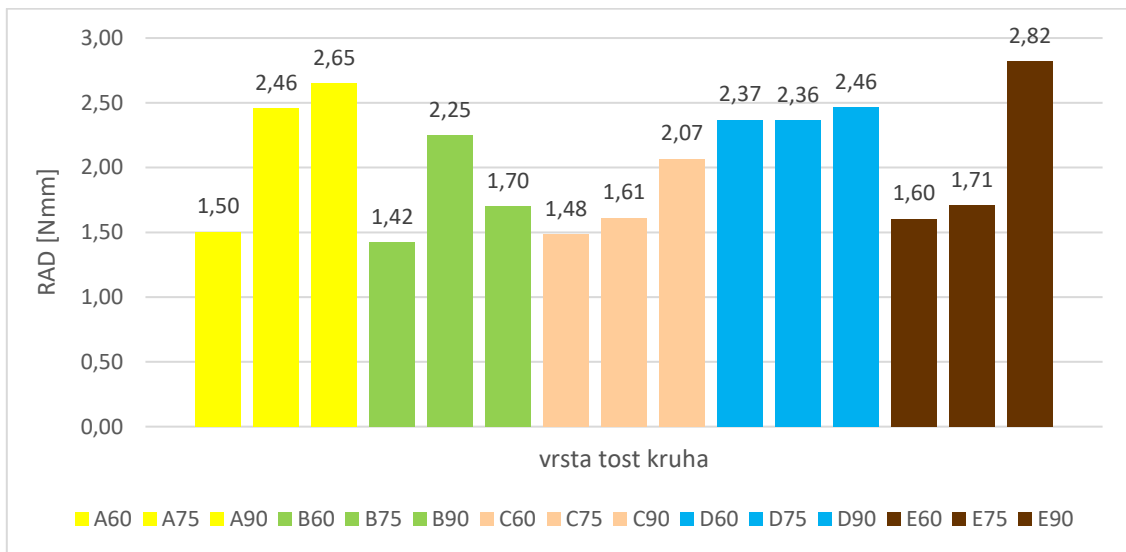
a) Prikaz rezultata određivanja tvrdoće tostiranih uzoraka



b) Prikaz rezultata određivanja elastičnosti tostiranih uzoraka

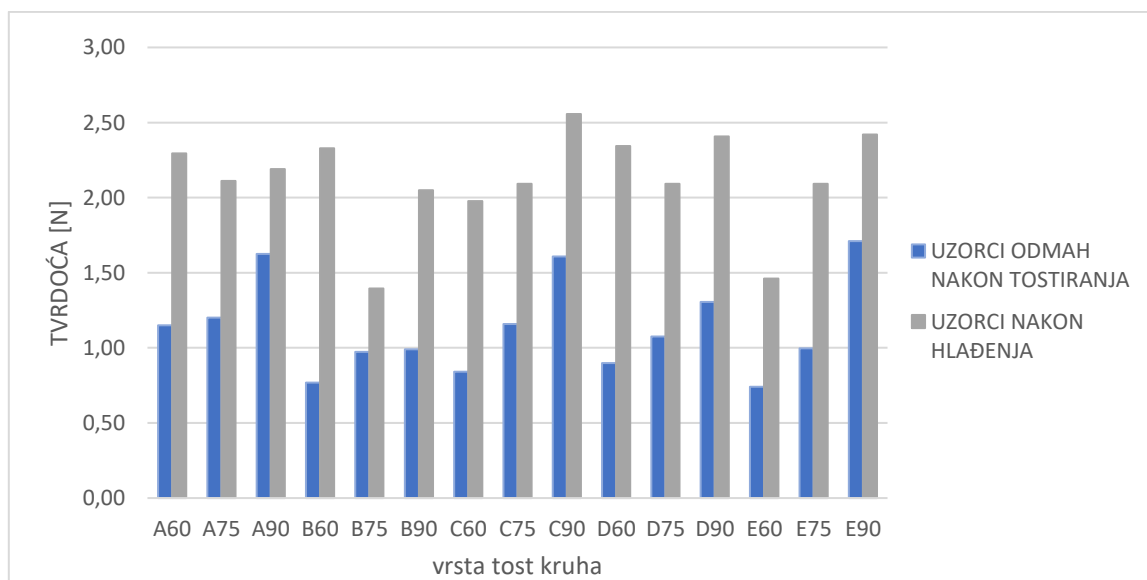


c) Prikaz rezultata određivanja upotrebljenog rada tostiranih uzoraka

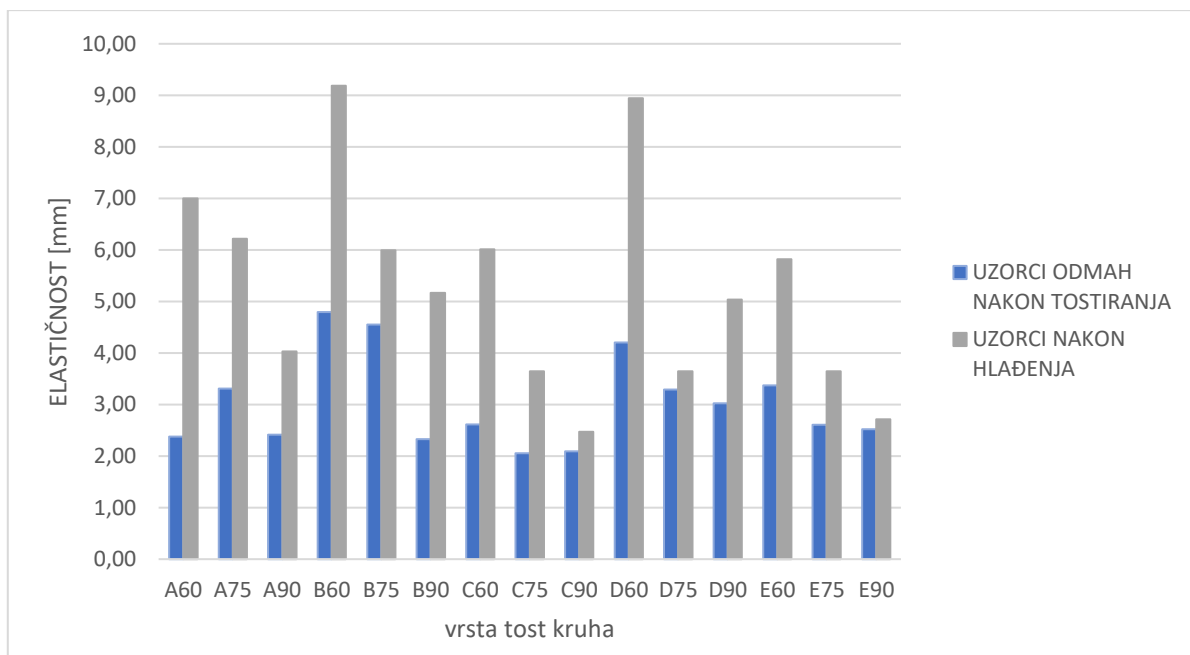


**Slika 14.** Grafički prikaz dobivenih rezultata za a) tvrdoću, b) elastičnost i c) rad tostiranih uzoraka (A – pšenični tost; B – punozrnati tost; C – pirov tost; D – proteinski tost; E – raženi tost ) kroz različito vrijeme tostiranja (60, 75 i 90 sekundi)

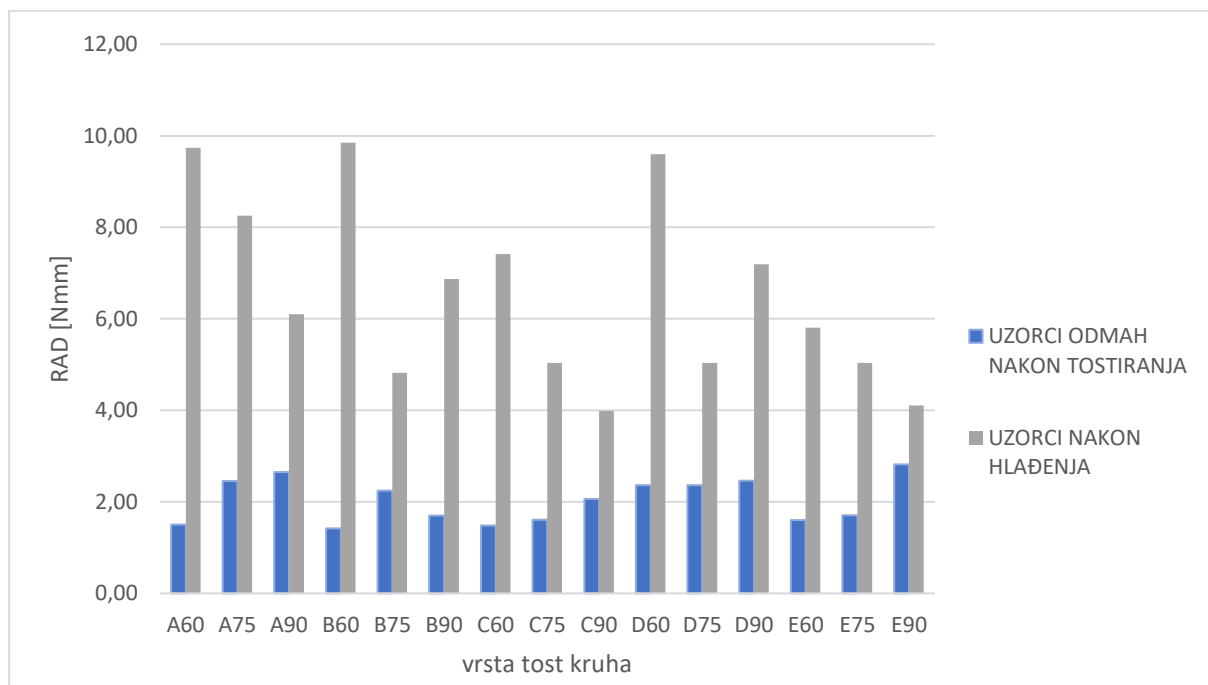
Hlađenjem uzoraka tost kruhova dolazi i do promjene njihove teksture. Usporedbom teksturalnih parametara prije i nakon hlađenja uzoraka može se zamijetiti da su sve vrijednosti parametara teksture (tvrdoća, elastičnost, rad) za sve uzorke porasle. Rezultati su grafički prikazani na slikama 15, 16 i 17.



**Slika 15.** Grafički prikaz usporedbe tvrdoće (N) uzoraka neposredno nakon tostiranja i nakon hlađenja (A – pšenični tost; B – punozrnati tost; C – pirov tost; D – proteinski tost; E – raženi tost kroz različito vrijeme tostiranja (60, 75 i 90 sekundi))



**Slika 16.** Grafički prikaz usporedbe elastičnosti (mm) uzoraka neposredno nakon tostiranja i nakon hlađenja (A – pšenični tost; B – punozrnati tost; C – pirov tost; D – proteinski tost; E – raženi tost kroz različito vrijeme tostiranja (60, 75 i 90 sekundi))



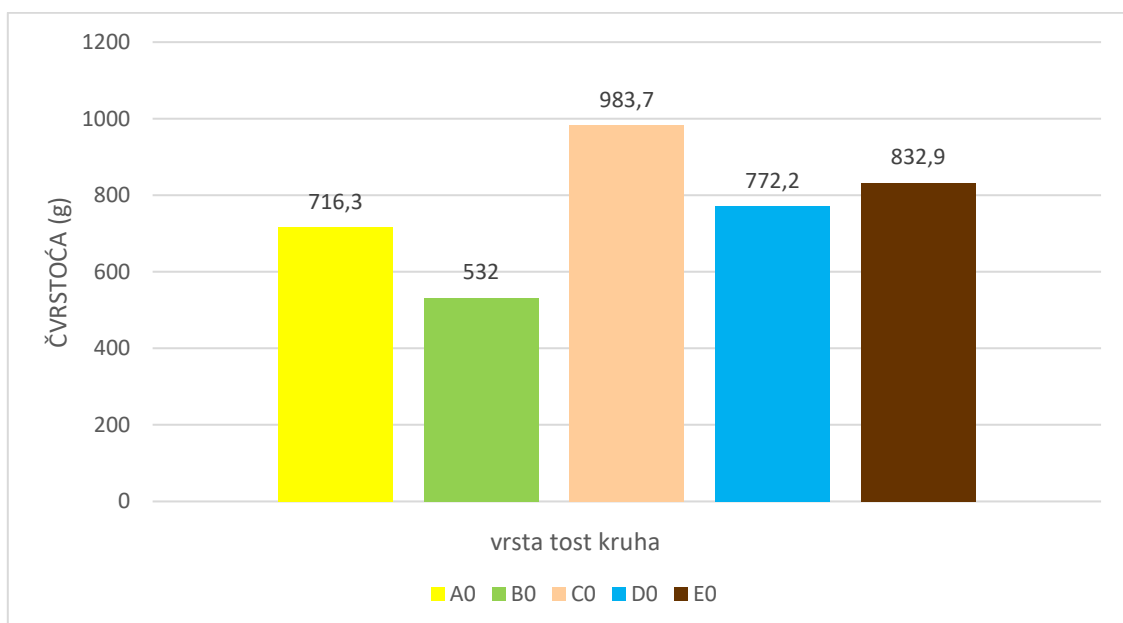
**Slika 17.** Grafički prikaz usporedbe upotrijebljenog rada (Nmm) za uzorke neposredno nakon tostiranja i nakon hlađenja (A – pšenični tost; B – punozrnati tost; C – pirov tost; D – proteinski tost; E – raženi tost kroz različito vrijeme tostiranja (60, 75 i 90 sekundi))

Do najmanjeg porasta vrijednosti parametara teksture došlo je kod tvrdoće uzoraka. Najmanji porast tvrdoće nakon hlađenja pokazali su uzorci B75 (punoznati tost kruh tostiran 75 sekundi) i E60 (raženi kruh tostiran 60 sekundi).

Hlađenjem uzoraka povećala se i elastičnost uzoraka. Najveću elastičnost pokazuju uzorci B60 (punoznati tost kruh tostiran 60 sekundi) i D60 (proteinski tost kruh tostiran 60 sekundi).

Od svih mjerenih parametara teksture nakon hlađenja najveći porast bilježi se kod parametra rada. Kod uzoraka tostiranih 60 sekundi, nakon hlađenja, rad potreban za zagriz najviše se povećao.

Tijekom pečenja kruha, dio vode isprava s površine, a dio vodene pare se kondenzira u unutrašnjosti, a zbog porozne strukture sustava, omogućena je difuzija vode. Zapravo se cijeli gubitak vode odvija samo na površini, tako da u kori kruha praktički nema vode, dok je postotak vode u unutrašnjosti sličan onome u tijestu. Tijekom hlađenja kruha, temperatura u unutrašnjosti kruha je ispod temperature želatinizacije (55 – 85 °C) te dolazi do rekonstrukcije škrobnih molekula, odnosno do retrogradacije škroba koje uzrokuju starenje kruha. Tostiranjem kruha, na neki način, može se produžiti trajnost ili vrijeme uporabe kruha, jer se ponovno postiže temperatura želatinizacije te se dio vode, koji još nije ispario, ponovno veže za molekule škroba što rezultira kruhom ponovno ugodnim za konzumaciju. Rezultati mjerenja teksture tostevima nakon hlađenja (slike 15, 16 i 17), odnosno porast vrijednosti parametara tvrdoće, elastičnosti i upotrijebljenog rada, mogu se objasniti upravo tom pojavom retrogradacije škrobnih molekula.



**Slika 18.** Grafički prikaz određivanja čvrstoće netostiranih kruhova metodom kompresije (A – pšenični tost; B – punoznati tost; C – pirov tost; D – proteinski tost; E – raženi tost)

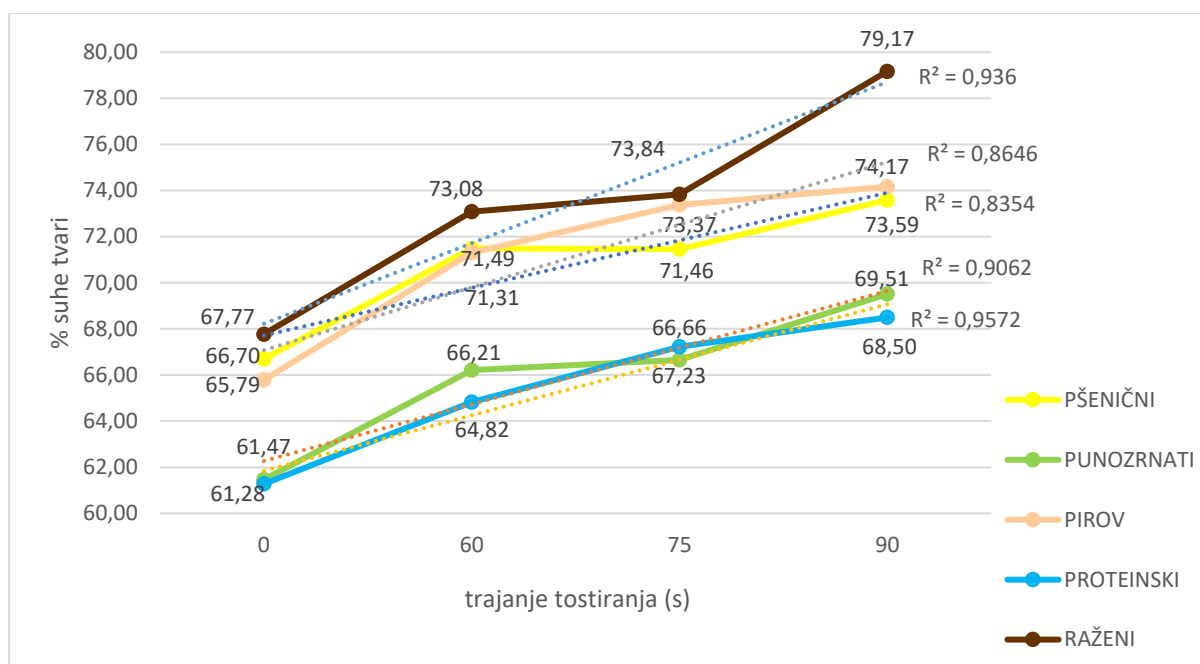
Tekstura netostiranih (svježih tost kruhova – A0, B0, C0, D0 i E0) određena je metodom kompresije do 40 % deformacije tosta. Iz grafičkog prikaza rezultata čvrstoće za netostirane uzorke (slika 18) može se zaključiti da najveću čvrstoću ima uzorak pirovog tosta (983,7 g), a najmanju punozrnatu tost (532 g).

Čvrstoća i tvrdoća opisuju slične teksturalne vrijednosti te se za usporedbu može povući poveznica između tostiranih uzoraka i njihovih vrijednosti za tvrdoću s netostiranim uzorcima i dobivenim vrijednostima čvrstoće. Ako se kod tostiranih uzoraka uzme srednja vrijednost svih rezultata za pojedinu vrstu tosta, najtvrdi je uzorak A (1,33), zatim C (1,20), E (1,15), D (1,09) i B (0,91). Kod netostiranih uzoraka je redoslijed sličan, uz iznimku uzorka A0 tako da je najčvršći uzorak redom: C0, E0, D0, A0 i B0.

Pasqualone i sur. (2011) ispitivali su tehnološke razlike između 4 vrste kruha napravljenih iz brašna orijentalne pšenice (Kamut), pirovog brašna, običnog pšeničnog brašna i brašna durum pšenice. Određivali su i čvrstoću prema standardnoj metodi AACC 74-09.01, kao i kod netostiranih uzoraka u ovom eksperimentu s razlikom u promjeru sonde (25 mm) i postotku kompresije koja je u tom eksperimentu bila podešena na 25 %. Čvrstoću su Pasqualone i sur. (2011) izrazili kao silu izraženu u N. Rezultati njihovog istraživanja ukazuju da najveću čvrstoću ima kruh na bazi durum pšenice, zatim Kamut pšenice, običan pšenični kruh i na kraju kruh iz pirovog brašna. Može se zaključiti da se rezultati spomenutog rada i ovog provedenog istraživanja ne podudaraju. Razlog može biti i razlika u samoj pripremi običnog odnosno tost kruha.

#### **4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UDJELA SUHE TVARI**

Udio suhe tvari (%) povećava se duljim tostiranjem (osim kod malog odstupanja za uzorke A60: 71,49 % i A75: 71,46 %) što je grafički prikazano na slici 19. Najveći udio suhe tvari u netostiranom kruhu, a ujedno i najveći porast udjela suhe tvari tijekom tostiranja može se zamijetiti kod raženog tosta, nešto manje suhe tvari nalazi se u uzorcima pšeničnog i pirovog tosta koji imaju slične krivulje rasta, a najmanje suhe tvari sadržano je kod punozrnatog i proteinskog tosta.



**Slika 19.** Udio suhe tvari (%) u netostiranim uzorcima tost kruha te promjene udjela suhe tvari nakon tostiranja

Linearna korelacija između postotka suhe tvari i trajanja tostiranja je jasno vidljiva iz crta trenda za svaki uzorak posebno. O jačini povezanosti govori Pearsonov koeficijent ( $r$ ) te je ta povezanost prema ljestvici tumačenja vrijednosti koeficijenta visoka za uzorke pšeničnih i pirovih tosteva i vrlo visoka za uzorke raženih, proteinskih i punozrnatih tosteva. Najjača linearna korelacija između postotka suhe tvari i trajanja tostiranja postoji za uzorke proteinskog tosta ( $r = 0,9572$ ), zatim za uzorke raženih tosteva ( $r = 0,9360$ ), pa uzorke punozrnatih tosteva ( $r = 0,9062$ ), pirovog tosta ( $r = 0,8646$ ) i za pšenične tosteve ( $r = 0,8354$ ).

Rezultati udjela suhe tvari mogu se razmatrati i s gledišta udjela vode, odnosno, udio vode može se izraziti kao:  $\text{udio vode} = 100 - \text{udio suhe tvari u uzorku}$ . Također, udio vode u tostu usko je povezano s teksturom tosta (Sato, 2019) pa se rezultati mogu zajedno raspraviti.

Capuano i sur. (2019) su u svojem radu pratili utjecaj različitih temperatura i trajanja tostiranja na udio vode u hrskavom kruhu i zaključili da gubitak vode ovisi o temperaturi tostiranja i da se događa brže pri višim temperaturama. Rezultati netostiranih uzoraka iz gore spomenutog rada mogu se usporediti s rezultatima ovog istraživanja te budući da je riječ o hrskavom kruhu, svi uzorci prije tostiranja imaju viši udio suhe tvari nego uzorci u ovom eksperimentu. Raženi hrskavi kruh ima najviše suhe tvari (73 %) kao i u ovom istraživanju, dok pšenični i punozrnati pšenični imaju otprilike jednak udio suhe tvari (71 %).



Yukinori Sato je 2019. istraživao reološka svojstva tostiranog kruha korištenjem modificirane metode AACC za određivanje vrijednosti kompresijske sile te je ustanovljen novi reološki parametar CFV (engl. compression force value) i koristi se za određivanje unutrašnje čvrstoće tostiranih kruhova i usporedbu kvalitete tost kruhova ovisno o stupnju tostiranja. U tom eksperimentu se koristila modificirana metoda naziva CFV<sub>20</sub> gdje su zadani radni parametri teksturometra 25%-tne kompresije sa sondom promjera 25 mm. Za opis reoloških karakteristika površine tosta uveden je i parametar S<sub>in</sub> koji predstavlja nagib pravca u grafikonu odnosa sile i deformacije. Čvrstoća tostiranog kruha može se odrediti uspoređujući ta dva parametra, odnosno razlike unutrašnje i vanjske čvrstoće. Na niskim razinama tostiranja razlika između ta dva faktora nije velika, no na višim razinama tostiranja se razlika značajno povećava. Vrijednosti parametara CFV<sub>20</sub> i S<sub>in</sub> stavili su u odnos s izmjerenom bojom površine tostiranih kruhova, odnosno vrijednosti L\* i zaključili da je jača povezanost posmeđivanja s unutaršnjom čvrstoćom S<sub>in</sub>, nego s površinskom CFV<sub>20</sub> te da se iz tog razloga L\* može koristiti za predviđanje unutrašnje čvrstoće tostiranog kruha.

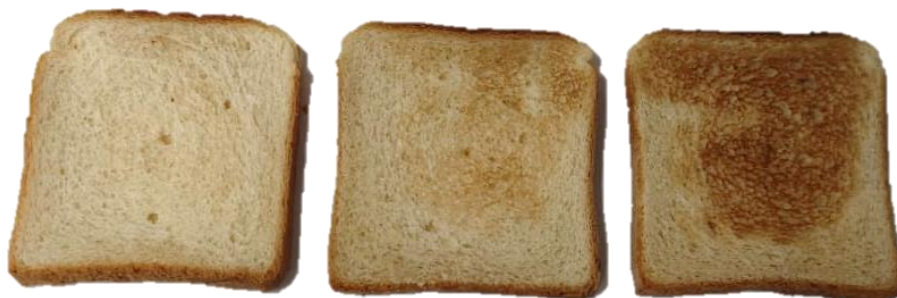
Udio vode u tostiranom kruhu u tom eksperimentu očekivano je manji za tosteve koji su bili tretirani na jačem intenzitetu zagrijavanja te su rezultati bili u jakoj linearnoj korelaciji s parametrom CFV<sub>20</sub> ( $r = 0,878$ ), odnosno, smanjenjem vode u tostu rasla je i unutrašnja čvrstoća tosta. Također, u spomenutom radu autor je udio vode u tostiranom kruhu usporedio i s faktorom S<sub>in</sub>, odnosno vanjskom čvrstoćom te su ta dva parametra pokazala linearnu povezanost, ali nešto slabijeg intenziteta ( $r = 0,695$ ).

U ovom istraživanju također je provedena statistička analiza rezultata tvrdoće i udjela suhe tvari za tostirane uzorke te rezultata čvrstoće i udjela suhe tvari za netostirane uzorke. Jačina linearne korelacije je mnogo slabija nego u radu koji je objavio Sato (2019) te koeficijent korelacije između parametra tvrdoće i suhe tvari tostiranih uzoraka iznosi  $r = 0,3816$ , a između parametara čvrstoće i suhe tvari netostiranih uzoraka je  $r = 0,2906$ . Grafički prikaz statistike nije priložen u radu.

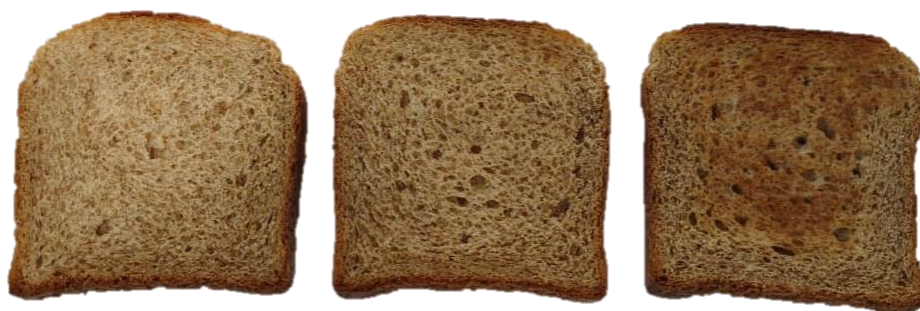
### **4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA BOJE**

Na slici 20 prikazane su fotografije nastale tijekom provođenja eksperimentalnog dijela ovog rada. Redom su prikazani uzorci za svaku pojedinu vrstu tosta, a promjena boje nakon tostiranja je očita. Rezultati dobiveni instrumentalnim mjerenjem parametara boje (L\*, a\* i b\*) te izračunata vrijednost ukupne promjene boje ( $\Delta E^*$ ) prikazani su u tablici 9.

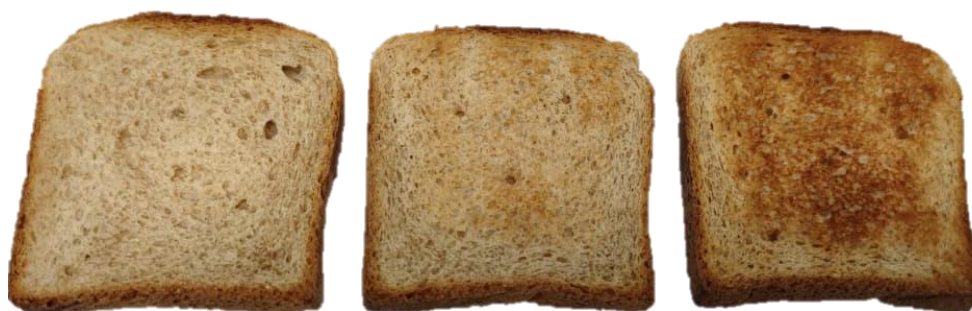
a) PŠENIČNI TOST (A60, A75, A90)



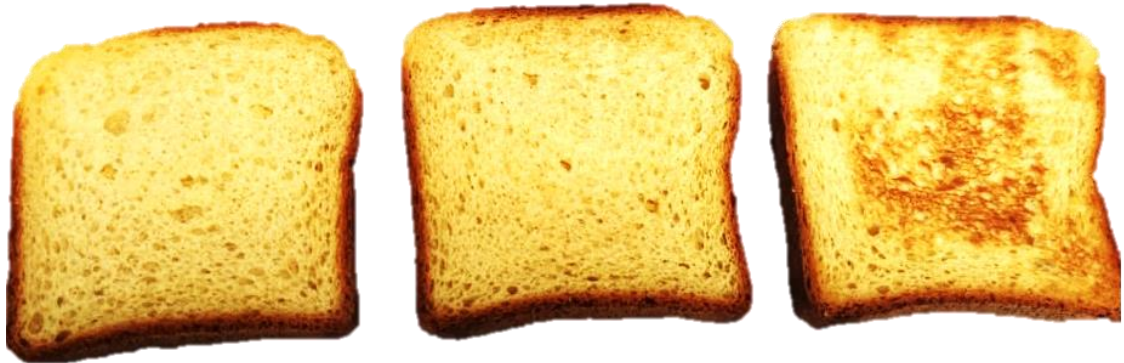
b) PUNOZRNATI TOST (B60, B75, B90)



c) PIROV TOST (C60, C75, C90)



d) PROTEINSKI TOST (D60, D75, D90)



e) RAŽENI TOST (E60, E75, E90)



**Slika 20.** Prikaz uzoraka različitih vrsta tost kruhova dobivenih tostiranjem 60, 75 i 90 sekundi

Tijekom pečenja kruha ili toplinske obrade kao što je tostiranje dolazi do posmeđivanja zbog Maillardovih reakcija i karamelizacije (Sato, 2019). U provedenom istraživanju intenzitet posmeđivanja povećavao se duljom toplinskom obradom (tostiranjem) u svim vrstama tost kruha. Vrijednost parametra  $L^*$  koji označava svjetlinu uzorka se smanjuje porastom trajanja tostiranja i približava vrijednosti 0 koja označava crnu boju.

**Tablica 9.** Rezultati određivanja parametara boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) u svježim i tostiranim uzorcima te ukupna promjena boje ( $\Delta E^*$ ) za tostirane uzorke u odnosu na netostirane

UZORAK	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
<b>A0</b>	75,96	0,42	19,99	
<b>A60</b>	75,91	1,64	24,04	4,23
<b>A75</b>	72,60	3,84	28,32	9,61
<b>A90</b>	56,69	13,53	35,14	27,80
<b>B0</b>	62,30	6,29	22,46	
<b>B60</b>	62,48	6,40	22,01	0,50
<b>B75</b>	61,14	7,06	24,71	2,65
<b>B90</b>	54,17	11,59	30,45	12,57
<b>C0</b>	68,63	5,39	20,90	
<b>C60</b>	67,63	5,57	22,15	1,61
<b>C75</b>	62,80	9,63	29,75	11,41
<b>C90</b>	51,80	15,94	32,48	22,99
<b>D0</b>	73,95	3,44	29,94	
<b>D60</b>	75,04	3,64	30,00	1,11
<b>D75</b>	73,58	4,16	32,30	2,49
<b>D90</b>	61,98	14,14	37,98	17,96
<b>E0</b>	63,23	4,60	21,48	
<b>E60</b>	62,78	4,78	21,71	0,54
<b>E75</b>	55,36	7,88	25,99	9,65
<b>E90</b>	51,48	10,41	26,94	14,20

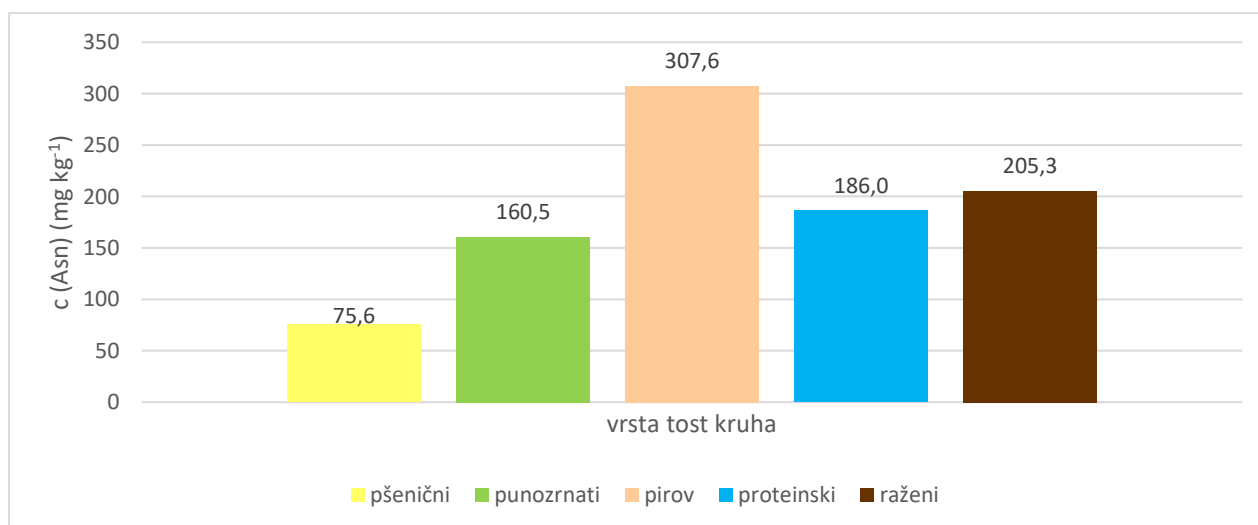
Uspoređujući netostirane uzorke, najsvjetliji je pšenični tost, zatim proteinski, pirov, punozrnati te je najtamniji raženi. Mala odstupanja od tog modela prisutna su jedino kod uzoraka B i D, gdje je vrijednost  $L^*$  za referentni uzorak (B0 i D0) manja od uzorka tostiranog 60 sekundi, odnosno B60 i D60. Vrijednosti parametara  $a^*$  i  $b^*$  proporcionalno rastu za svaku vrstu tosta porastom duljine tostiranja. To znači da se u tostiranim kruhovima povećava udio crvene, odnosno žute boje. Jedina iznimka je kod uzorka B0 (netostirani uzorak) koji ima veću vrijednosti parametra boje  $b^*$  (veći udio žute boje) od uzorka B60. Ako se usporede rezultati ukupne promjene boje ( $\Delta E^*$ ) tostiranih uzoraka u odnosu na referentni (netostirani) uzorak, tada je tostiranjem do najveće promjene boje došlo kod pšeničnog tosta, zatim pirovog, proteinskog, raženog, a najmanja promjena je kod punozrnatog.

Capuano i suradnici (2009) proučavali su utjecaj sastava brašna na nastanak akrilamida u hrskavom kruhu tijekom tostiranja i strategije njegova smanjenja. Uzorci kruha međusobno su se razlikovali po vrsti brašna za izradu (pšenično, raženo i punozrnato pšenično) te vremenu i temperaturi tostiranja. Promjenu boje mjerili su u CIE  $L^*a^*b^*$  sustavu.  $L^*$  vrijednost (svjetlina) je također, kao i u ovom istraživanju, padala s porastom duljine, ali i s porastom temperature tostiranja. Također, vrijednosti parametara boje  $a^*$  i  $b^*$  su rasle tijekom tostiranja što znači da se povećavao udio crvene, odnosno žute boje. Ukupna promjena boje kod najviše temperature i najduljeg trajanja tostiranja bila je najmanja za raženi i punozrnati hrskavi kruh, a najveća kod pšeničnog kruha što je u skladu s rezultatima dobivenim za određivanje boje u ovom istraživanju. To se pripisuje tamnijim nijansama netostiranih kruhova koje imaju raženi i punozrnati kruh zbog svojstava brašna od kojih su napravljeni.

Vrijednost  $b^*$  upućuje na žućkasti ton površine tosta i on je tipičan za kruhove na bazi durum pšenice (Raffo i sur., 2003). To potvrđuju i rezultati određivanja boje ovog istraživanja jer su vrijednosti za uzorke D0, D60, D75, D90 najviše (29,94 – 37,98) uz iznimke A90, B90 i C90.

#### 4.4. REZULTATI ODREĐIVANJA SLOBODNOG ASPARAGINA

Koncentracija slobodnog asparagina, aminokiseline koja se smatra prekursorom u nastanku akrilamida u kruhu i pekarskim proizvodima, određena je u netostiranim uzorcima te su rezultati prikazani na slici 21. Najviša koncentracija asparagina nalazi se u pirovom tostu (307,6 mg kg<sup>-1</sup>), zatim u raženom tostu (205,3 mg kg<sup>-1</sup>), u proteinskom (186,0 mg kg<sup>-1</sup>) i punozrnatom (160,5 mg kg<sup>-1</sup>) dok je najniža koncentracija zabilježena u pšeničnom tostu (75,6 mg kg<sup>-1</sup>).



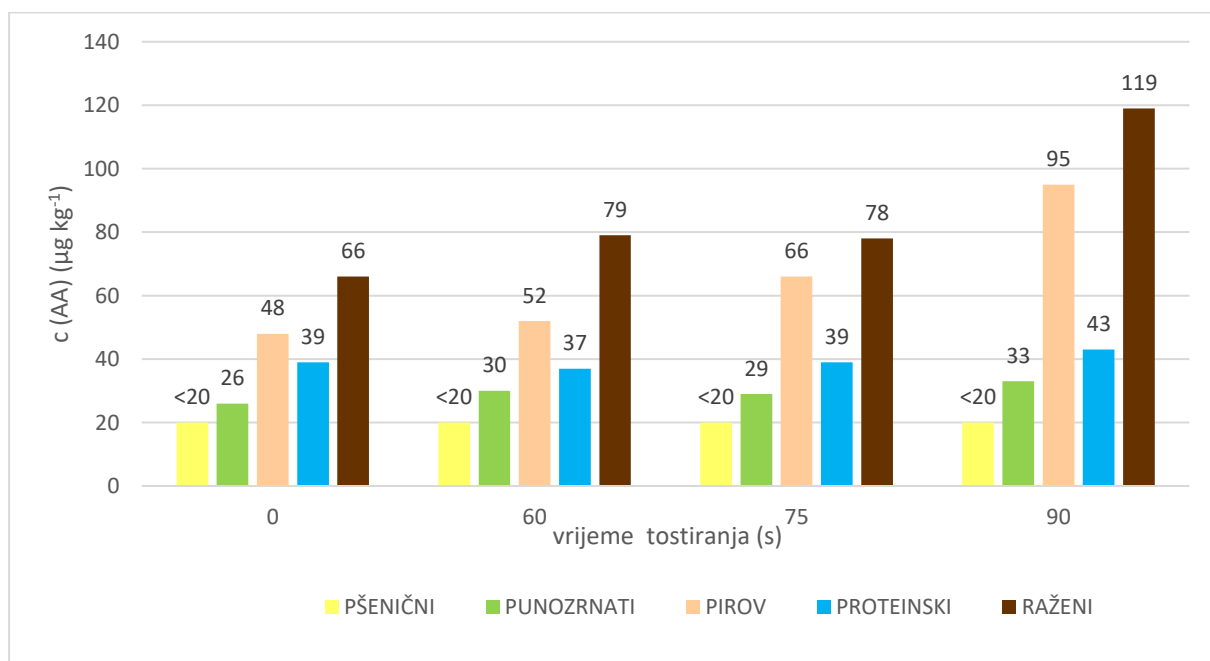
**Slika 21.** Koncentracija (mg kg<sup>-1</sup>) slobodnog asparagina u svježim uzorcima tost kruha

Ako se dobiveni rezultati usporede s procjenom koncentracije asparagina u različitim vrstama žitarica i njihovim frakcijama prikazanim u tablici 4, može se zaključiti da su dobivene koncentracije nešto niže od navedenih. Primjerice, za pšenično brašno se predviđa koncentracija u rasponu od 115 do 500 mg kg<sup>-1</sup>, za cjelovito pšenično brašno od 255 do 450 mg kg<sup>-1</sup>, za raženo brašno od 320 do 880 mg kg<sup>-1</sup>. Pirovo brašno prema literaturi sadrži od 105 do 600 mg kg<sup>-1</sup> asparagina, dok za brašno durum pšenice nema podataka, već samo za njeno zrno koje sadrži 430 – 840 mg kg<sup>-1</sup> što je više od zrna obične pšenice (Mandić Andačić, 2019). Iako netostirani uzorci nisu toplinski obrađeni tostiranjem, oni su prethodno pečeni na temperaturi od 250 ± 10 °C. Iz tog razloga se već prilikom pečenja kruha dio asparagina preveo u akrilamid što je mogući razlog nižih koncentracija asparagina dobivenih u eksperimentu od onih sadržanih u brašnu prema literaturi.

#### **4.5. REZULTATI ODREĐIVANJA AKRILAMIDA**

Akrilamid je određen u tostiranim i netostiranim uzorcima 5 različitih vrsta tost kruhova te je ispitivani uzorak uključivao i koricu i unutrašnjost tosta. U svih 5 netostiranih uzoraka koncentracija akrilamida je ispod referentne vrijednosti propisane Uredbom Europske komisije (2017/2158), odnosno manje od 50 µg kg<sup>-1</sup> za meki kruh na bazi pšenice (uzorci A0, B0 i D0) te manje od 100 µg kg<sup>-1</sup> što je referentna vrijednost za meke kruhove koji su na bazi ostalih žitarica, a u ovom eksperimentu to su kruhovi od pirovog (C0) i raženog brašna (E0). Iako je pir zapravo vrsta pšenice, rezultati određivanja akrilamida uspoređeni su s referentnim vrijednostima za meke kruhove koji nisu na bazi pšenice kao što su to u svojem radu učinili i Mencin i suradnici (2020). Koncentracije akrilamida kod netostiranih uzoraka niže su od 66 µg kg<sup>-1</sup>. Kod uzoraka tostiranih 60 sekundi, sadržaj akrilamida je do 79 µg kg<sup>-1</sup>, za uzorke tostirane 75 sekundi do 78 µg kg<sup>-1</sup>, a za najduže tostirane kruhove u trajanju od 90 sekundi sadržaj akrilamida je do 119 µg kg<sup>-1</sup>. Najmanje koncentracije akrilamida nalaze se u pšeničnom tostu (za sve uzorke ispod granice detekcije: < 20 µg kg<sup>-1</sup>), zatim u punozrnatom pšeničnom tostu (26 – 33 µg kg<sup>-1</sup>), proteinskom (37 – 43 µg kg<sup>-1</sup>) i pirovom (48 – 95 µg kg<sup>-1</sup>). Najveća koncentracija akrilamida određena je u raženom tostu (66 – 119 µg kg<sup>-1</sup>). Za sve tostirane uzorke koncentracija nastalog akrilamida u odnosu na netostirane uzorke raste (iznimka su pšenični tost i proteinski tost kod kojeg se vidi neznatni pad nakon 60 sekundi tostiranja). Kod tostiranja 60 i 75 sekundi je taj porast vrlo blagi te se može pretpostaviti da se u ovim

vremenima tostiranja ne postiže dovoljno visoka temperatura (120 °C) koliko je potrebno za razvijanje značajnijih koncentracija akrilamida (Belkova i sur., 2021). Kod svih uzoraka su najviše koncentracije akrilamida određene kod najduljeg tostiranja (90 sekundi) te se može pretpostaviti da je temperatura kruha kod tog trajanja tostiranja premašila 120 °C te se iz tog razloga vidi skok nastalih koncentracija, posebice kod uzoraka C90 i E90. Općenito, duljim tostiranjem raste i koncentracije akrilamida u uzorcima, uz nekoliko odstupanja kod uzoraka B60 i B75, E60 i E75. Koncentracije akrilamida u svim tostiranim uzorcima su ispod referentnih vrijednosti propisanih Uredbom EK (2017/2158), osim uzorka E90 čija vrijednost iznosi 119  $\mu\text{g kg}^{-1}$  što je više od 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  kolika je referentna vrijednost za meke kruhove koji nisu na bazi pšenice. Rezultati određivanja koncentracije akrilamida u uzorcima različitih vrsta kruha za tostiranje podvrgnutih različitom vremenu tostiranja prikazani su na slici 22.

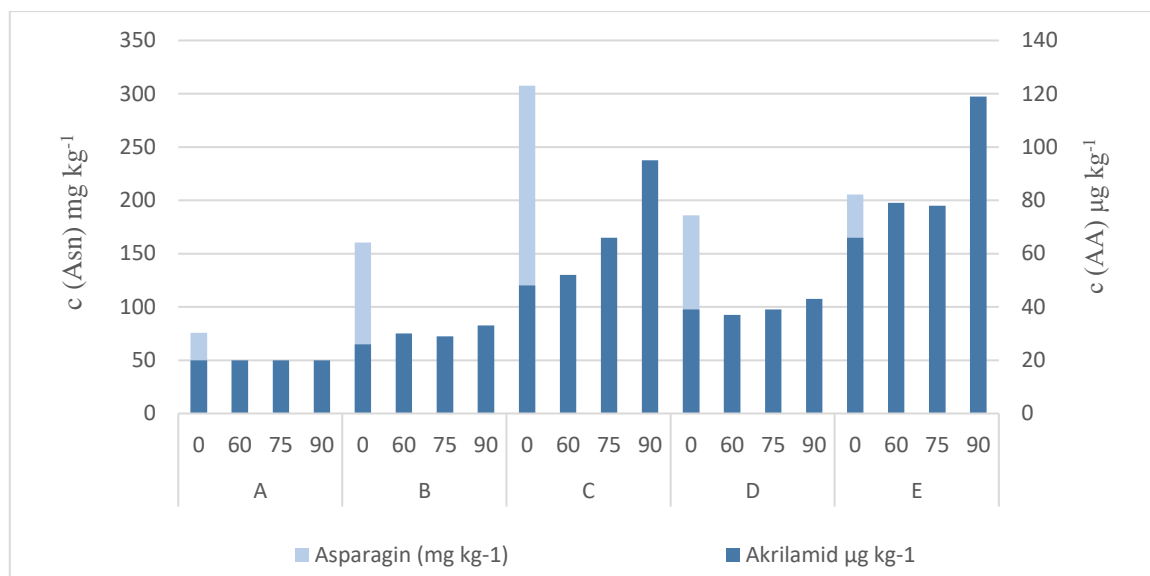


**Slika 22.** Koncentracije akrilamida (AA) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) prije i nakon tostiranja kruha određeno vrijeme (60, 75 i 90 sekundi)

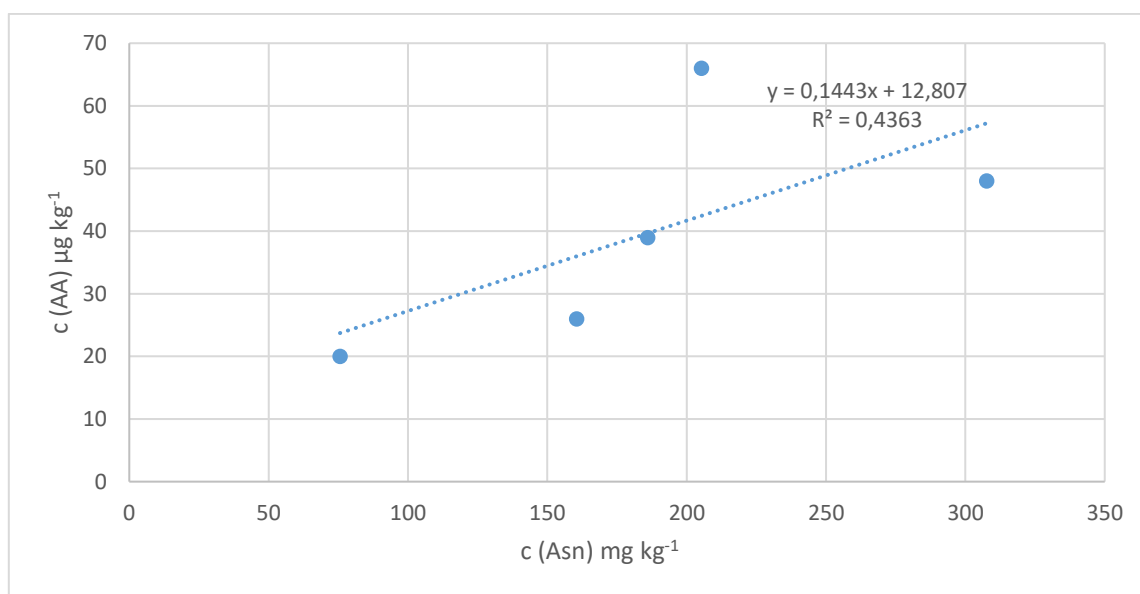
Dobivene koncentracije asparagina, glavnog prekursora u nastajanju akrilamida kod proizvoda na bazi žitarica, mogu se povezati sa sadržajem akrilamida. Najviša koncentracija slobodnog asparagina iznosi kako slijedi: pirov > raženi > proteinski > punozrnati > pšenični kruh za tostiranje. Redoslijed nastalih udjela akrilamida u tostiranim uzorcima je: raženi > pirov > proteinski > punozrnati > pšenični tost. Očekivano, veće koncentracije asparagina u



netostiranim uzorcima rezultirale su intenzivnijim razvojem akrilamida u tostiranim uzorcima, uz jednu iznimku, a to je pirov tost, koji unatoč najvećoj koncentraciji asparagina ima manje nastalog akrilamida nakon tostiranja od raženog tosta. Na slici 23 prikazan je odnos između koncentracija akrilamida i asparagina, a statističkom obradom dobio se Pearsonov koeficijent ( $r = 0,4363$ ) te govori o srednje jakoj linearnoj povezanosti između te dvije varijable (slika 24).



**Slika 23.** Prikaz odnosa između koncentracije akrilamida i koncentracije slobodnog asparagina u netostiranim uzorcima tosta



**Slika 24.** Linearna korelacija između koncentracije akrilamida i koncentracije slobodnog asparagina u netostiranim uzorcima kruha za tostiranje



Granby i suradnici (2008) proveli su slično istraživanje u kojem su pratili povezanost nastanka akrilamida u tostiranim pšeničnim i raženim kruhovima s koncentracijom asparagina u brašnu i kruhu. Rezultati njihovog rada u skladu su s rezultatima ovog istraživanja jer je koncentracija akrilamida u netostiranom pšeničnom kruhu također bila ispod granice detekcije ( $<5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), u srednje tostiranom uzorku koncentracija je  $11 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a jako tostirani uzorak sadržavao je  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Rezultati određivanja akrilamida za raženi kruh u tom radu malo su niži od dobivenih u ovom istraživanju: netostirani 12, srednje tostirani 27 i jako tostirani  $68 \mu\text{g kg}^{-1}$  akrilamida. Navedeni autori odredili su i koncentraciju slobodnog asparagina u brašnu te ona u pšeničnom brašnu iznosi  $0,14 \text{ g kg}^{-1}$ , a u raženom  $0,76 \text{ g kg}^{-1}$  što su nešto viši iznosi od dobivenih koncentracija u ovom istraživanju. Razlog tomu je što se u ovom istraživanju koncentracija određivala u kruhu, a ne u brašnu. Različitim koncentracijama asparagina navedeni autori su objasnili razlike u koncentracijama akrilamida u kruhu nakon tostiranja. Osim toga, dio njihovog istraživanja odnosio se na utjecaj dodatka različite koncentracije asparagina u brašno te su prema dobivenim rezultatima zaključili da tijekom cijelog procesa pečenja kruha dolazi do smanjenja slobodnog asparagina. Ta redukcija je kod pšeničnog kruha veća nego kod raženog. Budući da je dodani sadržaj asparagina bio različiti za pšenične i ražene kruhove, rezultati su teško usporedivi, no autori su zaključili da je stupanj nastanka akrilamida nešto veći kod pšeničnih kruhova što nije u skladu s rezultatima ovoga rada. Granby i suradnici su dobivene rezultate objasnili kiselijim uvjetima kod raženog kruha do kojih dolazi zbog upotrebe kiselog tijesta u procesu proizvodnje, dok se kod pšeničnog kruha koristi klasična kvaščeva fermentacija.

Mencin i suradnici (2020) proveli su istraživanje o pristunosti akrilamida na slovenskom tržištu. Istraživanje je obuhvatilo 5 prehrambenih kategorija, među kojima je bila i kategorija “kruh i tost” te su vrijednosti varirale između  $44,5 - 246,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Srednja vrijednost svih ispitivanih uzoraka bila je veća od one koju preporučuje EFSA (2015). Četiri od pet uzoraka mekih kruhova na bazi pšenice imalo je više vrijednosti od preporučenih referentnih, među njima i tost kruh s 37 % višom vrijednosti od preporučene. Također, oba meka kruha koja nisu na bazi pšenice (pirov i raženi) imali su veću razinu akrilamida od preporučenih  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Zaključili su da se zbog vrlo raširene upotrebe upravo te kategorije “kruh i tost” ona može smatrati najvećim rizikom od unosa akrilamida i to čak 56 % od ukupnog rizika.

U radu Belkove i suradnika (2021) se navodi da se koncentracija akrilamida značajno povećala nakon 2,5 minute tostiranja, no iako sama koncentracija akrilamida u šnitama kruha nije visoka (prosječno  $42 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), problem je u učestalosti njegove konzumacije među populacijom

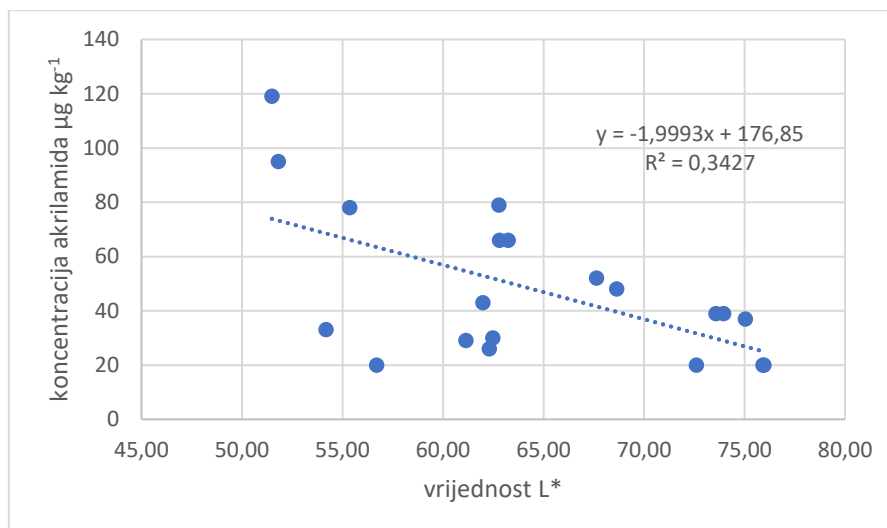
građana EU te za odrasle iznosi do 23 %, a za djecu do 25 % ukupne prehrane. Osim toga, unos ovisi i o navikama kućanstva vezanih uz učestalost tostiranja te poželjni intenzitet tostiranja. Caupano i suradnici (2009) su uz različito trajanje tostiranja pratili i utjecaj različitih temperatura tostiranja na nastanak akrilamida. Akrilamid nije utvrđen ni kod netostiranih uzoraka, ali niti kod najniže upotrijebljene temperature tostiranja (140 °C). Na temperaturama tostiranja od 160 i 180 °C su uzorci punozrnatog i raženog kruha imali veću koncentraciju akrilamida od pšeničnog hrskavog kruha što je u skladu i s rezultatima ovog rada. Za najdulje vrijeme (25 min) tostiranja pri najvišoj temperaturi (160 °C) rezultati nastanka akrilamida su za pšenični, punozrnati pšenični i raženi hrskavi kruh redom iznosili: 262,3, 291,0 i 301,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Autori su to objasnili višim sadržajem slobodnog asparagina, koji je limitirajući faktor reakcije nastanka akrilamida, u raženom i punozrnatom brašnu.

Poželjni intenzitet tostiranja ovisi o osobnim preferencijama potrošača. U ranijim radovima se pokazalo da je boja konačnog proizvoda u korelaciji s nastalim akrilamidom (Raffan i Halford, 2019). Rezultati korelacije akrilamida i vrijednosti  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  prikazani su u tablici 10.

**Tablica 10.** Prikaz p-vrijednosti i Pearsonovog koeficijenta između vrijednosti  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  i koncentracije akrilamida

	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<b>r</b> (Pearsonov koeficijent)	0,3427	0,1517	0,000
<b>p-vrijednost</b>	0,007	0,090	0,971
	<b>p &lt;0,05</b>	p >0,05	p >0,05

Iz rezultata prikazanih na slici 25 može zaključiti da između varijable  $L^*$  i nastale koncentracije akrilamida postoji linearna povezanost i ona je statistički značajna. Prema ljestvici vrijednosti koeficijenta ta povezanost je niska (0,2 – 0,39). Za vrijednost  $a^*$  je koeficijent linearne povezanosti s koncentracijom akrilamida još niži te se ne smatra da postoji statistički značajna povezanost. Vrijednost Pearsonovoga koeficijenta za  $b^*$  ukazuje da linearne povezanosti nema (nema grafičkog prikaza u radu).



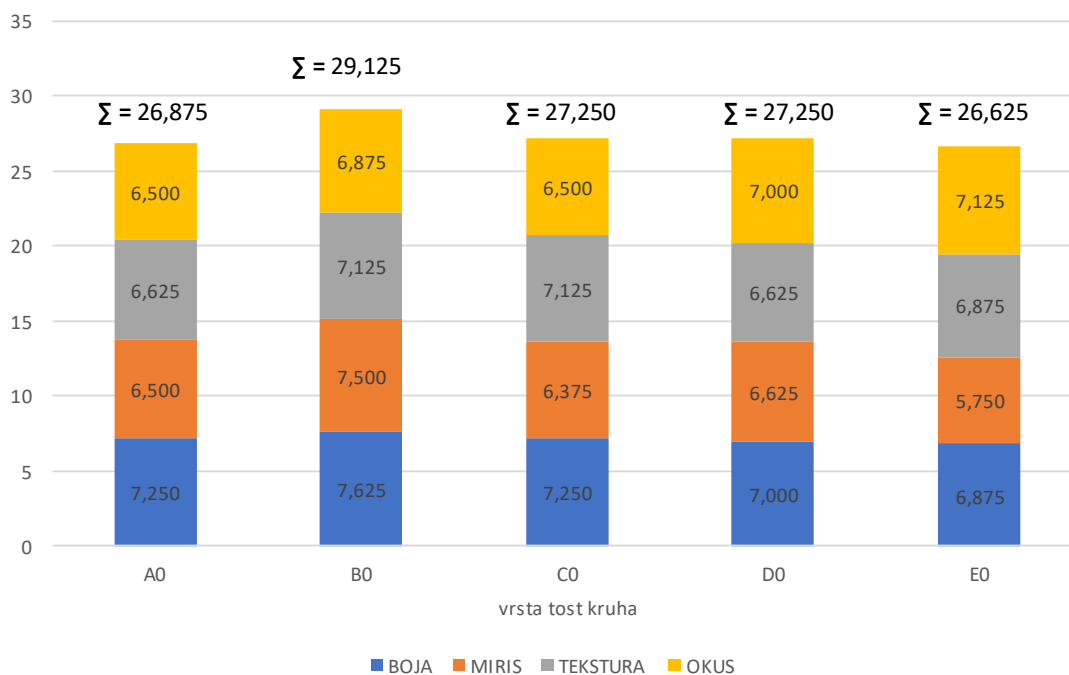
**Slika 25.** Linearna korelacije između koncentracije akrilamida i vrijednosti L\*

Povezanost parametara boje i koncentracije akrilamida praćena je na prženim krumpirima u radu autora Jackson i Al-Taher (2005) koji su zaključili da postoji visoka linearna povezanost koncentracije akrilamida s parametrom boje L\* ( $r = 0,8551$ ) i a\* ( $r = 0,8558$ ), dok je za vrijednost b\* povezanost bila zanemariva. Rezultati za pečeni krumpir ukazali su da je linearna povezanost bila znatno slabija, za parametar boje L\* ( $r = 0,3425$ ) i a\* ( $r = 0,3502$ ). Osim u krumpiru, navedeno istraživanje uključilo je i praćenje koncentracije akrilamida nakon tostiranja različitih vrsta kruhova te su rezultati pokazali da je najveća koncentracija akrilamida prisutna pri najduljem tostiranju (15 min). Vrijednosti su iznosile od otprilike 40 do iznad 600  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a najviše koncentracije nastalog akrilamida nastale su u uzorku kruha od krumpirovog tijesta, što se objašnjava visokim koncentracijama asparagina u krumpirovom tijestu. To se može uzeti kao još jedan dokaz povezanosti koncentracije asparagina s nastankom akrilamida u kruhu tostiranjem.

#### 4.6. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE

Tijekom tostiranja ili pećenja kruha odvijaju se mnoge poželjne reakcije koje doprinose poželjnim senzorskim svojstvima kao što su okus, boja i tekstura. Neke od tvari karakterističnih za kruh se javljaju već kod fermentacije tijesta, no većina ih nastaje prilikom termičke obrade (Pétel i sur., 2017). Kod senzorske analize netostiranih uzoraka je 9-bodnovnom hedonističkom skalom najbolje ocjenjen uzorak B0, odnosno punozrnati pšenični tost. Zbroj prosječnih ocjena

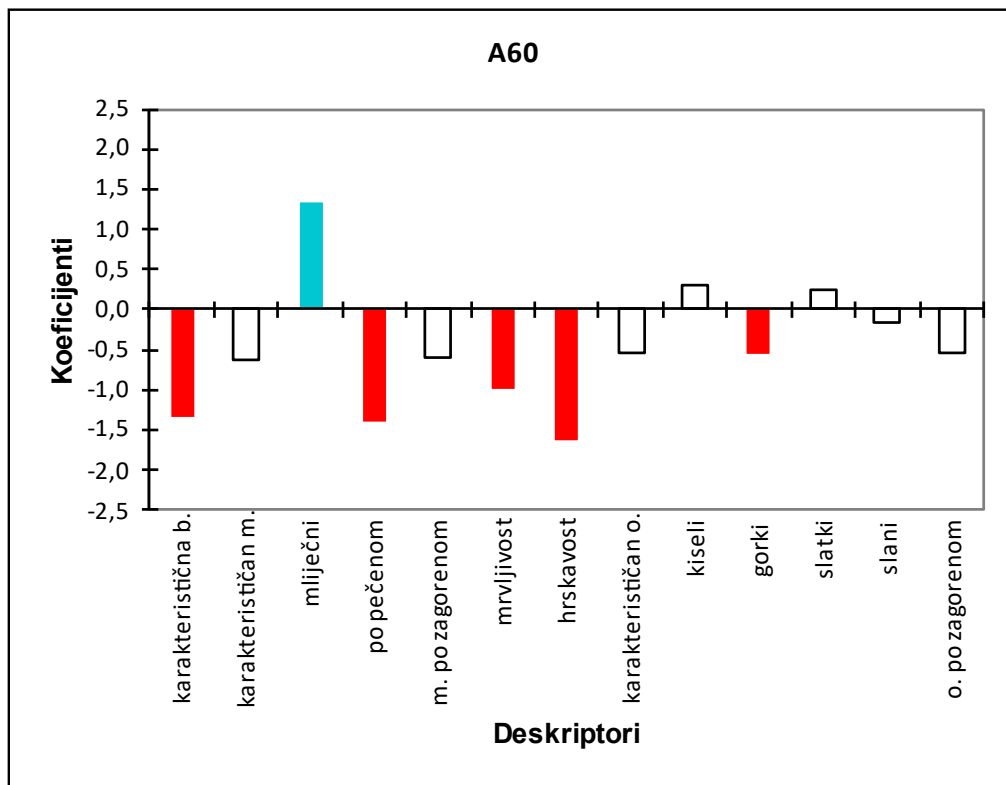
za svako ispitivano svojstvo za navedeni uzorak je 29,125. Drugi u ukupnom poretku ocjena su s istim brojem bodova uzorci C0 i D0 (27,250), a nakon njih uzorak A0 (26,875). Najlošije ocjenjeni uzorak je E0, odnosno raženi tost s ocjenom 26,625. Uzorak B0 dobio je najviše ocjene za sva senzorska svojstva (boja, miris i tekstura), osim za okus. Najvišu ocjenu za senzorsko svojstvo okusa dobio je uzorak E0, odnosno raženi kruh koji je u ukupnom poretku posljednji. Rezultati senzorskog ocjenjivanja prikazani su na slici 26.



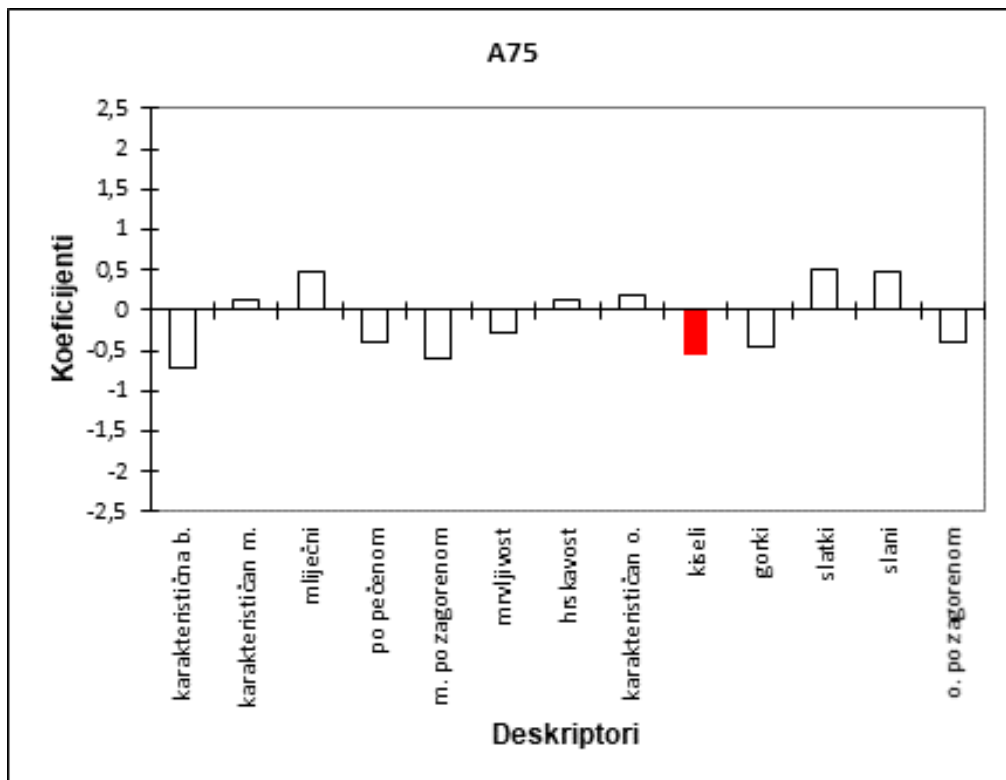
**Slika 26.** Rezultati senzorske analize netostiranih uzoraka

Za tostirane uzorke se koristila deskriptivna senzorska analiza gdje su ispitanici pomoću 13 deskriptora opisali 4 senzorska svojstva: boju, miris, teksturu i okus. Na slici 27 je primjer grafičkog prikaza dobivenih rezultata nakon obrade u programu XLSTAT za uzorke pšeničnog tosta (A60, A75 i A90). Grafički prikaz ostalih rezultata deskriptivne senzorske analize nalazi se je u Prilogu 2. Na slici se za svaki uzorak može vidjeti kakva je ocjena za svaki pojedini deskriptor u usporedbi s drugim uzorcima. Plava obojanost stupca upućuje da je vrijednost ocjene uzorka za taj deskriptor statistički značajno ( $p < 0,05$ ) iznad prosječne ocjene svih uzoraka. Crvena boja stupca znači da uzorak ima ocjenu deskriptora statistički značajno ( $p < 0,05$ ) nižu od prosječne ocjene svih uzoraka. Stupac bez obojenja znači da se ocjena za pojedini deskriptor statistički ne razlikuje od prosjeka ostalih uzoraka.

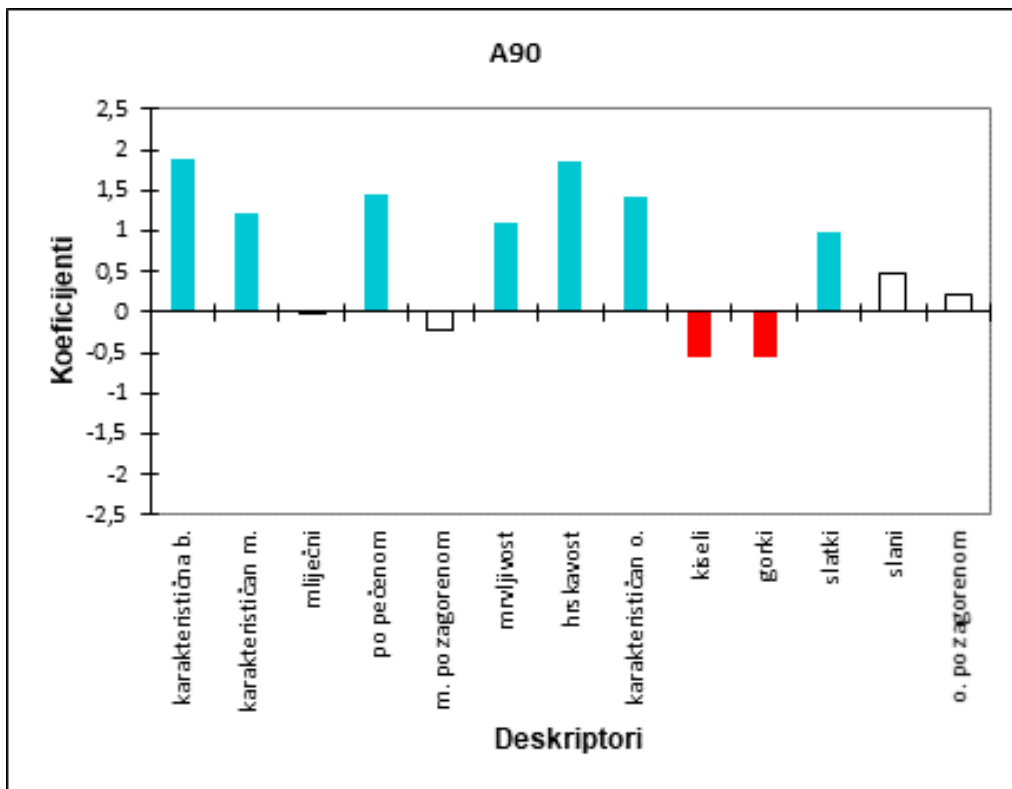
a) UZORAK A60



b) UZORAK A75



c) UZORAK A90



**Slika 27.** Grafički prikaz rezultata deskriptivne senzorske analize za uzorke a) A60 b) A75 c) A90

Svi rezultati su zbog lakše preglednosti prikazani u pojednostavljenom prikazu u tablici 11. Poredak u tablici se temelji na broju deskriptora čija se ocjena statistički značajno razlikuje od ostalih ocjena. Točnije, prva mjesta zauzimaju uzorci s najviše deskriptora koji su ocjenjeni sa statistički značajno višim ocjenama od prosječnih, a na kraju tablice su uzorci s mnogo deskriptora ocjenjenih sa statistički značajno nižim ocjenama od prosječnih ocjena. Pomoću grafičkog prikaza rezultata lako je zamijetiti da su svi uzorci tostirani 60 sekundi (kao i primjer na slici 27 a) A60 ) imali najviše crvenih stupaca, odnosno najviše deskriptora koji su ocjenjeni statistički nižom ocjenom od prosječne ocjene svih uzoraka te se nalaze na dnu tablice 11.

**Tablica 11.** Prikaz rezultata deskriptivne senzorske analize tostiranih uzoraka

	hrskavost	po pečenom	karakterističan okus	karakteristična boja	karakterističan miris	mrvljivost	okus po zagorenom	miris po zagorenom	slatki	slani	gorcki	kiseli	mliječni
E90	7,250	6,750	6,625	7,625	6,750	4,375	2,625	3,125	3,000	2,750	2,625	2,250	2,875
C90	7,000	6,375	6,500	7,250	6,875	5,125	2,375	3,000	3,750	2,750	1,625	1,375	3,500
A90	6,750	6,250	6,625	7,375	6,875	4,500	1,750	1,750	4,375	3,000	1,125	1,000	3,500
C75	6,250	5,625	5,750	6,500	5,625	4,875	1,750	3,000	3,625	2,250	1,625	1,375	3,500
B90	6,000	5,375	5,625	6,750	6,125	3,125	1,750	2,250	3,500	3,125	1,500	1,250	3,250
D90	6,250	5,125	5,875	7,000	6,625	3,750	1,375	2,000	4,125	1,875	1,375	1,250	3,125
E75	4,625	4,875	4,875	4,875	5,375	3,875	1,375	2,000	2,750	2,625	2,375	2,125	3,625
A75	5,000	4,375	5,375	4,750	5,750	3,125	1,125	1,375	3,875	3,000	1,250	1,000	4,000
E60	4,375	4,375	4,875	4,250	5,500	3,125	1,375	2,000	2,500	2,500	2,750	2,375	3,125
D75	4,375	4,750	4,750	4,875	4,750	3,000	1,250	1,625	3,125	2,000	1,375	1,500	3,250
B75	3,500	4,250	4,375	5,125	5,250	2,250	1,500	1,750	2,750	2,625	1,625	1,500	3,500
C60	2,875	4,000	4,000	4,500	4,500	2,875	1,125	1,500	3,500	2,125	1,750	1,500	3,875
B60	2,750	3,500	4,250	3,500	5,250	2,125	1,375	1,500	2,750	2,625	1,750	1,375	3,625
A60	3,250	3,375	4,625	4,125	5,000	2,375	1,000	1,375	3,625	2,375	1,125	1,875	4,875
D60	3,000	2,750	3,500	3,625	4,250	2,375	1,125	1,500	3,250	2,250	1,500	1,750	3,125

Primjerice, za uzorak A60 su deskriptori karakteristična boja, miris po pečenom, oba deskriptora koja opisuju teksturu (mrvljivost i hrskavost) i gorki okus ocjenjeni nižim ocjenama od ostalih uzoraka, dok je mliječni miris bio intenzivnije izražen nego kod ostalih uzoraka. Za uzorke tostirane 75 sekundi su deskriptori većinom bili ocjenjeni prosječnim ocjenama koje nisu bile statistički značajne (slika 27 b) A75) i oni se nalaze pretežno na sredini tablice 11. Iznimka je uzorak B75 koji ima čak 3 deskriptora (mrvljivost, hrskavost i karakterističan okus) ocjenjena statistički značajno nižim ocjenama od prosjeka, a s druge strane, uzorak C75 ima čak 4 deskriptora (karakteristična boja, miris po zagorenom, mrvljivost i hrskavost) ocjenjena statistički značajno višim ocjenama. Za najduže tostirane uzorke, 90 sekundi, iz rezultata jasno se vidi da je većina deskriptora ocjenjena statistički značajno višim ocjenama nego kod ostalih uzoraka. Na primjeru slike 27 c) A90 jasno se vidi da su senzorski poželjna svojstva kao što su karakteristična boja, okus, miris, hrskavost, miris po pečenom vrlo visoko ocjenjena, dok su manje poželjna svojstva kao što su kiseli i gorki okus slabije ocjenjena od prosjeka. Slično je i kod ostalih uzoraka i to se lako može vidjeti u tablici 11, gdje se na prva 6 mjesta tablice nalazi svih 5 uzoraka različitih tost kruhova koji su bili tostirani 90 sekundi. Na prvom mjestu tablice je uzorak E90 koji ima 10 od 13 deskriptora ocjenjenih bolje od prosjeka. Izuzetno visoke ocjene su dodijeljene za senzorski poželjna svojstva kao što su hrskavost (7,250), miris po pečenom (6,750), karakterističan okus (6,625), boja (7,625) i miris (6,750), no nešto više ocjene od prosjeka dobio je i za senzorski manje poželjne deskriptore kao što su mrvljivost (4,375), okus (2,625) i miris po zagorenom (3,125) te kiseli (2,250) i gorki (2,625) okus. Vrlo slične ocjene dobili su i uzorci C90 i A90. Sredinu tablice zauzimaju većinom uzorci tostirani 75 sekundi, dok su na posljednje 4 pozicije uzorci tostirani 60 sekundi (C60, B60, A60, D60). Uzorak D60 ima čak 6 deskriptora ocjenjenih statistički značajnom nižom ocjenom od prosjeka i među njima su svi koji se smatraju senzorski poželjnim svojstvima, a to su: hrskavost (3,000), miris po pečenom (2,750), karakterističan okus (3,500), boja (3,625) i miris (4,250).

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da su panelisti najviše ocjene dali uzorcima tostiranim 90 sekundi, a najmanje onima koji su bili tostirani najkraće, odnosno 60 sekundi. Konkretnije, uzorak E90 dobio je najviše ocjene za poželjna senzorska svojstva. Uspoređujući s netostiranim uzorcima, uzorak E0 je za svojstvo okusa dobio najviše ocjene, no ostale karakteristike se panelistima nisu svidjele te je ukupno najlošije ocjenjen. No, očito su se nakon 90 sekundi tostiranja razvile i ostale senzorski poželjne karakteristike te je iz tog razloga tako dobro ocijenjen u deskriptivnoj senzorskoj analizi.



Hrskavost se za tostirane kruhove smatra poželjnim i svojstvenim za tu vrstu namirnica. Uzorak E90 ima najvišu senzorsku ocjenu za taj deskriptor, a na to upućuje i rezultat određivanja teksture, gdje je taj uzorak imao i najveću tvrdoću, ali i upotrijebljeni rad koji se može protumačiti kao žvakanje. Sva tri uzorka raženog tosta (E60, E75, E90) imaju statistički značajno više ocjene za kiseli i gorki okus, što je zapravo karakteristično svojstvo raženog kruha.

Zanimljivo je povezati podatak da su prva dva najbolje ocjenjena uzorka (E90 i C90) upravo uzorci s najvećom izmjerenom koncentracijom akrilamida.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Rezultati određivanja teksture tostiranih uzoraka upućuju da tvrdoća i upotrijebljeni rad rastu, a elastičnost opada duljim trajanjem tostiranja. Vrijednosti svih parametara su porasle nakon hlađenja uzoraka.
2. Od netostiranih uzoraka, najveću čvrstoću ima pirov tost (983,7 g), a najmanju punozrnati pšenični tost (532 g).
3. Rezultati određivanja udjela suhe tvari linearno su povezani s trajanjem tostiranja. Najveći udio suhe tvari kod netostiranih uzoraka ima raženi tost, zatim pšenični, pirov, punozrnati pšenični i proteinski.
4. Rezultati određivanja boje upućuju na smanjivanje vrijednosti parametra  $L^*$  i povećanje vrijednosti parametara  $a^*$  i  $b^*$  u korelaciji s trajanjem tostiranja. Najveća ukupna promjena boje nakon tostiranja zamijećena je kod pšeničnog tosta, a najmanja kod punozrnatog pšeničnog.
5. Najviši sadržaj asparagina određen je u pirovom tostu ( $307,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ), zatim u raženom tostu ( $205,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), proteinskom ( $186,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), punozrnatom ( $160,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i najniža koncentracija u pšeničnom tostu ( $75,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ).
6. Sadržaj akrilamida je u svih 5 netostiranih uzoraka kruhova ispod referentnih vrijednosti propisanih Uredbom Europske komisije. Kod tostiranih uzoraka sadržaj akrilamida raste s duljim trajanjem tostiranja. Najviši sadržaj akrilamida ima uzorak raženog tosta tostiran 90 sekundi:  $119 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  i to je ujedno i jedini uzorak koji premašuje referentnu vrijednost propisanu Uredbom EK. Nakon raženog tosta, najviši sadržaj akrilamida određen je u pirovom tostu ( $95 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), zatim redom proteinskom ( $43 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), punozrnatom ( $33 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i pšeničnom tostu ( $< 20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ).
7. Utvrđena je statistički značajna linearna korelacija između sadržaja asparagina u netostiranim uzorcima tosta i sadržaja nastalog akrilamida. Također, linearna korelacija utvrđena je između vrijednosti parametra boje  $L^*$ , koji predstavlja svjetlinu uzorka i koncentracije akrilamida.

8. Najbolju ukupnu ocjenu kod senzorske analize netostiranih uzoraka dobio je punozrnati pšenični tost (29,125), nakon njega s istim brojem bodova pirov i proteinski tost (27,250), zatim pšenični (26,875) i raženi (26,625) na kraju.
9. Rezultati deskriptivne senzorske analize tostiranih kruhova upućuju da su panelisti najbolje ocijenili tosteve koji su najdulje bili tostirani. Izuzetno visoke ocjene za poželjne senzorske deskriptore dobili su uzorci E90, C90 i A90. S druge strane, uzorci tostirani najkraći period (C60, B60, A60, D60) ocijenjeni su statistički značajno nižim ocjenama za poželjne senzorske deskriptore.

## 6. LITERATURA

AACC International Method 62-05.01 Preparation of Sample: Bread

AACC International Method 74 – 09.01, Measurement of Bread Firmness by Universal Testing Machine

Ahrné L, Andersson C-G, Floberg F, Rosén J, Lingnert H (2007) Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: steam and falling temperature baking. *LWT Food Sci Technol* **40(10)**: 1708– 1715. doi: 10.1016/j.lwt.2007.01.010

Albrecht, T, Ehrlinger, HG, Schild, E, Willeke, E (2010) *Priručnik o pekarstvu i slastičarstvu* (preveo Klarić, F), TIM ZIP d.o.o., Zagreb.

Amrein, TM (2005) Systematic studies on process optimization to minimize Acrylamide contents in food. PhD thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.

Amrein, TM, Schönbacher, B, Escher, F, Amadò, R (2004) Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *J Agric Food Chem* **52**, 4282–4288. doi: 10.1021/jf049648b

Badanjak Sabolović M, Rimac Brnčić S (2016) Utjecaj procesa pripreme na udio akrilamida u prerađenoj hrani. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11 (1-2)**, 79–84.

Belkova, B, Chytilova, L, Kocourek, V, Slukova, M, Mastovska, K, Kyselka, J, i sur. (2021) Influence of dough composition on the formation of processing contaminants in yeast-leavened wheat toasted bread, *Food Chem* **338**. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127715

Capuano, E, Ferrigno, A, Acampa, I, Serpen, A, Açar, Ö, Gökmen, V, Fogliano, V (2009) Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation ategies, *Food Res Int* **42**, 1295-1302. doi: 10.1016/j.foodres.2009.03.018

Cauvain, S (2003) Breadmaking: an overview U: Bread Making – Improving Quality (Cauvain, SP, ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 8-28.

Chace, DH, Kalas, TA (2005) A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing *Clin Biochem*, **38(4)**, 296-309. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.01.017

Claus, A, Mongili, M, Weisz, G, Schieber, A, Carle, R (2008) Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *J Cereal Sci* **47**, 546–549. doi: 10.1016/j.jcs.2007.06.011

Curtis, T, Halford, NG (2016) Reducing the acrylamide-forming potential of wheat. *Food Energy Secur* **5**, 153-164. doi: 10.1002/fes3.85

Čukelj N (2007) Bezglutenski kruh povećane vrijednosti (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Ćurić, D, Ugarčić, Ž, Novotni, D, Koceva Komlenić, D, Jukić, M (2013) Stanje u mlinskoj, pekarskoj i tjesteničarskoj industriji te perspektive razvoja tih vrsta industrije U: Znanstveni skup Proizvodnja hrane i šumarstvo - temelj razvoja istočne Hrvatske: u povodu 20 obljetnice utemeljenja Znanstvenog vijeća za poljoprivredu i šumarstvo (Matić, S, Tomić, F, Anić, I ur.): sažeci

Dybing, E, Farmer, PB, Andersen, M, Fennel, TR, Lalljie, SP, Muller, DJ, Olin, S, Petersen, BJ, Schlatter, J, Scholz, G, Scimeca, JA, Slimani, N, Törnqvist, M, Tuijtelaars, S, Verger, P (2005) Human exposure and internal dose assessment of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol* **43(3)**, 365–410. doi: 10.1016/j.fct.2004.11.004

Eckardt, J, Öhgren, C, Alp, A, Ekman, S, Åöm, A, Chen, G i sur. (2013) Long-term frozen storage of wheat bread and dough-Effect of time, temperature and fibre on sensory quality, microstructure and state of water. *J Cereal Sci* **57**, 125–133. doi: 10.1016/j.jcs.2012.10.007

EFSA (2011) Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and Exposure assessment EFSA - European Food Safety Authority, <https://efsaonlinelibrarywileycom/doi/102903/jefsa20112133>. Pristupljeno 18. lipnja 2021.

EFSA CONTAM Panel (2015) Scientific Opinion on acrylamide in food EFSA CONTAM Panel - European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain, <https://efsaonlinelibrarywileycom/doi/102903/jefsa20154104>. Pristupljeno 20. lipnja 2021.

- Elbashir, AA, Omar, MMA, Ibrahim, WAW, Schmitz, OJ, Aboul-Enein, HY (2014) Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods. *Crit Rev Anal Chem* **44**, 107–141. doi: 10.1080/10408347.2013.829388
- Elmore, JS, Koutsidis, G, Dodson, AT, Mottram, DS, Wedzicha, BL (2005) The effect of cooking on acrylamide and its precursors in potato, wheat and rye. *Adv Exp Med Biol* **561**, 255-269. doi: 10.1007/0-387-24980-X\_19
- Eriksson, S (2005) Acrylamide in food products: Identificaton, formation and analytical methodology PhD thesis, Stockhlom University, Sweden.
- FDE (2013) Acrylamide Toolbox 2013 FDE – Food Drink Europe, [https://portalnebihgovhu/documents/10182/323140/toolbox\\_acrylamide\\_201401\\_enpdf/cd970927-fc07-46eb-9f80-c4f1b20861fa](https://portalnebihgovhu/documents/10182/323140/toolbox_acrylamide_201401_enpdf/cd970927-fc07-46eb-9f80-c4f1b20861fa). Pristupljeno 2. srpnja 2021.
- FDE (2019) Acrylamide Toolbox 2019 FDE – Food Drink Europe, [https://www.fooddrinkeurope.eu/wpcontent/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope\\_Acrylamide\\_Toolbox\\_2019pdf](https://www.fooddrinkeurope.eu/wpcontent/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019pdf). Pristupljeno 2. srpnja 2021.
- Fountain, KJ (2011) UPLC versus UHPLC: Comparison of Loading and Peak Capacity for Small Molecule Drugs, Waters Corporation <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003869enpdf>. Pristupljeno 16. rujna 2021.
- Fredriksson, H, Tallving, J, Rosén, J, Åman, P (2004) Fermentation Reduces Free Asparagine in Dough and Acrylamide Content in Bread. *Cereal Chem* **81**, 650- 653. doi: 10.1094/CCHEM.2004.81.5.650
- Funami, T (2011) Next target for food hydrocolloid studies: Texture design of foods using hydrocolloid technology. *Food Hydrocoll* **25**, 1904–1914. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.03.010
- Gavrilović, M (2011) Tehnologija konditorskih proizvoda. Zavod za izdavanje udžbenika Novi Sad, Novi Sad.
- Gökmen V, Açar Ö Ç, Köksel H, Açar J (2007) Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chem* **104(3)**: 1136–1142. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.008

Gökmen V, Açar ÖÇ, Arribas-Lorenzo G, Morales FJ (2008) Investigating the correlation between acrylamide content and browning ratio of model cookies. *J Food Eng* **87(3)**, 380–385. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.008

Granby, K, Nielsen, N, Hedegaard, R, Christensen, T, Kann, M, Skibsted, L (2008) Acrylamide - Asparagine relationship in baked/toasted wheat and rye breads. *Food Addit Contam* **25(8)**: 921-929. doi: 10.1080/02652030801958905

Gray A, Lawrence P (2008) Basic HPLC Theory and Practice U: Principles and Practice of Bioanalysis (Venn, RF, ur.), CRC Press, 41-69.

HAH (2014): *Znanstveno mišljenje o učinku smanjenog unosa kuhinjske soli u prehrani ljudi*, HAH - Hrvatska agencija za hranu, Osijek, <https://www.hapihhr/wp-content/uploads/2019/04/Manje-soli-vi%C5%A1e-zdravlja.pdf>. Pristupljeno 22. svibnja 2021.

HAPIH (2020): *Znanstveno izvješće o unosu kuhinjske soli konzumacijom kruha i pekarskih proizvoda Ad hoc Radna grupa Centra za sigurnost hrane*, HAPIH - Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Osijek, [https://www.hapihhr/wp-content/uploads/2021/01/Znanstveno-izvjesce-o-unosu-kuhinjske-soli-konzumacijom-kruha-i-pekarskih-proizvoda\\_compressed.pdf](https://www.hapihhr/wp-content/uploads/2021/01/Znanstveno-izvjesce-o-unosu-kuhinjske-soli-konzumacijom-kruha-i-pekarskih-proizvoda_compressed.pdf). Pristupljeno 22. svibnja 2021.

Hug-Iten, S, Handschin, S, Conde-Petit, B, Escher, F (1999) Changes in Starch Microstructure on Baking and Staling of Wheat Bread, *LWT* **32(5)**, , 255-260. doi.org/10.1006/fstl.1999.0544

IARC (1994) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans IARC - International Agency for Research on Cancer. *IARC* **60**, 389–433. doi: 10.3123/jems.26.183

Jackson LS, Al-Taher F (2005) Effects of Consumer Food Preparation on Acrylamide Formation U: Chemistry and Safety of Acrylamide in Food (Friedman M, Mottram D, ur.). *Adv Exp Med Biol*, **561**. doi: 10.1007/0-387-24980-X\_34

JECFA (2011) Evaluation of Certain Contaminants in Food JECFA - The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva. *World Health Organ Tech Rep Ser* **959**, 9–20.

Katalinić, V (2011) Temeljno znanje o prehrani, Sveučilišni priručnik, Zagreb.

Keramat, J, LeBail, A, Prost, C, Jafari, M (2011) Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food Bioprocess technol* **4**, 530-543. doi:10.1007/s11947-010-0495-1

- Kutzli I, Weiss J, Gibis M (2021) Glycation of Plant Proteins Via Maillard Reaction: Reaction Chemiy, Technofunctional Properties, and Potential Food Application. *Foods* **10(2)**, 376. doi: 10.3390/foods10020376
- Lineback, DR, Coughlin, JR, Stadler, RH (2012) AA in Foods: A Review of the Science and Future Consideration. *Annu Rev Food Sci* **3**, 15-35. doi:10.1177/1091581820902405
- Lipworth, L, Sonderman, JS, Tarone, RE, McLaughlin, JK (2013) Acrylamide: a human cancer risk. *Eur J Cancer Prev* **22**, 193–194. doi: 10.1097/cej.0b013e3283529b64
- Maan, AA, Anjum, MA, Khan, MKI, Nazir, A, Saeed, F, Afzaal M i sur. (2020) Acrylamide Formation and Different Mitigation ategies during Food Processing – A Review. *Food Rev Int* **36(2)** 1-18. doi: 10.1080/87559129.2020.1719505
- Magdić, D, Brođanac, M, Miklaj, M, Ferić, V (2000) Određivanje optimalnog vremena fermentacije tijesta za kruh U: Proceedings of Second Croatian Congress of Cereal Technologists with international participation "Brašno-kruh 99" (Ugarčić-Hardi, Ž, ur.)
- Mandić Andačić, I (2019) Primjena inovativnih procesnih tehnika radi smanjenja nastanka akrilamida u prženim proizvodima, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Mandić Andačić, I, Tot, A, Ivešić, M, Krivohlavek, A, Thirumdas, R, Barba, FJ i sur. (2020) Exposure of the Croatian adult population to acrylamide through bread and bakery products. *Food chem* **320**. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126771
- Matoso, V, Bargi-Souza, P; Ivanski, F, Romano, MA; Romano, RM (2019) Acrylamide: A Review about Its Toxic Effects in the Light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD). *Concept Food Chem* **283**, 422–430. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.054
- Meilgaard, M, Civille, GV, Carr, BT (2006) „Sensory Evaluation Techniques“, 4. izd., CRC Press, Florida.
- Mesias M, Morales FJ (2016) Acrylamide in Bakery Products U: Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects, 1. izd,( Gökmen V, ur.) 131–157. doi: 10.3390/ijerph18084332
- Monteau, J-Y, Purlis, E, Besbes, E, Jury, V, Le-Bail, A (2017) Water transfer in bread during staling: Physical phenomena and modelling. *J Food Eng* **211**, 95–103. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.04.016



Mottram, DS, Wedzicha, BL, Dodson, AT (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **419**, 448–449. doi: 10.1038/419448a

Nigović B (2014) Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) U: Analitika lijekova 2, Zagreb.

Novotni, D (2011) Prehrambena vrijednost i kinetika starenja kruhova proizvedenih bakeoff tehnologijom uz dodatak kiselog tijesta, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Nursten H (2005) The Chemistry of Nonenzymic Browning U: The Maillard Reaction Royal Society of Chemistry, UK.

Pasqualone, A, Piergiovanni, AR, Caponio, F, Paradiso, VM, Summo, C, Simeone, R (2011) Evaluation of the Technological Characteristics and Bread-Making Quality of Alternative Wheat Cereals in Comparison with Common and Durum Wheat. *Food Sci Technol Int* **17(2)**, 135–142. doi: 10.1177/1082013210381547

Pedreschi, F, León, J, Mery, D, Moyano, P (2006) Development of a computer vision system to measure the color of potato chips. *Food Res Int* **39(10)**, 1092–1098. doi: 10.1016/j.foodres.2006.03.009

Pétel, C, Onno, B, Prost, C (2017) Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends Food Sci Technol* **59**, 105–123. doi: 10.1016/j.tifs.2016.10.015

Pravilnik o žitaricama i proizvodima od žitarica (2016) *Narodne novine* **81**, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016\\_09\\_81\\_1823.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016_09_81_1823.html) Pristupljeno 15. lipnja 2021.

Raffan, S, Halford, NG (2019) Acrylamide in food: Progress in and prospects for genetic and agronomic solutions. *Ann Appl Biol* **175**, 259–281. doi: 10.1111/aab.12536

Raffo A, Pasqualone A, Sinesio F, Paoletti F, Quaglia G, Simeone R (2003) Influence of durum wheat cultivar on the sensory profile and staling rate of Altamura bread. *Eur Food Res Technol* **218**, 4955. doi: 10.1007/s00217-003-0793-1

Randelović, D (2009) Boja prehrambenih proizvoda <https://www.tehnologijahranecom/wp-content/uploads/2009/05/cielab-obojeni-prostorjppg>. Pristupljeno 8. lipnja 2021.

- Rydberg, P, Eriksson, S, Tareke, E, Karlsson, P, Ehrenberg, L, Törnqvist, M (2005) Factors that influence the acrylamide content of heated foods. *Adv Exp Med Biol* **561**, 317-328. doi: 10.1007/0-387-24980-X\_1
- Sato, Y (2019) Rheological properties of toasted bread using a modified American Association of Cereal Chemists method to determine compressive force values. *Cereal Chem* **96**, 1060–1067. doi: 10.1002/cche.10212
- Schieberle, P, Köhler, P, Granvogl, M (2005) New aspects on the formation and analyses of acrylamide. *Adv Exp Med Biol* **561**, 191-203. doi: 10.1080/02652030801958905
- Schiraldi, A, Piazza, L, Riva, M (1996) Bread staling: A calorimetric approach. *Cereal Chem* **73**, 32–39.
- Seeger C, Griesmacher A (2007) Some important aspects of implementing tandem mass spectrometry in a routine clinical laboratory environment. *Biochem Medica*, **17**, 29-51. doi: 10.11613/BM.2007.004
- Serna-Saldivar, SO (2010) *Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes* CRC Press
- SNFA (2002) Acrylamide in heated-processed foods SNFA - Swedish National Food Agency, Uppsala, <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/110264802762225273>. Pristupljeno 20. srpnja 2021.
- Smith, CJ, Perfetti, TA, Rumble, MA, Rodgman, A, Doolittle, DJ (2000) „IARC group 2A carcinogenes“ reported in cigarette maineam smoke. *Food Chem Toxicol* **38**, 481-608. doi: 10.1016/S0278-6915(99)00156-8
- Soman, A, Qiu, Y, Chan Li, Q (2008) HPLC-UV Method Development and Validation for the Determination of Low Level Formaldehyde in a Drug Substance. *J Chromatogr Sci*, **46(6)**, 461–465. doi: 10.1093/chromsci/46.6.461
- Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA i sur. (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* **419(6906)**, 449–450. doi: 10.1038/419449a
- Stadler RH, Studer A (2016) *Acrylamide Formation Mechanisms U: Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, 1. izd., Gökmen V, ur., 1–17.

Statista (2014) Frequency of eating toasted bread for breakfast among consumers in Canada from 2002 to 2012 [online] <https://wwwstatistacom/statistics/441688/frequency-of-eating-toast-for-breakfast-canada/> Pristupljeno 26. rujna 2021.

Statista (2019) Average bread and bakery consumption volume per capita in Europe from 2010 to 2023, by category (in kilograms) [online] <https://wwwstatistacom/statistics/806333/europe-bread-and-bakery-production-volume-by-category/> Pristupljeno: 31. svibnja 2021.

Surdyk N, Rosén J, Andersson R, Åman, P (2004) Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *J Agric Food Chem* **52(7)**, 2047–2051. doi: 10.1021/jf034999w

Šarkanj, B, Kipčić, D, Rački-Vasić, Đ, Delaš, F, Galić, K, Katalenić, M i sur. (2010) Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Osijek, Hrvatska agencija za hranu (HAH), 115-119.

Tareke, E, Rydberg, P, Karlsson, P, Eriksson, S, Törnqvist, M (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* **50**, 4998-5006. doi: 10.1021/jf020302f

Taeymans, D, Wood, J, Ashby, P, Blank, I, Studer, A, Stadler, RH i sur. (2004) A review of acrylamide: An industry perspective of research, analyses, formation, and control. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**, 323-347. doi: 10.1080/10408690490478082

Uredba (EU) 2017/2158 Europske komisije od 20. studenog 2017. o uspostavi mjera za ublažavanje učinaka i razina referentnih vrijednosti radi smanjenja prisutnosti akrilamida u hrani, Službeni list Europske unije, L304/24

Vanin FM, Lucas T, Tryam G (2009) Crust formation and its role during bread baking. *Trends Food Sci Technol* **20**, 333–343. doi: 10.1016/j.tifs.2009.04.001

Wedzicha, BL, Mottram, DS, Elmore, JS, Koutsidis, G, Dodson, AT (2005) Kinetic models as a route to control acrylamide formation in food. *Adv Exp Med Biol* **561**, 235-253. doi: 10.1007/0-387-24980-X\_18

WHO (2012): Guideline: Sodium intake for adults and children WHO - World Health Organisation, Ženeva, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241504836> Pristupljeno 22. svibnja 2021.

Xu, Y, Cui, B, Ran, R, Liu, Y, Chen, L, Kai, G, Shi, J (2014) Risk assesment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food Chem Toxicol* **69**, 1-12. doi: 10.1016/j.fct.2014.03.037

Zamani, E, Shokrzade, M, Fallah, M, Shaki, F (2017) A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Int J Pharm Biomed Res* **3** 1-7. doi: 10.18869/acadpub.pbr.3.1.1

Zenz, R (2005) <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/35/Toast-3.jpg> .Pristupljeno 28. kolovoza 2021.

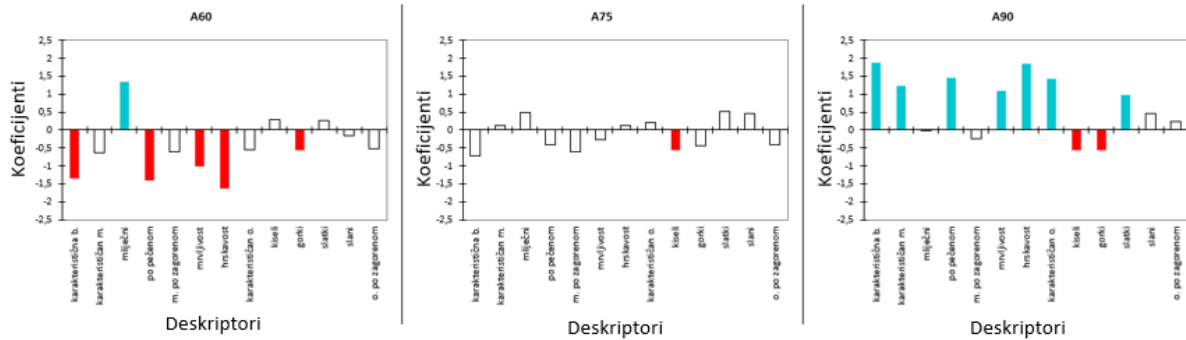
Zhang, Y, Zhang, Y (2007) Formation and Reduction of Acrylamide in Maillard Reaction: A Review Based on Current State of Knowledge. *Crit Rev Food Sci Nutr* **47** (5), 521-542. doi: 10.1080/10408390600920070

Zyzak, DV, Sanders RA, Stojanovik, M, Tallmadge, DH, Eberhart, BL, Ewald, DK i sur. (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem* **51**(16), 4782–4787. doi: 10.1021/jf034180i

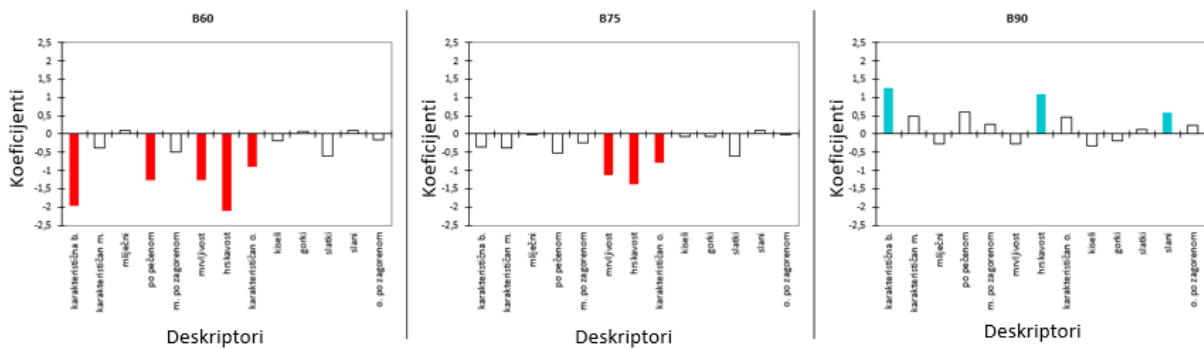


## Prilog 2. Rezultati deskriptivne senzorske analize tostiranih uzoraka

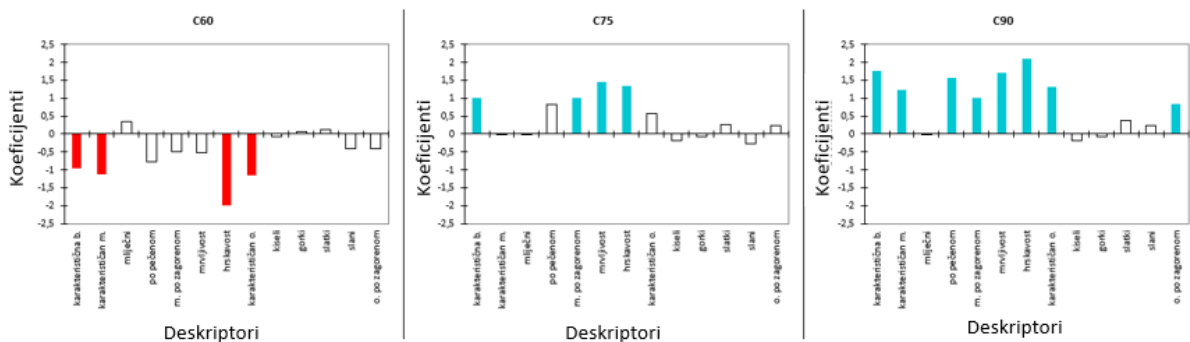
### A) Rezultati uzoraka A60, A75 i A90



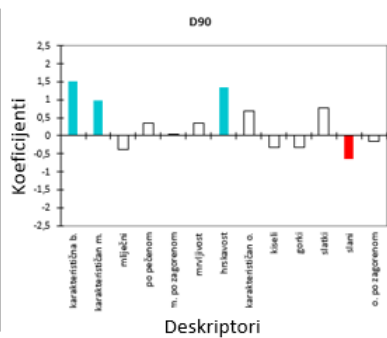
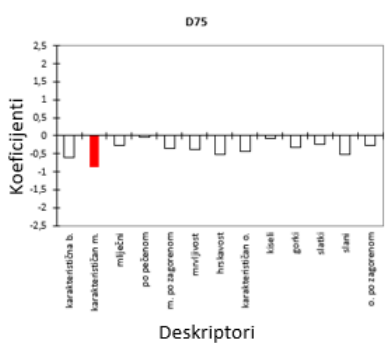
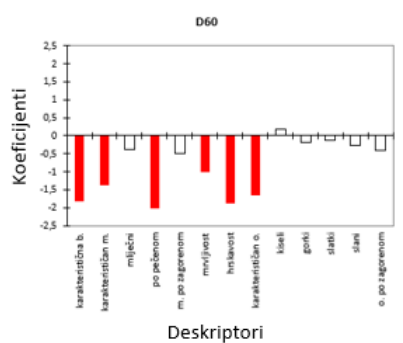
### B) Rezultati uzoraka B60, B75 i B90



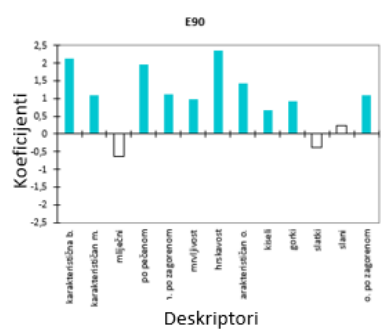
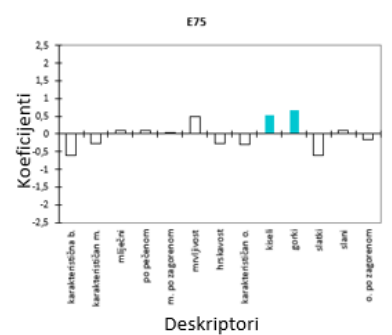
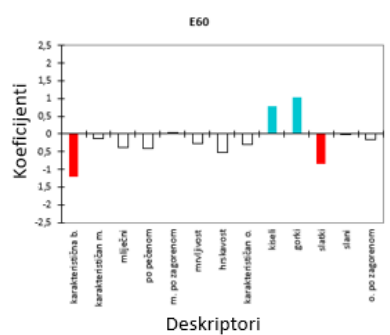
### C) Rezultati uzoraka C60, C75 i C90



## D) Rezultati uzoraka D60, D75 i D90



## E) Rezultati uzoraka E60, E75 i E90



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Ana Stanković, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis