

# Primjena inovativnih procesnih tehnika radi smanjenja nastanka akrilamida u prženim proizvodima

---

**Mandić Andačić, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2019**

*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:159:867656>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-24**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ivana Mandić Andačić

**PRIMJENA INOVATIVNIH PROCESNIH  
TEHNIKA RADI SMANJENJA NASTANKA  
AKRILAMIDA U PRŽENIM PROIZVODIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof.dr.sc. Suzana Rimac Brnčić

Zagreb, 2019



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Ivana Mandić Andačić

**APPLICATION OF INOVATIVE  
PROCESSING TECHNIQUES WITH THE  
AIM OF REDUCING FORMATION OF  
ACRYLAMIDE IN FRIED PRODUCTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Suzana Rimac Brnčić, Full Professor

Zagreb, 2019

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Disertacija

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Prehrambeno inženjerstvo

UDK: 543.544.5:633.491:641.522.2:661.717.53(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Primjena inovativnih procesnih tehnika radi smanjenja nastanka akrilamida u prženim proizvodima**

**Ivana Mandić Andačić, dip. ing. preh. tehn.**

**Rad je izrađen u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar i Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu**

**Mentor:** Dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, red. prof.

**Sažetak:** Obzirom na prisustvo akrilamida u različitim kategorijama prženih proizvoda (krumpir, proizvodi od žitarica i kava), kao i na činjenicu da se navedeni proizvodi svakodnevno konzumiraju diljem svijeta, cilj ovog rada bio je primjenom inovativnih procesnih tehnika djelovati na smanjenje nastanka akrilamida u prženim proizvodima, a istovremeno zadržati poželjna senzorska svojstva gotovog proizvoda. Rezultati praćenja razina akrilamida na području Republike Hrvatske, dobiveni analiziranjem 195 uzoraka iz različitih kategorija hrane, metodom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s tandemskom spektrometrijom masa (UPLC-MS/MS), pokazali su kako su najveći udjeli akrilamida određeni u prženim proizvodima od krumpira. Obzirom na dobivene rezultate, u ovom radu ispitan je utjecaj inovativnih procesnih tehnika na pet različitih sorti krumpira s ciljem smanjenja nastanka akrilamida u prženim krumpirima. Ovisno prvenstveno o sorti, a nakon toga i o primijenjenim načinima toplinske obrade, postignuta su značajna smanjenja udjela nastalog akrilamida.

**Broj stranica:174**

**Broj slika: 56**

**Broj tablica: 35**

**Broj literaturnih navoda: 231**

**Broj priloga:**

**Jezik izvornika: Hrvatski**

**Ključne riječi:** akrilamid, prženje, blanširanje, krumpir, UPLC-MS/MS, praćenje

**Datum obrane:** 22.03.2019.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr.sc. Damir Ježek, red. prof.
2. Dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić, red. prof.
3. Dr.sc. Dubravka Vitali Čepo, izv. prof.

**Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.**

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb**

**Ph.D. thesis**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Postgraduate study in Food engineering**

**UDK: 543.544.5:633.491:641.522.2:661.717.53(043.3)**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**

**Scientific Field: Food Technology**

**Application of inovative processing techniques with the aim of reducing formation of acrylamide in fried products**

**Ivana Mandić Andačić, B. Sc. Food Technology**

**Thesis performed at the Teaching institute of public health dr. Andrija Stampar and Faculty of Food technology and biotechnology University of Zagreb**

**Supervisor:** PhD Suzana Rimac Brnčić, Full Proffesor

**Abstract:** Due to the presence of acrylamide in different categories of fried products (potatoes, cereal products and coffee), as well as the fact that these products are consumed on a daily basis all over the world, the aim of this study was to reduce formation of acrylamide in fried products by using inovative processing techniques, and at the same time retain desirable sensory properties of finished product. Results of the acrylamide levels monitoring in the Republic of Croatia, obtained by analyzing 195 samples from different food categories, using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (UPLC-MS/MS), showed that the highest levels of acrylamide were found in fried potato products. Therefore, the influence of innovative processing techniques at five different potato varieties have been studied with the aim of reducing formation of acrylamide in fried potatoes. Depending primarily on potato variety, and subsequently on the applied heat treatment significant reduction in the acrylamide levels were achieved.

**Number of pages:174**

**Number of figures: 56**

**Number of tables: 35**

**Number of references: 231**

**Number of appendixes:**

**Original in:** Croatian

**Key words:** acrylamide, frying, blanching, UPLC-MS/MS, monitoring

**Date of thesis defense:** 22.03.2019.

**Reviewers:**

1. PhD Damir Ježek, Full Proffesor
2. PhD Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full Proffesor
3. PhD Dubravka Vitali Čepo, Associate Proffesor

**Thesis deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and at the University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu održanoj dana 14.06.2018., a odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj 24.09.2018.

## ŽIVOTOPIS MENTORA DOKTORSKOG RADA

Prof.dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Suzana Rimac Brnčić diplomirala je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1995. godine. Od 1995 - 1997 radi kao viši tehnički suradnik u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 1997. godine je znanstvena novakinja. Magistarski rad obranila je je 29.ožujka 2001.g. Doktorski rad obranila je 06.listopada 2006. godine. U zvanje redovite profesorice izabrana je 2017. Godine. Trenutno je pročelnica Kabineta za procese pripreme hrane.

Prof. dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, do sada je sudjelovala u izvedbi nastave (vježbe, seminari, predavanja) na kolegijima Procesi pripreme hrane, Fizikalna svojstva složenih sustava-hrane, Prehrambeno-procesno inženjerstvo 1, Prehrambeno-procesno inženjerstvo 2, Procesi konzerviranja prehrambenih proizvoda i Nova hrana.

U razdoblju od 2007-2011. godine dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, bila je članica Odbora za osiguranje i praćenje kvalitete nastave, od 2011 –2015. godine članica je Povjerenstva za studentske radove, a od 2015. Godine je predsjednica Odbora za diplomske i završne radove.

Kao suradnica sudjelovala je u realizaciji u više nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekata (Razvoj prehrambenih proizvoda više biološke vrijednosti; Razvoj novih funkcionalnih proizvoda i njihova stabilnost; Nove tehnike procesiranja u proizvodnji funkcionalne hrane; Održivi razvoj inovacije u hrani-valorizacija otpada masline), a od 2012. godine i međunarodnih projekata (Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process; The Network for the Biology of Zinc; Interindividual variation in response to consumption of plant food bioactives and determinants involved; Risk Assessment of mixture of contaminants present in food).

Rezultati znanstveno-istraživačkog rada prof. dr. sc. Suzane Rimac Brnčić objavljeni su u stranim i domaćim znanstvenim časopisima te zbornicima radova s međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Objavila je ukupno 47 znanstvenih radova, od kojih je 26 znanstvenih radova klasificirano u a1 skupini, jedanaest radova je klasificirano u a2 skupini te deset radova iz skupine a3. Objavljeni znanstveni radovi citirani su ukupno 506 puta- h- indeks 10 (ISI Web of Science). Njen znanstveno-istraživački rad obuhvaća prehrambeno inženjerstvo, a područje njezina rada je usmjereno na ispitivanja vezana uz nove tehnike procesiranja u proizvodnji funkcionalne hrane, primjenu novih tehnika obrade različitih prehrambenih praškastih materijala (koncentrati i izolati proteina sirutke, škrobovi, pektini), te njihov utjecaj na fizikalno - kemijske i funkcionalne značajke tih materijala (topljivost, emulgiranje, pjenjenje, raspodjela veličina čestica, boja, stupanj kristaliničnosti, in vitro probavljivost). Također je ispitala utjecaj novijih postupaka obrade (tribomehanička mikronizacija, ultrazvuk, visoki tlakovi, enzimska hidroliza) i dodatka različitih hidrokoloida na poboljšanje reoloških i termofizičkih svojstava proteina sirutke te se bavila određivanjem teksturalnih svojstava ekstrudiranih proizvoda obogaćenih proteinima sirutke. U zadnje vrijeme područje njenog znanstvenog rada obuhvaća i valorizaciju otpada masline te rajčice. Rezultate svojih istraživanja prezentirala je na 45 međunarodnih i sedam domaćih znanstvenih skupova. Pod njenim mentorstvom izrađeno je 16 diplomskih i 14 završnih radova te studentski istraživački rad nagrađen Dekanovom nagradom. Angažirana je kao recenzent znanstvenih radova u međunarodnim časopisima i zbornicima radova. Sudjelovala je kao plenarni i pozvani predavač na međunarodnim znanstvenim skupovima.

Članica je uređivačkih odbora više znanstveno-stručnih časopisa. Bila je članica znanstvenih i organizacijskih odbora međunarodnih i nacionalnih znanstvenih skupova.

Dobitnica je Državne nagradu za znanost za znanstvene novake 2001. godine. Iste godine dodijeljena joj je i potpora Biotehničke zaklade PBF-a

## ZAHVALE

Najbolje kod dara zahvalnosti je da što smo više zahvalni to ga više primamo. Zbog toga se ja želim zahvaliti brojnim ljudima koji su svaki na svoj način doprinijeli da ova disertacija ugleda svjetlo dana. Prije svega želim se zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na podršci i ljubavi koju mi pružaju, a posebno mom suprugu Alenu i sinu Petru koji su bez obzira na propuštene zajedničke trenutke za vrijeme izrade ove disertacije imali puno strpljenja i ljubavi, i koji daju smisao svemu što radim.

Imala sam privilegiju za vrijeme izrade svog diplomskog rada, a tako i kod izrade doktorske disertacije surađivati sa divnim ljudima sa Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Jedna od njih je svakako i moja mentorica, prof.dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, kojoj se želim zahvaliti na mentorstvu i stručnom vodstvu tijekom izrade doktorske disertacije, a posebno na ljubaznosti i podršci, kao i na nesebičnom dijeljenju znanja i vremena.

Zahvaljujem se i doc.dr.sc. Mariji Badanjak Sabolović na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela disertacije vezanog uz toplinsku obradu uzoraka.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela disertacije vezanog uz NIR spektroskopiju.

Hvala mojim kolegama iz Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar koji su svatko na svoj način doprinijeli izradi ove disertacije. Posebno hvala voditeljici Službe za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju dr.sc. Adeli Krivohlavek na pruženoj podršci u izradi disertacije i mojoj kolegici i prijateljici dr.sc. Ani Tot na velikoj pomoći pri određivanju akrilamida UPLC-MS/MS metodom.

*Ovaj rad posvećujem mom pokojnom ocu  
Jagi. Snaga tvojih posljednjih riječi  
upućenih meni uvijek me gura naprijed.  
Hvala na svemu tata.*



## SAŽETAK

Akrilamid kao potencijalno kancerogeni spoj prisutan u velikom broju prženih proizvoda privlači pažnju znanstvenika zadnjih 15-ak godina. Suradnjom prehrambene industrije i znanstvenika nastao je vodič za smanjenje udjela akrilamida u različitim kategorijama prehrambenih proizvoda. Prema izvješćima Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) udio akrilamida u kategorijama hrane prženi proizvodi od krumpira, proizvodi od žitarica i kava i dalje je visok, te često prelazi referentne vrijednosti propisane Uredbom EC 2017/2158.

Rezultati praćenja razina akrilamida dobiveni u ovom radu analiziranjem 195 uzoraka iz različitih kategorija hrane pokazali su kako je čak 20% uzoraka iz kategorije „proizvodi od krumpira“ imalo vrijednosti akrilamida veće od referentnih vrijednosti. Dosadašnja istraživanja potvrdila su kako udio akrilamida u konačnom proizvodu ovisi o početnoj sirovini, odnosno njenom sastavu, kao i o primijenjenim toplinskim postupcima i uvjetima u kojima se oni provode.

U ovom radu ispitan je utjecaj inovativnih procesnih tehnika (ultrazvučno blanširanje, mikrovalno blanširanje i prženje u struji vrućeg zraka) na smanjenje nastanka akrilamida kod pet različitih sorti krumpira. Primjenom različitih analitičkih metoda kao što su tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti s tandemskom spektrometrijom masa (eng. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS), blisko infracrvena spektroskopija (eng. Near infrared spectroscopy, NIR) i tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. Ultra performance liquid chromatography, HPLC) određeni su učinci različitih inovativnih procesa pripreme hrane i kemijskog sastava sirovina na udio akrilamida u prženim proizvodima od krumpira. Senzorska svojstva prženih proizvoda ispitana su određivanjem boje i teksture prženih proizvoda.

Dobiveni rezultati pokazali su kako je primjena inovativnih procesnih tehnika rezultirala smanjenjem nastanka akrilamida u prženim krumpirima, ovisno o sorti i načinu toplinske obrade od 2 do 94%. Osim što je primjenom inovativnih procesnih tehnika postignuto smanjenje udjela akrilamida dobiveni su i proizvodi poželjnih organoleptičkih svojstava. Primjenom NIR spektroskopije kao alternativne metode za određivanje udjela akrilamida postignuta je dobra korelacija u dobivenim rezultatima.

**Ključne riječi:** akrilamid, prženje, blanširanje, UPLC-MS/MS, NIR, praćenje

## ABSTRACT

Acrylamide as a potentially carcinogenic compound present in a large number of fried products attracts scientist attention over the last 15 years. Collaboration of the food industry and scientists has created a guide focused on reduction of acrylamide levels in different categories of food products. However, according to the European Food Safety Authority (EFSA) reports, acrylamide levels in food categories of fried potato products, cereal and coffee products are still high, and often exceeds the reference values defined in EU Regulation 2017/2158.

The monitoring results obtained in this research by analyzing 195 samples from different food categories showed that 20% of the samples from the category "potato products" had acrylamide values higher than the reference values. Previous research has confirmed that acrylamide levels in the final product depend on the initial raw material, its composition, as well as on the applied heat treatments and the conditions under which they are carried out.

In this research, the impact of innovative processing techniques (ultrasonic blanching, microwave blanching and hot air spraying) was applied to reduce the formation of acrylamide in 5 different potato varieties. Using different analytical methods like ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), near infrared spectroscopy (NIR) and high performance liquid chromatography (HPLC), the effects of these innovative food preparation processes and the chemical composition of raw materials on the acrylamide level in fried potato products were determined. Sensory properties of fried products were tested by measuring the color and texture parameters of fried products.

Obtained results have shown that the application of innovative processing techniques resulted in a reduction of acrylamide formation in fried potatoes from 2 to 94%, depending on the potato variety and applied heat treatment. By using innovative processing techniques finished products with low content of acrylamide and desirable sensory characteristic were obtained. Using NIR spectroscopy as an alternative method for determining the acrylamide content, good correlation was achieved in the obtained results.

**Key words:** acrylamide, frying, blanching, UPLC-MS/MS, NIR, monitoring

## PROŠIRENI (STRUKTURIRANI) SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

### Uvod:

Od 2002. godine, pronalaskom akrilamida u hrani brojna istraživanja usmjerena su na otkrivanje mehanizama nastanka akrilamida, utvrđivanje glavnih izvora i štetnih učinaka na zdravlje, kao i na smanjenje udjela akrilamida u kategorijama hrane za koje je utvrđeno da sadrži visoke udjele akrilamida.

Visoke temperature ( $>120$  °C), niska vlažnost i prisustvo prekursora akrilamida (aminokiselina asparagin, reducirajući šećeri), potrebni su za razvoj Maillardovih reakcija i njegov nastanak. Prisutnost akrilamida utvrđena je u različitim kategorijama prehrambenih proizvoda koji se svakodnevno konzumiraju diljem svijeta, kao što su proizvodi od krumpira, proizvodi na bazi žitarica i kava.

Brojne mjere usmjerene na smanjenje udjela akrilamida sažete su u „Paketu mjera“ sastavljenom od strane organizacije Food Drink Europe, koja predstavlja prehrambenu industriju i znanstvenike. Dosadašnja istraživanja ukazala su na nužnost da strategija za smanjenje udjela akrilamida i postizanje kvalitete gotovog proizvoda jest u kombiniranju različitih metoda i tehnika pripreme i proizvodnje. Učinkovitost smanjenja udjela akrilamida također je ovisna o optimiranom postupku za određeni proizvod.

Obzirom na visoki udio akrilamida prisutan u gore navedenim kategorijama hrane, kao i na njegovu potencijalnu kancerogenost, cilj ovog rada bio je pronaći adekvatne mjere za smanjenje nastanka akrilamida u kategorijama hrane za koje je poznato da sadrže veće udjele akrilamida na području Republike Hrvatske.

U tu svrhu primjenom UPLC-MS/MS metode kao potvrdne analitičke metode, i NIR spektroskopije kao orijentacijske metode, analizirano je 195 uzorka iz različitih kategorija hrane. Dobiveni rezultati pokazali su kako je najveći broj uzoraka koji prelazi referentne vrijednosti iz kategorije proizvodi od krumpira.

Na temelju rezultata monitoringa odlučeno je da će se primjenom inovativnih procesnih tehnika (ultrazvučno blanširanje, mikrovalno blanširanje, prženje u struji vrućeg zraka) pokušati djelovati na smanjenje prekursora u početnoj sirovini, a time i na udio akrilamida u prženim krumpirima, uz istovremeno zadržavanje poželjnih senzorskih svojstava proizvoda. U tu svrhu odabrano je 5 različitih sorti krumpira (Artemis, Sante, Spunta, Blue salad i Soraya).

## Materijali i metode:

Za preliminarna istraživanja, na temelju kojih je odlučeno u kojim kategorijama prehrambenih proizvoda će se ispitati utjecaj inovativnih procesnih tehnika, korišteni su uzorci u sklopu praćenja udjela akrilamida na području Republike Hrvatske. Od ukupno 195 analiziranih uzoraka, njih 45 bilo je iz kategorije proizvodi od krumpira, 30 uzoraka bilo je iz kategorije kruh, peciva i hruskavi kruh, 96 uzoraka bilo je iz kategorije vafli, grickalice i krekeri, 10 uzorka iz kategorije žitarice za doručak i 6 uzoraka iz kategorije proizvodi za djecu na bazi žitarica.

Uzorci su analizirani primjenom UPLC-MS/MS metode i NIR spektroskopije. Za uzorke pripremane za određivanje udjela akrilamida UPLC-MS/MS metodom, korištena je QuEChERS metoda, koja se bazira na ekstrakciji s vodom i razdjeljivanju s acetonitrilom koji sadrži soli  $MgSO_4$  i  $NaCl$ . Za kvantitativno određivanje udjela akrilamida primjenom UPLC-MS/MS metode korištena je pozitivna ionizacija elektro-raspršenjem (eng. Electro spray ionization, ESI) uz praćenje odabranih reakcija (eng. Single ion monitoring, SRM). Praćene su slijedeće tranzicije iona:  $m/z$  72,1→55,1;  $m/z$  72,1→44,1 i  $m/z$  72,1→27,1 za akrilamid, a tranzicija  $m/z$  75,1→58 za  $^{13}C_3$ -akrilamid. Za izražavanje rezultata korištena je metoda unutarnjeg standarda, a kao unutarnji standard korišten je izotopno obilježeni akrilamid ( $AA^{13}C_3$ ). Rezultati su kvantificirani usporedbom omjera površine pika akrilamida i unutarnjeg standarda u uzorku s omjerom površine pika akrilamida i unutarnjeg standarda u uzorku s dodanim standardom, i praćenjem odabranih tranzicija iona prekursora do iona produkta.

Kao alternativna metoda korištena je NIR spektroskopija, koja za razliku od UPLC-MS/MS metode ne zahtjeva prethodnu pripremu uzoraka. Raspon NIR instrumenta korištenog u ovom istraživanju bio je od 904 nm do 1699 nm. Snimljena su tri spektra za svaki uzorak, a za daljnju obradu koristio se prosjek spektara. Obrada podataka uključivala je traženje različitosti u spektrima uzrokovanih vibracijama C-H, O-H i /ili N-H kemijskih veza za svaki pojedini uzorak.

Za analizu različitosti i grupiranje prema njima korišten je programa XLSTAT. Iz skupa multivarijantnih analiza izdvaja se metoda analize glavnih komponenata koja omogućava grupiranje prema sličnostima i razdvajanje zbog različitosti.

Obzirom da su rezultati uzoraka analizirani u sklopu monitoringa pokazali da je u kategoriji hrane „proizvodi od krumpira“ najveći udio uzoraka bio iznad referentnih

vrijednosti, odabrano je 5 različitih sorti krumpira na kojima su se ispitali utjecaji inovativnih procesnih tehnika na smanjenje udjela akrilamida.

Od 5 odabranih sorti krumpira, 4 sorte krumpira bile su deklarirane za prženje (Sante, Artemis, Spunta i Blue salad) a jedna (Soraya) za kuhanje. U svim sortama određivan je udio suhe tvari, slobodne aminokiseline asparagin i šećera.

Udio suhe tvari određivan je gravimetrijski, sušenjem 2,5 g uzorka pri 105 °C, do konstantne mase.

Udio slobodne aminokiseline asparagin i šećera određivan je primjenom HPLC metoda uz različite načine detekcije. Šećeri su određeni HPLC metodom uz detektor indeksa loma (eng. Refractive indeks detector, RI). Uzorci su prethodno ekstrahirani uz pomoć acetonitrila, a nakon homogenizacije i filtriranja preko membranskih filtera analizirani su na HPLC-u. Za kromatografsko razdvajanje korištena je kolona Asahipak NH<sub>2</sub>P-504E. Kao mobilna faza korištena je otopina ACN:H<sub>2</sub>O u omjeru V/V=75:25. Kvantifikacija analita provedena je usporedbom površine pika analita u uzorku s površinom pika u standardu, uzimajući u obzir odvagu uzorka i volumen otapala.

Slobodna aminokiselina asparagin određena je primjenom HPLC metode uz fluorescencijski detektor (eng. Fluorescence detector, FLD), pri valnoj duljini od 240 nm i valnoj duljini emisije od 450 nm. Priprema uzoraka uključivala je ekstrakciju uzoraka na ultrazvučnoj kupelji uz 0,1 M HCl. Analiti su razdvojeni na koloni Zorbax Eclipse-AAA, a prije toga su derivatizirani smjesom 3-merkaptopropionske kiseline i ftaldehida. Kvantifikacija slobodne aminokiseline asparagin provedena je usporedbom površine pika analita u uzorku s površinom pika analita u standardu, uzimajući u obzir odvagu uzorka i volumen ekstrakta.

Uzorci odabranih sorti krumpira neposredno prije provođenja toplinske obrade su oprani, oguljeni i narezani ručnom rezalicom za krumpir. Veličina narezanih štapića krumpira bila je 90x6x6 mm. Za potrebe toplinske obrade uvijek je vagana ista količina narezanih štapića krumpira (200g). Toplinska obrada uzorka uključivala je predtretman blanširanja i to:

1. Blanširanje u vrućoj vodi (85 °C/5 min, sa i bez dodataka 0,3% CaCl<sub>2</sub>)
2. Blanširanje mikrovalovima (80 °C/4 min, sa i bez dodataka 0,3% CaCl<sub>2</sub>)
3. Ultrazvučno blanširanje (75 °C/4 min, sa i bez dodataka 0,3% CaCl<sub>2</sub>)

i prženje krumpira koji su bili podvrgnuti gore navedenim postupcima blanširanja i to:

1. Prženje u palminom ulju (5 min, 180 °C)
2. Prženje u struji vrućeg zraka uz dodatak 3 g ulja (21 min, 180 °C)

U tako pripremljenim uzorcima određivan je udio akrilamida primjenom UPLC-MS-MS i NIR metode prema prethodno opisanim postupcima. Dobiveni rezultati uspoređivani su s vrijednostima udjela akrilamida u kontrolnom uzorku. Kao kontrolni uzorak korišten je uzorak krumpira odgovarajuće sorte pržen u ulju bez prethodne predobrade uzorka.

Kako bi se ispitala senzorska svojstva gotovih proizvoda u toplinski obrađenim uzorcima određivana je boja i tekstura. Kolorimetrijsko određivanje boje određeno je pomoću kolorimetra, a dobiveni podaci obrađeni su pomoću Spectra Magic NX Softwarea po CIELAB sustavu boja.

Mjerenje boje prženih proizvoda provedeno je odmah nakon završenog procesa prženja. Boja je mjerena direktno na površini krumpira, i to za svaki provedeni proces prženja i toplinske predobrade uzorka parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) određeni su na 7 uzoraka, te je izračunata srednja vrijednost. Na temelju izmjerenih  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti izračunate su promjene navedenih parametara boje kod uzorka krumpira pripremljenih različitim načinima toplinske obrade u odnosu na kontrolni uzorak. Napravljena je i analiza glavnih komponenti parametara boje za sve sorte krumpira.

Kako bi se ispitala potencijalna povezanost parametara boje prženog krumpira i udjela akrilamida u njemu, provedena je regresijska analiza.

Mjerenje teksturalnih svojstava prženih krumpira određeno je pomoću analizatora teksture, prema metodi Heredia i sur. (2014). Mjerenja su provedena sondom promjera 2 mm i silaznom brzinom sonde  $1 \text{ mms}^{-1}$ , i to odmah nakon prženja i uklanjanja suviška masnoće. Koristeći TE 32 Texture Exponent određena je maksimalna sila ( $F_{\text{max}}$ ) izražena u N. Za svaki tretman prženja krumpira provedeno je mjerenje na 7 nasumično odabranih uzoraka krumpira te je izračunata srednja vrijednost.

Multivarijatna analiza eksperimentalnih podataka dobivenih NIR spektroskopijom i LC-MS metodom određivanja udjela akrilamida provedena je korištenjem XLSTAT statističkog računalnog programa (verzija 2018.5, Addinsoft) za MS Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i programa Unscrambler X (verzija 10.4, CAMO Software AS., Oslo, Norway).

## Rezultati:

Od ukupno 195 uzoraka analiziranih u sklopu monitoringa, u kategoriji „proizvodi od krumpira“ u čak 20% uzoraka određeni udio akrilamida bio je iznad referentne vrijednosti. Vrijednosti akrilamida određene u toj istoj kategoriji, primjenom UPLC-MS/MS metode bile su ujedno i najviše u usporedbi s vrijednostima dobivenim u ostalim analiziranim kategorijama. Dobivene vrijednosti kretale su se od 152 do 4353  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za uzorke čipsa i od 127 do 1680  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za uzorke pomfrita. Rezultati dobiveni primjenom NIR-a pokazali su dobru korelaciju s rezultatima dobivenim primjenom UPLC-MS/MS metode.

Među sortama krumpira korištenim za ispitivanje utjecaja različitih inovativnih procesnih tehnika na smanjenje nastanka akrilamida vidljive su razlike u pogledu udjela suhe tvari, slobodne aminokiseline asparagin i šećera. Najniži udio šećera određen je u sorti Sante, ukupno 4,7  $\text{g kg}^{-1}$ , a očekivano najviši u sorti Soraya namijenjenoj za kuhanje, ukupno 11,2  $\text{g kg}^{-1}$ . Udio suhe tvari kretao se od 16,99  $\text{g kg}^{-1}$  za sortu Blue salad do 24,52  $\text{g kg}^{-1}$  za sortu Sante, a udio asparagina od 0,0404  $\text{g kg}^{-1}$  za sortu Artemis do 0,0751  $\text{g kg}^{-1}$  za sortu Spunta.

Iz dobivenih rezultata vidljiv je utjecaj sorte na kemijski sastav gomolja krumpira. Utjecaj sorte evidentan je i kod udjela akrilamida nastalog u toplinski obrađenim uzorcima. Uzorci sorte Spunta i Sante neovisno o primijenjenom toplinskom tretmanu imali su najniže udjele akrilamida. Najmanji udio akrilamida kod uzoraka prženih u ulju bez prethodne predobrade određen je u sorti Sante (470  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najveći u sorti Soraya (1482  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Smanjenje udjela akrilamida postignuto je u svim sortama krumpira i za većinu primijenjenih postupaka. Kod uzoraka krumpira sorte Artemis postignuta smanjenja udjela akrilamida kretala su se od 21% za uzorke blanširane u vrućoj vodi i pržene u ulju pa do 68% za uzorke blanširane primjenom mikrovalova i pržene u struji vrućeg zraka. Za uzorke krumpira sorte Blue salad dobivena smanjenja udjela akrilamida kretala su se od 2% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka i pržene u ulju do 82% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u struji vrućeg zraka. Kod uzoraka krumpira sorte Soraya dobivena smanjenja kretala su se od 12% za uzorke blanširane primjenom mikrovalova i pržene u ulju pa do 92% za uzorke blanširane primjenom mikrovalova uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u ulju. Za uzorke krumpira sorte Sante dobivena smanjenja kretala su se od 2,2% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u struji vrućeg zraka pa do 94% za uzorke blanširane u vrućoj vodi uz dodatak  $\text{CaCl}_2$  i pržene u struji vrućeg zraka, a kod uzoraka krumpira sorte Spunta smanjenja udjela akrilamida kretala su se od 8% za uzorke

blanširane u primjenom mikrovalova i pržene u struji vrućeg zraka pa do 81% za uzorke blanširane u vrućoj vodi i pržene u ulju.

Što se tiče povezanosti postignutog smanjenja udjela akrilamida i boje prženih proizvoda, iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je boja uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bila ujednačenija u odnosu na iste uzorke pržene u ulju, a i udio akrilamida u tim uzorcima je bio niži u odnosu na iste pržene u ulju.

Izrada regresijskog modela izrađenog na temelju vrijednosti dobivenih parametara boje i udjela akrilamida pokazala se uspješnom za predviđanje udjela akrilamida u različitim sortama krumpira.

Mjerenjem teksturalnih svojstava prženih proizvoda vidljivo je kako su proizvodi prženi u struji vrućeg zraka u pravilu čvršći i elastičniji u odnosu na iste pržene u ulju, kao i u odnosu na kontrolni uzorak.

### **Zaključak:**

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako je primjenom inovativnih procesnih tehnika moguće dobiti prženi krumpir s niskim udjelom akrilamida, a istovremeno zadržati poželjna senzorska svojstva proizvoda. To je posebno vidljivo kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka. Primjena NIR spektroskopije kao jednostavnije, brže i ekonomski isplativije orijentacijske metode pokazala se dobrom opcijom u svrhu određivanja udjela akrilamida ispod ili iznad referentne vrijednosti



## PROŠIRENI (STRUKTURIRANI) SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

### **Introduction:**

After the discovery of acrylamide in food in 2002, numerous researches were focused on detecting mechanisms of acrylamide formation, identification of major sources and adverse health effects, as well as on reducing acrylamide levels in food categories that have been found to contain high levels of acrylamide.

High temperatures ( $> 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), low humidity and presence of acrylamide precursors (amino acid asparagine, reducing sugars) are necessary for the development of Maillard's reactions and acrylamide formation. The presence of acrylamide has been identified in various food products that are daily consumed all over the world. Some of them are potato products, cereal products and coffee.

Numerous measures, directed on reducing acrylamide levels are summarized in the Toolbox made by the organization „Food Drink Europe“, representing the food industry and scientists. Previous researchs have shown that the strategy for reducing acrylamide levels and achieving a good quality of finished product is to combine different methods and techniques of preparation and production. The efficiency of reducing acrylamide levels is also related on the optimized process for a particular product.

Due to the high levels of acrylamide present in the above mentioned food categories, as well as its potential carcinogenicity, the aim of this research was to find appropriate measures for reducing acrylamide levels to be as low as possible, primary in food categories known to contain higher levels of acrylamide in the Republic of Croatia.

For this purpose, UPLC-MS/MS method as a confirmation method, and NIR spectroscopy method as a orientation method, were used for analysis of 195 samples from different food categories. Obtained results have shown that the largest number of samples exceeding reference values were from the potato category.

Based on the results of the monitoring, reduction of the precursors in the raw material and thus the levels of acrylamide in the fried potatoes, with retention of the desired sensory product properties would try to achieve by using innovative processing techniques (ultrasonic blanching, microwave blanching, hot air spraying). For this purpose 5 different varieties (Artemis, Sante, Spunta, Blue Salad and Soraya) were selected.

## Materials and methods:

Samples within the monitoring of acrylamide levels in the Republic of Croatia were used for preliminary studies. Out of a total of 195 analyzed samples, 45 of them were from potato product category, 30 samples were from bread category, rolls and bread crumbs, 96 samples of wafers, snacks and crackers, 10 samples from breakfast cereal category and 6 samples were from the category products for children on a cereal basis.

Samples were analyzed using UPLC-MS/MS and NIR method. QuEChERS method based on water extraction and acetonitrile partition containing MgSO<sub>4</sub> and NaCl salts was used for preparation of samples analysed by UPLC-MS/MS method. For quantitative determination of acrylamide, UPLC-MS/MS method with positive electrospray ionisation (ESI) and SRM mode was used. The transition  $m/z$  72.1 → 55.1;  $m/z$  72.1 → 44.1 and  $m/z$  72.1 → 27.1 were monitored for acrylamide and transition  $m/z$  75.1 → 58 for <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-acrylamide, respectively. For quantitative expression of the results the internal standard method was used, and as an internal standard isotope-labeled acrylamide (AA 1,2,3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>) was used. The results were quantified by comparing the area ratio of acrylamide peak and internal standard peak in the sample to the area ratio of the acrylamide peak and the internal standard peak in the sample with added standard, and by monitoring selected transitions of the ion precursor to the product ion.

As an alternative method, NIR spectroscopy, which does not require previous sample preparation was used. The range of NIR used in this research was from 904 nm to 1699 nm. Each sample spectra was recorded in triplicate, and for the further processing the mean value was calculated. Data processing included searching for diversity in spectra caused by vibrations of C-H, O-H and / or N-H chemical bonds for each sample.

For the analysis of diversity and grouping according to them, the XLSTAT program was used. A multivariate analysis set out the main component that allows grouping by similarities and separation due to differences.

Due to the fact that results obtained from the samples analyzed within the monitoring showed that the highest proportion of samples exceeded reference values were from the food category "potato products", five different potato varieties were selected, and the effects of innovative processing techniques on the reduction of acrylamide formation was determined. From 5 selected potato varieties, four potato varieties (Sante, Artemis, Spunta and Blue salad) were declared for frying and one (Soraya) for cooking. In all varieties, content of dry matter, free amino acid asparagine and sugars were determined.

Dry matter content was determined gravimetrically by drying 2.5 g of sample at 105 °C to constant mass in accordance to the 1980 AOAC method.

The content of free amino acid asparagine and sugars were determined using HPLC methods with different detection model. Sugars were determined using HPLC method with RI detector. Samples were previously extracted with acetonitrile, and after homogenization and filtration through membrane filters analyzed by HPLC. For chromatographic separation Asahipak NH2P-504E column was used. As a mobile phase, a solution of ACN:H<sub>2</sub>O in the V/V ratio = 75: 25 was used. Quantification of the analytes were performed by comparing the surface of the analytes peak in the sample with the surface of the analytes peak in the standard, taking into account the sample size and the volume of the solvent.

The free amino acid asparagine was analysed using HPLC method with FLD detector at a wavelength of 240 nm and at a emission wavelength of 450 nm. Sample preparation included samples extraction at the ultrasonic bath with 0.1 M HCl. The analyte was separated on Zorbax Eclipse-AAA column, and before that it was derivatized with 3-mercaptopropionic acid and phthalamide. Quantification was performed by comparing the surface of the analyte peak in the sample with the surface of the analyte peak in the standard, taking into account sample size and volume of extract.

Samples of selected potato varieties were washed, peeled and sliced with a hand potato peeler just before thermal treatment. The size of sliced potatoes was 90x6x6 mm. The amount of potato sticks used for the thermal treatment was always the same (200 g). Thermal treatment of the sample included pre-treatment of blanching:

1. Blanching in hot water (85 °C/5 min, with or without 0.3% CaCl<sub>2</sub>)
2. Microwave blanching (80 °C/4 min, with or without the addition of 0.3% CaCl<sub>2</sub>)
3. Ultrasonic blanching (75 °C/4 min, with or without the addition of 0.3% CaCl<sub>2</sub>)

and the frying of previously blanched potatoes sticks according the above-mentioned blanching procedures, namely:

1. Frying in palm oil (5 min, 180 °C)
2. Air frying system with addition of 3 g of oil (21 min, 180 °C)

For samples prepared at that way, acrylamide levels was determined using UPLC-MS-MS and NIR method according to the procedures described above. Acrylamide levels obtained for those samples were compared with acrylamide levels obtained for the control sample. As a control sample, a potato sample of appropriate variety, fried in oil without prior pre-treatment was used.

In order to determine sensory properties of finished products, color and texture parameters of heat-treated samples were measured. Measurement of color parameters was determined by a colorimeter, and the obtained data was processed using Spectra Magic NX Software by CIELAB color system.

Color measurement of the fried potato products was carried out immediately after the frying process. The color was measured directly on the potato surface, and color pattern parameters ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) were determined in 7 samples for each performed frying process and the applied heat pre-treatment. Based on the measured  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values, the changes of color parameters were calculated for potato samples prepared by different models of thermal treatment and compared with the control sample.

Measurement of textural properties of fried potatoes was determined by a texture analyzer, according to Heredia et al. (2014). The measurements were carried out with a probe of 2 mm in diameter and a downstream speed of  $1\text{mm s}^{-1}$ , immediately after frying and removing excess fat. Using TE 32 Texture Exponent, the maximum force ( $F_{\text{max}}$ ) was expressed in N. Measurement was performed on 7 randomly selected potato samples for each thermal treatment and the mean values was calculated.

Multivariate analysis of experimental data obtained by NIR spectroscopy and LC-MS acrylamide determination method was performed using the XLSTAT statistical software program (version 2018.5, Addinsoft) for MS Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) and Unscrambler X (version 10.4, CAMO Software AS., Oslo, Norway).

## Results:

Out of a total of 195 samples analyzed within the monitoring, 20% samples in the "potato products" category showed acrylamide levels above reference values. Also, in this food category, results obtained by using UPLC-MS/MS method were also higher compared to results obtained in other analyzed category, ranging from 152 to 4353  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for potato chips and from 127 to 1680  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for french fries. The results obtained using NIR method showed good correlation to the results obtained using UPLC-MS /MS method.

Among potato varieties used to study the influence of various innovative processing techniques on acrylamide formation reduction, there are differences in the content of dry matter, free amino acid asparagine and sugars. The lowest sugar content was determined in the Sante variety, a total of 4.7  $\text{g kg}^{-1}$ , and as it was expected the highest sugar content was determined in the Soraya variety, a total of 11.2  $\text{g kg}^{-1}$ . The content of dry matter ranged from 16.99  $\text{g kg}^{-1}$  for the Blue potatoe variety up to 24.52  $\text{g kg}^{-1}$  for the Sante variety, and the content of free amino acide asparagine ranged from 0.0404  $\text{g kg}^{-1}$  for Artemis variety to 0.0751  $\text{g kg}^{-1}$  for Spunta variety .

Obtained results have shown the strong influence of potato variety on the chemical composition of potato tubers. The effect of the variety is also evident in the content of acrylamide generated in thermal treated samples. Analysed samples of Spunta and Sante varieties showed the lowest acrylamide levels independently of the applied heat treatment. In oil-fried samples without prior pre-treatment the lowest acrylamide content were determined in Sante variety (470  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), and the highest in Soraya variety (1482  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Reduction of the acrylamide levels was achieved for all potato varieties and for most of the applied process. For the potato samples of Artemis variety, achieved acrylamide reductions ranged from 21% for samples blanched in hot water and fried in deep oil up to 68% for samples blanched with microwave and air-fried. Potato samples of Blue salad variety, achieved reduction ranged from 2,0% for samples blanched with ultrasound and fried in oil up to 82% for samples blanched with ultrasound with addition of 0.3%  $\text{CaCl}_2$  and air-fried. Acrylamide content in potato smaples of Soraya variety were reduced by 12% for the samples blanched by microwave and fried in oil up to 92% for microwave-blanched samples with addition of 0.3%  $\text{CaCl}_2$  and fried in oil. For the potato samples of Sante variety samples, the obtained acrylamide reductions were ranged from 2,2% for samples blanched using ultrasound with addition of 0.3%  $\text{CaCl}_2$  and air-fried up to 94% for samples blanched in hot water with addition of 0,3%  $\text{CaCl}_2$  and air-fried. Reduction in acrylamide content for poatao samples of Spunta variety samples

were ranged from 8% for samples blanched with microvawe and air-fryed up to 81% for samples blanched in hot water and fried in oil.

Ragarding the correlation of the reduction of acrylamide levels and obtained color of fried products, the obtained results showed that the color of the samples fried in the hot air stream was more uniform compared to the same fried-in oil. Acrylamide levels determined in the samples fried in the hot air stream was lower than those fried in oil.

Regression model, which was made based on the values of the color parameters and obtained content of acrylamide proved to be successful tool in predicting the content of acrylamide in different potato varieties.

By measuring the textural properties of fried products, it is visible that the texture of air-fried potato products showed higher firmness and elasticity compared to the same samples fried in oil, and also compared to the control sample.

#### **Conclusion:**

Based on the given results it can be concluded that it is possible to obtain a fried potato products with low levels of acrylamide, and at the same time retain the desirable sensory properties of the finished product. That is especially visible at air-fried potato products. Application of NIR spectroscopy as a simpler, faster and economically cost-effective orientation method proved to be a good option for determining the acrylamide levels below or above the reference value.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Ivana Mandić Andačić, dipl. ing.

## ŽIVOTOPIS

Ivana Mandić Andačić rođena je 19.07.1980. godine u Mostaru. Osnovnu školu završava u Širokom Brijegu, a nakon završene Srednje Medicinske škole u Mostaru 1998. godine upisuje studij Prehrambene tehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2004. godine pod mentorstvom prof.dr.sc. Vesne Lelas s diplomskim radom na temu "Antioksidativna aktivnost zeolita u uljima". Poslijediplomski doktorski studij Prehrambeno inženjerstvo upisala je 2010 godine na istom fakultetu. Od 2006. godine zaposlena je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, a od 2014. godine na mjestu voditeljice Laboratorija za plinsku kromatografiju i spektrometiju masa.

Tijekom dokorskog studija sudjelovala je u izradi više radova objavljenih u znanstvenim časopisima CC i/ili SCI, te je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih skupova.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	3
<b>2.1. Svojstva i primjena akrilamida</b> .....	3
2.1.1. Kemijska i fizikalna svojstva akrilamida .....	3
2.1.2. Primjena akrilamida .....	5
<b>2.2. Izloženost akrilamidu</b> .....	6
<b>2.3. Metabolizam i toksičnost akrilamida</b> .....	6
2.3.1. Apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje, bioraspoloživost i biomarkeri .....	7
<b>2.4. Akrilamid u hrani</b> .....	11
<b>2.5. Prekursori akrilamida</b> .....	13
2.5.1. Asparagin .....	13
2.5.2. Karbonilni spojevi .....	14
<b>2.6. Utjecaj procesnih parametara na udio akrilamida</b> .....	15
2.6.1. Utjecaj temperature i vremena .....	16
2.6.2. Utjecaj pH vrijednosti .....	17
2.6.3. Utjecaj vlage .....	17
<b>2.7. Mehanizmi nastanka akrilamida</b> .....	18
2.7.1. Glavni putevi nastanka akrilamida .....	18
2.7.2. Sporedni putevi nastanka akrilamida .....	22
<b>2.8. Prehrambeni unos akrilamida</b> .....	24
<b>2.9. Smanjenje udjela akrilamida</b> .....	28
<b>2.10. Prehrambeni proizvodi s višim udjelom akrilamida</b> .....	30
2.10.1. Proizvodi od krumpira .....	30
2.10.2. Proizvodi na bazi žitarica .....	45
2.10.3. Kava i zamjene za kavu .....	55
<b>2.11. Analitičke metode za određivanje akrilamida u hrani</b> .....	61
2.11.1. Priprema uzoraka .....	61
2.11.2. Razdvajanje, identifikacija, detekcija i kvantifikacija akrilamida .....	64
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	69
<b>3.1. Prisutnost akrilamida u hrani koja se nalazi na tržištu RH</b> .....	69
<b>3.2. Prisutnost akrilamida u prženim krumpirima</b> .....	69
<b>3.3. Označavanje uzoraka</b> .....	70
<b>3.4. Kemikalije</b> .....	71
<b>3.5. Pribor i instrumenti</b> .....	73
<b>3.6. Postupci</b> .....	74
3.6.1. Određivanje suhe tvari .....	74
3.6.2. Određivanje ugljikohidrata HPLC metodom .....	75
3.6.3. Određivanje slobodne aminokiseline asparagin HPLC metodom .....	78
3.6.4. Toplinska obrada uzoraka .....	81
3.6.5. Određivanje udjela akrilamida UPLC-MS/MS metodom .....	84
3.6.6. Kolorimetrijsko određivanje boje .....	90
3.6.7. Određivanje teksturalnih svojstava .....	94
3.6.8. Bliska infracrvena spektroskopija (NIR) .....	96
<b>4. REZULTATI</b> .....	98
<b>4.1. Prisutnost akrilamida u hrani na tržištu RH</b> .....	98
<b>4.2. Udio prekursora akrilamida u različitim sortama krumpira</b> .....	101

<b>4.3. Utjecaj inovativnih procesnih tehnika na udio akrilamida u prženom krumpiru</b> .....	102
<b>4.4. Smanjenje udjela akrilamida u uzorcima prženog krumpira</b> .....	110
<b>4.5. Boja prženih krumpira</b> .....	112
4.5.1. PCA analiza parametara boje .....	117
4.5.2. Regresijska analiza .....	118
<b>4.6. Tekstura toplinski obrađenih proizvoda od krumpira</b> .....	120
<b>4.7. Kemometrija kao dodatni alat u obradi NIR spektara</b> .....	125
<b>5. RASPRAVA</b> .....	127
<b>5.1 Prisutnost akrilamida u hrani na tržištu RH</b> .....	127
<b>5.2. Udio prekursora akrilamida u različitim sortama krumpira</b> .....	131
<b>5.3. Utjecaj inovativnih procesnih tehnika na udio akrilamida u prženom krumpiru</b> .....	133
<b>5.4. Smanjenje udjela akrilamida u uzorcima prženog krumpira</b> .....	140
<b>5.5. Boja prženih krumpira</b> .....	141
<b>5.6. Teksturalna svojstva toplinski obrađenih proizvoda od krumpira</b> .....	146
<b>5.7. Rezultati kemometrijske obrade NIR spektara</b> .....	150
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	152
<b>7. LITERATURA</b> .....	154

## 1. UVOD

Nakon što je Švedska Nacionalna Agencija za Hranu (SNFA, 2002) u suradnji sa Stockholmskim sveučilištem potvrdila prisutnost akrilamida u hrani, brojna istraživanja usmjerena su na otkrivanje mehanizma nastanka akrilamida, utvrđivanje glavnih izvora i štetnih učinaka na zdravlje ljudi, procjenu izloženosti akrilamida putem prehrane, kao i na pronalaženje učinkovitih mjera za smanjenje njegovog udjela.

Dosadašnja istraživanja su utvrdila kategorije hrane koje najviše doprinose unosu akrilamida, a to su prženi proizvodi od krumpira, kava i pekarski proizvodi (EFSA, 2015). Razlike u udjelu akrilamida rezultat su razlika u kemijskom sastavu sirovog materijala, uvjetima predobrade i toplinske obrade uzoraka (Mesias i Morales, 2016). Akrilamid nastaje putem Maillardovih reakcija, pri visokim temperaturama ( $>120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i uvjetima niske vlažnosti u procesu toplinske obrade hrane (prženje, pečenje, roštiljanje) i uz prisustvo prirodno prisutnih sastojaka poput reducirajućih šećera (glukoza i fruktoza) i slobodnih aminokiselina (prvenstveno asparagin) (Knutsen i sur., 2009, Mottram i sur., 2002, Stadler i sur., 2002).

Brojne mjere za smanjenje udjela akrilamida u hrani sažete su u "Paketu instrumenata" kojega je sastavila organizacija Food Drink Europe koja zastupa Europsku prehrambenu industriju (FDE, 2013).

Dosadašnja istraživanja potvrdila su da udio akrilamida u konačnom proizvodu ovisi i o primijenjenim toplinskim postupcima (blanširanje, prženje, pečenje) te uvjetima u kojima se oni provode (temperatura, vrijeme). Blanširanje vrućom vodom i vodenom parom su najčešće upotrebljavani postupci blanširanja u industriji, ali se istražuju i alternativni postupci kao što su blanširanje mikrovalovima, blanširanje ultrazvukom, omsko blanširanje, infracrveno blanširanje i blanširanje visokim tlakovima (Amaral i sur., 2016).

Osim o smanjenju udjela akrilamida u konačnom proizvodu važno je voditi računa i o zadržavanju poželjnih senzornih svojstava proizvoda, pa je stoga odabir takvih uvjeta toplinske obrade koji će zadovoljiti i jedno i drugo od iznimne važnosti. Dosadašnja istraživanja su ukazala na nužnost da strategija za poboljšanje učinkovitosti smanjenja udjela akrilamida i postizanja kvalitete gotovog proizvoda jest u kombiniranju različitih metoda i tehnika pripreme i proizvodnje. Konačno, korištenje novih tehnika i optimiranja procesa moraju biti opravdani proizvodom koji su prihvatili potrošači, kako zbog troškova tako i zbog senzorskih karakteristika.

Za određivanje udjela akrilamida ne postoji službena analitička metoda, ali se najčešće koriste metode tekućinske i plinske kromatografije sa spektrometrijom masa, jer ispunjavaju postavljene zahtjeve po pitanju osjetljivosti, točnosti, preciznosti i postizanja niskih granica određivanja (EFSA, 2015). Za udio akrilamida u hrani ne postoje sigurnosne granice, ali su postavljene referentne vrijednosti za različite kategorije prehrambenih proizvoda, koje ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja vezanih za kontrolu i smanjenje udjela akrilamida (EC, 2017/2158 EU).

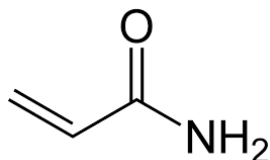
S obzirom na dosadašnje spoznaje, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitat će se utjecaj inovativnih procesnih tehnika (mikrovalno blanširanje, ultrazvučno blanširanje i prženje u struji vrućeg zraka) radi smanjenja nastanka akrilamida u prženim proizvodima od krumpira, uz istovremeno zadržavanje poželjnih senzorskih svojstava gotovog proizvoda.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Svojstva i primjena akrilamida

#### 2.1.1 Kemijska i fizikalna svojstva akrilamida

Akrilamid (2-propenamid) je  $\beta$  nezasićeni karbonilni spoj kemijske formule  $C_3H_5NO$  ( $CH_2=CH-CONH_2$ ). Akrilamid posjeduje dvije funkcionalne grupe, amidnu i elektron-deficitarnu vinilnu (Slika 1.) koja ga čini lako dostupnim za širok raspon reakcija, između ostalog i za reakcije s nukleofilnim skupinama na biološkim molekulama, što može doprinijeti stvaranju njegovog toksičnog učinka (EFSA, 2015).



Slika 1. Kemijska strukturna formula akrilamida (EFSA, 2015)

Akrilamid dolazi u formi kristala (Slika 2.), bijele je boje, bez mirisa i molekulske mase  $71,08 \text{ g mol}^{-1}$  (Šarkanj i sur., 2010).



Slika 2. Kristalni oblik akrilamida (ZhejiangXinyongBiochemical Co., Ltd.)

Točka tališta ( $T_t$ ) akrilamida je pri  $84,5 \text{ °C} \pm 0,3 \text{ °C}$ , točka vrelišta ( $T_v$ ) pri 3,3 kPa je  $136 \text{ °C}$ , a tlak para  $0,007 \text{ mmHg}$  pri  $25 \text{ °C}$  (Eriksson, 2005). Budući da je akrilamid polarni spoj, topljiv

je u vodi, acetonu, etanolu i metanolu, a slabije je topljiv u kloroformu, benzenu i ostalim nepolarnim otapalima (Tablica 1).

Tablica 1. Topljivost akrilamida u različitim otapalima (Eriksson, 2005)

Otapalo	g L <sup>-1</sup> pri 30 °C
voda	2155
metanol	1550
etanol	862
aceton	631
acetonitril	396
kloroform	26,6
benzen	0,38

Zbog visoke topljivosti u vodi i ostalim polarnim otapalima ima veliku mobilnost u tlu i podzemnim vodama i biorazgradiv je (Friedman, 2003). Postoje brojni mikroorganizmi koji kataliziraju sintezu i bio-razgradnju akrilamida. Neki od njih su amidaze, nitrilhidrataza, glutamin sintetaza i dr. (Duda Chodak i sur., 2016). Iako je relativno stabilan, u vodenim otopinama ulazi u reakcije polimerizacije pri čemu nastaju poliakrilamidi (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016).

Akrilamid je u industrijskim mjerilima prvi put proizveden 1893. u Njemačkoj, a njegova komercijalna proizvodnja u industrijske svrhe započinje 1954 god. (EFSA, 2015). Akrilamid se može dobiti u dva oblika, kao monomer i polimer (Krishnakumar i Visvanathan, 2014).

Postoje tri načina dobivanja akrilamida:

1. Kiselinska proizvodnja
2. Katalitička hidratacija akrilonitrila
3. Enzimska hidratacija (EFSA, 2015; Yasuhisa i sur., 2014)

Sumporno kiselinska proizvodnja akrilamidaje prvi način proizvodnje koji je zamijenjen s katalitičkom hidratacijom akrilonitrila zbog prisustva nečistoća. Konvencionalni proces dobivanja započinje hidratacijom akrilonitrila sulfatnom kiselinom uz prisustvo soli bakra kao katalizatora. Kao produkt nastaje otopina akrilamid-sulfata koja se neutralizira amonijakom. Iz nastale otopine ekstrahira se akrilamid, koji se potom hladi i izolira kao kristalni monomer. U današnje vrijeme, akrilamid se u zemljama članicama Europske unije proizvodi procesom

katalitičke hidratacije akrilonitrila, kao 30-50% vodena otopina, a proizvodni kapacitet se kreće od 150 000 t do 200 000 t (EFSA, 2015). Osim navedenim procesima, akrilamid se može proizvesti i mikrobno-enzimskim putem, pomoću bakterije *Pseudomonas Chlororaphus* B23 i katalizatora nitril hidrataze (Yasuhisa i sur., 2014). Ovakav proces proizvodnje ima prednost jer se njime skoro sav akrilonitril prevodi u akrilamid.

### 2.1.2. Primjena akrilamida

Akrilamid tvori polimere i dimere, i njegovi polimeri i (ko) polimeri imaju široku primjenu prvenstveno u industriji i poljoprivredi. Primarno se koristi za proizvodnju poliakrilamida (Linebacki sur., 2012), ali i u raznim znanstvenim istraživanjima (Friedman, 2003). Akrilamid polimeri i (ko)-polimeri se koriste u različitim granama industrije, uključujući naftnu, tekstilnu, papirnu, kozmetičku i industriju obrade voda (Zhang i Zhang, 2007). U naftnoj industriji koriste se kao aditivi za poboljšanje reoloških svojstava bušotinskih tekućina. U tekstilnoj industriji, polimeri visoke molekulske mase koriste se kao zaštitni sloj za izradu vlakana, jer smanjuju potrošnju škroba i želatine. U papirnoj industriji, akrilamid se koristi za poboljšanje kvalitete samog papira i to na način da poboljšava strukturu površinskog sloja papira zbog zadržavanja punila u papirnoj celulozi (Myagchenkov i sur., 1991). U kozmetičkoj industriji, akrilamid se koristi za proizvodnju preparata za osobnu njegu, poput losiona i dezodoransa (Exon, 2006). Budući da je akrilamid biorazgradiv sastojak koristi se i za pročišćavanje kako vode za ljudsku potrošnju tako i otpadne vode (Arvanitoyannis i Dionisopoulou, 2014). Akrilamid se u poljoprivredi koristi kao sredstvo za formiranje strukture tla. Dodavanjem i malih količina akrilamid (ko)polimera velike molekulske mase povećava se otpornost tla prema eroziji vjetra i vode i optimira njegova disperzija i propusnost zraka i vode. Na taj način se struktura tla mijenja u željenom smjeru. Koristi se još i kao zaštitni sloj materijala na granulama mineralnih gnojiva. Ovakav oblik granula dozvoljava primjenu svih vrsta herbicida i fungicida na površinskom sloju te se na taj način može kontrolirati brzina unošenja fungicida i herbicida (Myagchenkov i sur., 1991). U znanstvenim istraživanjima, akrilamid je korišten za selektivno mijenjanje SH-grupe u strukturnim i funkcionalnim proteinima, kako bi se razjasnila struktura i funkcija proteina i kao inhibitor triptofanske fluorescencije (Friedman, 2003). U istraživačkim laboratorijima koristi se za pripremu poliakrilamida za gelove za elektroforezu. Zadnja dva desetljeća akrilamid polimeri se koriste i kao jako učinkoviti adsorberi u gel propusnoj kromatografiji.

## 2.2. Izloženost akrilamidu

Ljudi su putem različitih izvora (voda, tlo, duhanski dim, zrak, kozmetički proizvodi i ambalaža) izloženi različitim udjelima akrilamida, ali jedan od najvažnijih izvora izloženosti za čovjeka je putem hrane. Izloženost akrilamidu putem hrane je direktna izloženost, i uglavnom se radi o izloženosti putem toplinski obrađene hrane, poput pekarskih proizvoda, pržene kave, proizvoda od krumpira i sl. (EFSA, 2015). Osim u hrani, akrilamid je prisutan i u okolišu. Akrilamid u okoliš dospijeva tijekom proizvodnje poliakrilamida. Njegova postojanost u okolišu zbog visoke topljivosti u vodi, velike mobilnosti i razgradnji pomoću mikroorganizama je mala i ne bi trebala biti prijetnja ljudskom zdravlju (Duda Chodak i sur., 2016). Akrilamid je prisutan i u dimu cigarete (Smith i sur., 2000). Zanimljiva je činjenica da je akrilamid u dimu cigarete otkriven prije nego u hrani. Još je Begmark 1997. godine pokazao kako pušači koji ne rade s akrilamidom imaju dva puta veću razinu hemoglobin adukata (biomarkeri za utvrđivanje izloženosti akrilamidu) u usporedbi s nepušačima koji su radili na pripremanju akrilamid gela (Xu i sur., 2014). Što se tiče njegove prisutnosti u atmosferi, ona je vrlo mala, uglavnom je u zraku prisutan kod profesionalne izloženosti, a kada je i prisutan, njegov niski tlak para čini malo vjerojatnim da će se kroz nju transportirati (EFSA, 2015; Gökmen, 2016). Osim putem hrane, vode i dima cigarete, vanjski izvori izloženosti uključuju i izloženost putem ambalaže, kozmetike i tekstila. Izloženost putem ambalaže i putem kozmetičkih proizvoda je indirektna izloženost ostacima monomera u ambalaži i kozmetičkim proizvodima u kojima se poliakrilamid koristio kao sredstvo za vezanje (Zhang i Zhang, 2007).

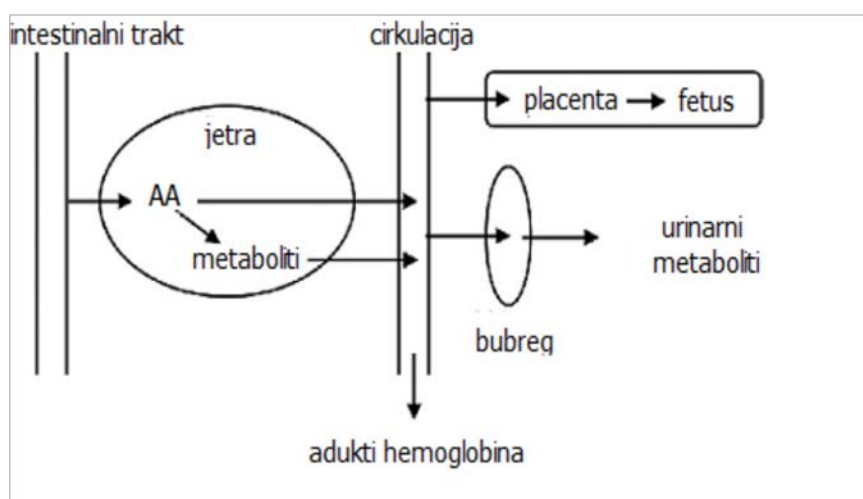
## 2.3. Metabolizam i toksičnost akrilamida

Akrilamid zbog svoje široke rasprostranjenosti i sumnje da uzrokuje karcinom kod ljudi predstavlja važan zdravstveni problem (JECFA, 2011). Međunarodna Agencija za Istraživanje Karcinoma (eng. International Agency for Research on Cancer-IARC), ga je svrstala u grupu 2A, kao potencijalno kancerogenog za ljude (IARC, 1994).



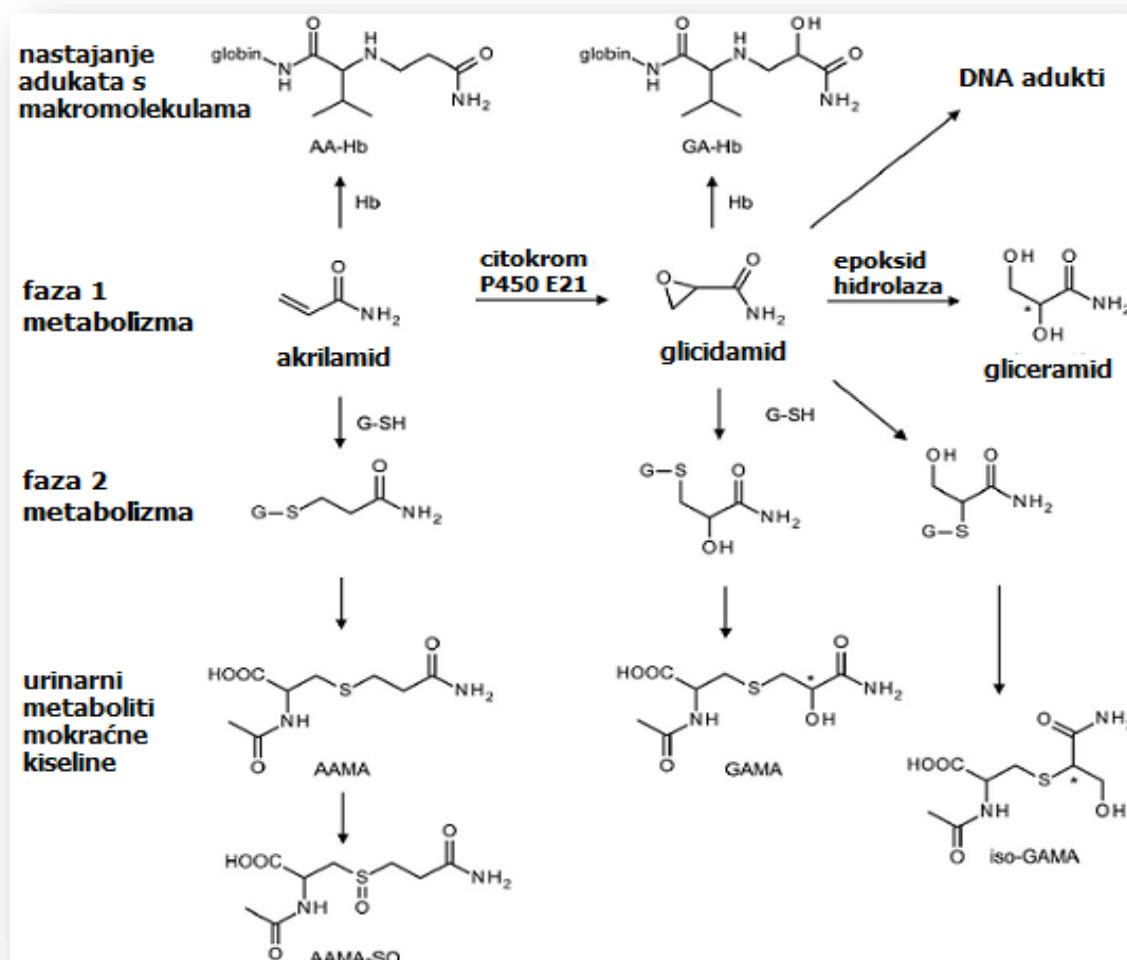
### 2.3.1. Apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje, bioraspoloživost i biomarkeri

Akrilamid se u ljudski organizam može unijeti putem probavnog sustava, inhalacijom i preko kože. Apsorpcija akrilamida oralnim putem smatra se brzom i potpunom (Fennell i sur., 2005). Oralno unijeti akrilamid se brzo apsorbira, i njegova bioraspoloživost iznosi 30-44% ako se unese hranom, 60-98%, ako se unese vodom, a 6,6%, ako se unese preko kože (Hays i Aylward, 2008). Zbog visoke polarosti i dobre topljivosti u vodi, akrilamid lako prolazi kroz biološke membrane te se nakon apsorpcije brzo distribuira u sva tkiva bez tragova akumulacije (Lineback i sur., 2012). Može se pronaći i u majčinom mlijeku, a može proći i kroz placentu do fetusa (JECFA, 2011). Na Slici 3. prikazan je shematski prikaz apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja akrilamida.



Slika 3. Shematski prikaz apsorpcije, distribucije, biotransformacije i izlučivanja akrilamida (Kocadağlı i Gökmen, 2016)

Akrilamid se nakon apsorpcije uglavnom izlučuje putem urina (nakon 24 h), a nešto dulje zaostaje na koži i testisima (Duda-Chodak i sur., 2016). Metabolizam akrilamida se primarno odvija u jetri (Doerge i sur, 2007). Nakon apsorpcije akrilamida, dva su moguća metabolička puta (Slika 4).



Slika 4. Metabolički putevi akrilamida (Kocadağlı i Gökmen, 2016)

U prvom metaboličkom putu akrilamid se metabolizira do reaktivnog epoksidnog metabolita glicidamida (GA), pomoću citokroma P450 2E1 (Duda-Chodak i sur., 2016), za kojeg se smatra da je odgovoran za njegove genotoksične učinke (Friedman, 2003; Jägerstad i Skog, 2005). U drugom metaboličkom putu, kod miševa, štakora i ljudi, akrilamid može proći reakciju detoksifikacije, direktnom konjugacijom sa glutationom (GSH) putem enzima glutation-S-transferaze, pri čemu nastaju konjugati merkapturične kiseline (akrilamid-MA) (Lineback i sur., 2012). I nastali GA može reagirati sa GSH, pri čemu kao urinarni metaboliti također nastaju konjugati merkapturične kiseline (GA-MA) (Doerge i sur., 2007) ili može hidrolizirati pri čemu nastaje netoksični 2,3-dihidroksi-propanamid (gliceramid) i 2,3-dihidroksi propionska kiselina (Summer i sur., 2003). Najveća količina metaboliziranog akrilamida izlučuje se urinom (40-70%), a njegov glavni metabolit je upravo merkapturična

kiselina (MA) (Duda-Chodak i sur., 2016). Kod ljudi, oksidacija do GA je slabo zastupljena, svega 12% ukupnih metabolita u urinu se odnosi na metabolit GA-MA, za razliku od miševa, kod kojih se i do 60% metabolita odnosi na GA-MA (Summer i sur., 2003). Konjugacija sa GSH je puno češća, i više od 50% metabolita u urinu pripada metabolitima merkapturične kiseline, koji su posljedica konjugacije s GSH (Fennell i sur., 2005; Fuhr i sur., 2006). Konjugacija s GSH važna je za smanjenje reaktivnosti akrilamida na stanične komponente i učestaliji je put metabolizma akrilamida u ljudi (Kocadağlı i Gökmen, 2016). Gliceramid, koji je topljiv u vodi, je ujedno glavni produkt oksidacijskog metabolizma kod ljudi (Duda-Chodak i sur., 2016). Velika aktivnost akrilamida prema nukleofilnim sastojcima hrane, kao što su –SH, –NH<sub>2</sub> i –OH grupe peptida i proteina u hrani koja sadrži akrilamid, mogu biti odgovorne za smanjenje biodostupnosti (Baum i sur., 2008). I akrilamid i GA se kovalentno vežu u reakcijama adicije Michael tipa na aminokiseline u hemoglobinu (Hb), i stoga se Hb-adukti akrilamida (Hb-akrilamid) i GA (Hb-GA) koriste kao biomarkeri za izloženost akrilamidu i kod ljudi i kod životinja (Xu i sur., 2014). Mjerenje Hb-adukata nije specifično, budući da oni nisu vezani samo za jedan izvor izloženosti (Xu i sur., 2014). Kao dodatni biomarker u ljudi iz urina koristi se 2,3-dihidroksi propionamid (OH-PA), produkt hidrolize GA (Xu i sur., 2014). Jedan od načina razgradnje akrilamida jest i pomoću mikrobnih amidaza. Bakterije koje se nalaze u probavnom sustavu (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*) sintetiziraju enzim amidazu, koji sudjeluje u biorazgradnji akrilamida, što znači da i u ljudskom organizmu može postojati mehanizam za razgradnju akrilamida (Duda-Chodak i sur., 2016).

### 2.3.2. Toksičnost akrilamida

Akrilamid i njegov glavni epoksidni metabolit GA, reagiraju sa brojnim biološki značajnim molekulama. Zbog svoje  $\alpha,\beta$  nezasićene strukture, akrilamid lako reagira sa nukleofilima, s tim da GA puno lakše reagira sa purinskim i pirimidinskim bazama u DNA, zbog relativno visoke gustoće naboja (Lo Pachin, 2005). Toksikološko djelovanje akrilamida može se izraziti kao neurotoksičnost kod ljudi i životinja, razvojna i reproduktivna toksičnost kod glodavaca i kancerogenost kod glodavaca (Psarzeffall, 2008).

Neurotoksičnost akrilamida je jedini toksični učinak koji je dokazan na ljudima (Zamani i sur., 2017). Svjetska Zdravstvena Organizacija (WHO, 2005) potvrđuje neurotoksičnost kod ljudi, i to prvenstveno kod profesionalne izloženosti (Xu i sur., 2014). Zajedničko stručno povjerenstvo za aditive u hrani (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), je zaključilo da su neurološki utjecaji malo vjerojatni na procijenjenoj prosječnoj izloženosti, ali

morfološke promjene na živcima, ne mogu biti isključene za potrošače koji unose visoke količine akrilamida putem prehrane (JECFA, 2011). Da bi se razvili neurotoksični učinci potrebna je višestruka izloženost akrilamidu. Većina primjetnih simptoma uključuje tremor, gubitak ravnoteže, gubitak pamćenja, letargiju i opću slabost (Hagmar i sur., 2001). Kod oralnih doza manjih od onih koje izazivaju kliničke znakove, pronađeni su dokazi o degenerativnim lezijama u perifernim živčanim vlaknima (ASTDR, 2012).

Reproduktivna toksičnost, koja je povezana s kromosomskim oštećenjima, alkiliranjem –SH skupina, iscrpljivanjem GSH ili oštećenjem DNA, pronađena je kod životinja koje su bile podvrgnute eksperimentima (Xu i sur., 2014). Kod ljudi reproduktivna toksičnost nije dokazana (Lo Pachin, 2004).

Genotoksični učinak akrilamida povezan je ili sa metaboličkom pretvorbom akrilamida u GA, koji može biti odgovoran za njegovu mutagenost, ili putem formiranja adukata s –SH, –OH i –NH<sub>2</sub> skupinom, i u manjoj mjeri s nukleofilnim centrima DNA (Xu i sur., 2014). GA je jaki mutagen s visokom reaktivnošću na DNA, pretežno inducirajući točkastu mutaciju (Bandarra i sur., 2013). Rezultati Beland-a i suradnika (2013), na temelju dvogodišnje studije provedene na muškim i ženskim miševima i štakorima, izloženim različitim koncentracijama akrilamida u vodi za piće, također podupiru tezu da je akrilamid genotoksični kancerogen, kao rezultat metaboličke aktivacije GA. Izlaganje visokim koncentracijama u vodi za piće dovelo je do razvoja višestrukih tumora na više mjesta i kod ženki i kod mužjaka. S obzirom da je najosjetljiviji organ na izloženost akrilamida kod miševa Harderian žlijezda, koja nije prisutna kod ljudi, dobivene rezultate je teško primijeniti kod ljudi. Od 2002 godine, nekoliko studija je provedeno kako bi se pronašla veza između unosa akrilamida kod ljudi i povećane učestalosti različitih vrsta karcinoma. Istraživanje Rice-a i suradnika (2005) pokazalo je da ne postoji statistički značajna veza između izloženosti akrilamidu i povećanju rizika od karcinoma bilo kojeg organa, što je kasnije potvrđeno i od strane drugih autora (Mucci i sur., 2006; Pelluci i sur., 2006). Također sveobuhvatni pregled studija od strane Peluuci-a i suradnika (2011) o utjecaju akrilamida iz hrane na nastanak karcinoma kod ljudi, doveo je do zaključka da dostupne studije konstantno sugeriraju nedostatak povećanog rizika za većinu tipova karcinoma kod izloženosti akrilamidu. U novije vrijeme, rezultati istraživanja ukazuju na rizik od karcinoma prostate, nakon konzumacije odabrane duboko pržene hrane, ali nije dovoljno jasno da li je rizik specifičan za duboko prženu hranu ili predstavlja rizik povezan sa uobičajenim uzimanjem hrane izložene visokim temperaturama i brze hrane (Stott-Miller i sur., 2013). Trenutni epidemiološki i toksikološki dokazi nisu dovoljni da bi se akrilamid proglasio

kancerogenim za ljude, jer s epidemiološke točke gledišta ne postoji čvrsta veza između izloženosti akrilamid i nastanka karcinoma (Lipworth i sur., 2012, 2013.)

## 2.4. Akrilamid u hrani

U travnju 2002. godine Švedska Nacionalna Agencija za Hranu (Swedish National Food Agency) u suradnji sa Stockholmskim sveučilištem prva izvještava o prisutnosti akrilamida u određenim kategorijama hrane (SNFA, 2002). To otkriće je izazvalo pažnju diljem svijeta budući je akrilamid klasificiran kao potencijalno kancerogen za ljude (IARC, 1994). Nedugo nakon toga, istraživanja Tareke-a i suradnika (2002) su potvrdila te navode, zaključivši da se radi o hrani bogatoj ugljikohidratima, obrađenoj pri visokim temperaturama. Nakon toga brojni znanstvenici (Mottram i sur., 2002; Stadler i sur., 2002; Pedreschi i sur., 2006) provode istraživanja o mehanizmu nastanka akrilamida, prekursorima, tehnikama toplinske obrade, metodama određivanja i mogućim mjerama za smanjenja udjela akrilamida u prehrambenim proizvodima. Kao ključna reakcija prepoznata je Maillardova reakcija (Tareke i sur., 2002; Mottram i sur., 2002; Stadler i sur., 2002), što je i potvrđeno naknadnim istraživanjima (Zyzak i sur., 2003, Yaylayan i sur., 2003). Akrilamid pripada tzv. kontaminantima (EEZ/315/93) nastalim u hrani, koji su nastali kao rezultat prisutnosti odgovarajućih prekursora i uvjeta obrade (Matthäusi Haase, 2014). Akrilamid uglavnom nastaje deaminacijom i dekarboksilacijom asparagina (Mottram i sur., 2002; Stadler i sur., 2002; Zyzak i sur., 2003), stoga se slobodna aminokiselina asparagin i reducirajući šećeri smatraju njegovim prekursorima (JECFA, 2011). Maillardova reakcija je neenzimska reakcija između amino grupe (-NH<sub>2</sub>) prirodno prisutnih aminokiselina i karbonilne grupe (-COOH) reducirajućih šećera do koje dolazi prilikom toplinske obrade hrane pri temperaturama iznad 120 °C (pečenje, roštiljanje, prženje i sl.) i u uvjetima niske vlažnosti (Biedermann i sur., 2002; Friedman, 2003; Mottram i sur., 2002). Kao rezultat Maillardove reakcije nastaju poželjne tvari arome i okusa (Rydberg i sur., 2005), ali i nepoželjni spojevi poput akrilamida (Lindenmeier i Hofman, 2010). Većina akrilamida nastaje tijekom zadnje faze pečenja, prženja ili roštiljanja kako hrana gubi svoju vodu (JECFA, 2006). Akrilamid je pronađen u različitim prehrambenim proizvodima (Tablica 2), a najviše u 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 (Rydberg i sur., 2005).

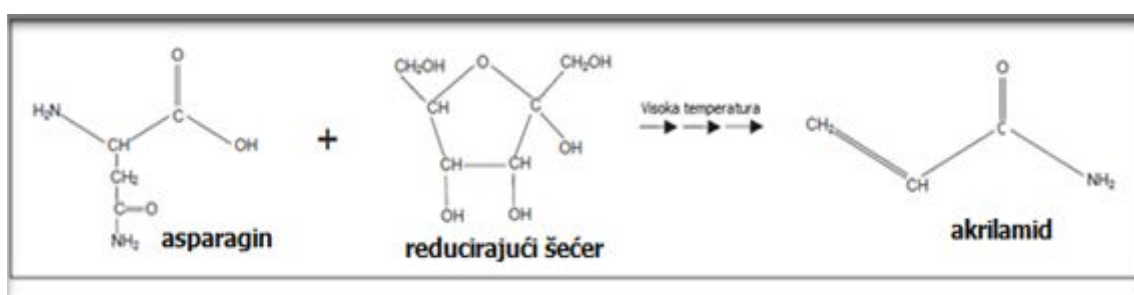
Tablica 2. Udio akrilamida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u određenim kategorijama hrane (EFSA, 2015)

<i>Kategorija prehrambenog proizvoda</i>	<i>n (broj uzoraka)</i>	<i>Srednja vrijednost (sv)</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Proizvodi od krumpira (osim krumpirov čips i grickalice)	1694	308	239	606
Krumpirov čips i grickalice	34501	389	283	519
Meki kruh	543	42	38	57
Žitarice za doručak	1230	161	102	211
Keksi, krekeri, hruskavi kruh i sl.	2065	265	171	407
Kava	1457	522	249	710
Zamjene za kavu	88	1499	510	2942
Hrana za djecu osim prerađene hrane na bazi žitarica	416	24	12	22
Prerađena hrana na bazi žitarica za djecu	736	73	13	125
Ostali proizvodi na bazi žitarica	569	97	13	171
Ostali (ne prženi) proizvodi na bazi krumpira	40	108	70	570
Ostali proizvodi	120	330	68	1846

Akrilamid nije pronađen u sirovoj, kuhanoj ili hrani obrađenoj u mikrovalnoj, a vrlo male količine su pronađene u hrani životinjskog podrijetla (Eriksson, 2005), upravo zbog manjka potrebnih prekursora. Kao što je vidljivo iz Tablice 2. najveći udjeli akrilamida utvrđeni su u nadomjescima za kavu i kavi. Zbog učinka razrjeđenja, niže vrijednosti se očekuju u napicima kave i napicima zamjena za kavu. Visoke vrijednosti udjela akrilamida su utvrđene u kategorijama krumpirov čips i grickalice, proizvodi od krumpira, keksi, krekeri i hruskavi kruh. Srednje vrijednosti akrilamida su određene u kategoriji žitarice za doručak i ostali proizvodi na bazi krumpira, a niske u kategoriji meki kruh i dječja hrana osim na bazi žitarica. Razlike u kategorijama rezultat su razlika u sirovom materijalu, sastavu, uvjetima obrade i kulinarskim tehnikama. Intenzitet nastanka akrilamida u hrani ovisi o početnoj koncentraciji asparagina i reducirajućih šećera te njihovom omjeru, kao i o uvjetima obrade (temperatura, vrijeme, pH i udio vlage) (Lingnert i sur., 2002; Rydberg i sur., 2005).

## 2.5. Prekursori akrilamida

Akrilamid u hranu ne dolazi kao kontaminant iz okoliša, već nastaje iz njenih prirodno prisutnih sastojaka (Slika 5.). 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). Između navedenih aminokiselina, asparagin ima veću tendenciju za interakciju sa šećerima u odnosu na ostale (Mottram i sur., 2002). Rezultati dobiveni u model sustavima, na primjeru veze između akrilamida i njegovih prekursora, pokazuju da velike gubitke asparagina i ukupnih reducirajućih šećera prati veliki porast akrilamida (Elmore i sur., 2005).



Slika 5. Struktura akrilamida i njegovih prekursora (Wilson, 2006)

### 2.5.1. Asparagin

Asparagin je neesencijalna aminokiselina koja je prvi put izolirana iz soka šparoge 1806. godine (Friedman, 2003), a rezultati znanstvenika pokazuju da je ona jedan od glavnih prekursora za nastanak akrilamida u toplinski obrađenoj hrani (Becalski i sur., 2003; Yaylayan i sur., 2003). Uloga asparagina je usmjeravanje transporta, kao i čuvanje dušika u biljkama. Promjene u udjelu asparagina dobar su indikator promjena u metabolizmu dušika kod biljaka, izazvane pesticidima i okolišnim uvjetima, jer npr. dodatak herbicida rezultira u povećanju udjela asparagina (Friedman, 2003). Potvrdu o ključnoj ulozi asparagina u nastajanju akrilamida u hrani dali su rezultati istraživanja koje su proveli Zyzak i suradnici (2003), koja ukazuju na to da je amino skupina bočnog lanca asparagina uklopljena u amidnu vezu nastalog akrilamida (Slika 5).

## 2.5.2. Karbonilni spojevi

Karbonilni spojevi koji sudjeluju u Maillardovim reakcijama mogu se podijeliti u keto i aldo saharide,  $\alpha$ -hidroksikarbonile i kratkolančane  $\alpha$ -dikarbonile uz disaharide (Yaylayan, 2009). Što se tiče utjecaja reducirajućih šećera i ostalih  $\alpha$ -dikarbonilnih spojeva, različita istraživanja dala su različite rezultate. Istraživanja Stadler-a i suradnika (2002) te Biedermana i suradnika (2002) ukazuju na to da keto šećeri kao što je fruktoza su učinkovitiji od aldehid šećera (npr. glukoza). Jedno od objašnjenja je viša reaktivnost fruktoze, zbog niže točke taljenja, što utječe na veću molekulsku pokretljivost, a time i bržu reakciju (Stadler, 2006), ili postojanje  $\alpha$ -hidroksilne grupe, budući da fruktoza ima dvije (Eriksson, 2005). Rezultati Schieberle-a i suradnika (2005) dobiveni grijanjem jednake smjese asparagina i pet različitih monosaharida, i dva disaharida, pokazali su kako najveći utjecaj na nastanak akrilamida ima glukoza. Zanimljivo je da je i saharoza kao nereducirajući šećer dala slične prinose kao neki drugi reducirajući šećeri (Tablica 3). Razlog tome leži u činjenici da se nereducirajući šećeri poput saharoze mogu hidrolizirati pod utjecajem topline, pri čemu nastaju reducirani monosaharidi. Utjecaj glukoze, fruktoze i saharoze na nastanak akrilamida ovisi o temperaturi i udjelu vode u sustavu. U sustavima s nižim udjelom vlage i temperaturom do 200°C najveći doprinos nastanku akrilamida daje fruktoza, dok je pri temperaturama iznad 200°C saharoza učinkovitija.

Tablica 3. Utjecaj različitih vrsta šećera na udio akrilamida (Mottram i sur., 2006)

Vrsta šećera	Akrilamid (mmol mol <sup>-1</sup> Asparagina)
Glukoza	9,6
Fruktoza	8,9
Laktoza	8,1
Riboza	7,6
Arabinoza	6,7
Eritroza	6,4
Saharoza	5,4



Što se tiče ostalih karbonilnih spojeva,  $\alpha$ -hidroksikarbonili su učinkovitiji u odnosu na dikarbonile u pretvorbi asparagina do akrilamida (Tablica 4). Razlog tome može biti taj što  $\alpha$ -hidroksi grupa igra glavnu ulogu u razgradnji asparagina, na način da snižava ukupnu energiju aktivacije u Maillardovoj reakciji (Mottram i sur., 2006).

Tablica 4. Utjecaj karbonilnih spojeva na udio akrilamida (Stadler i Struder, 2016)

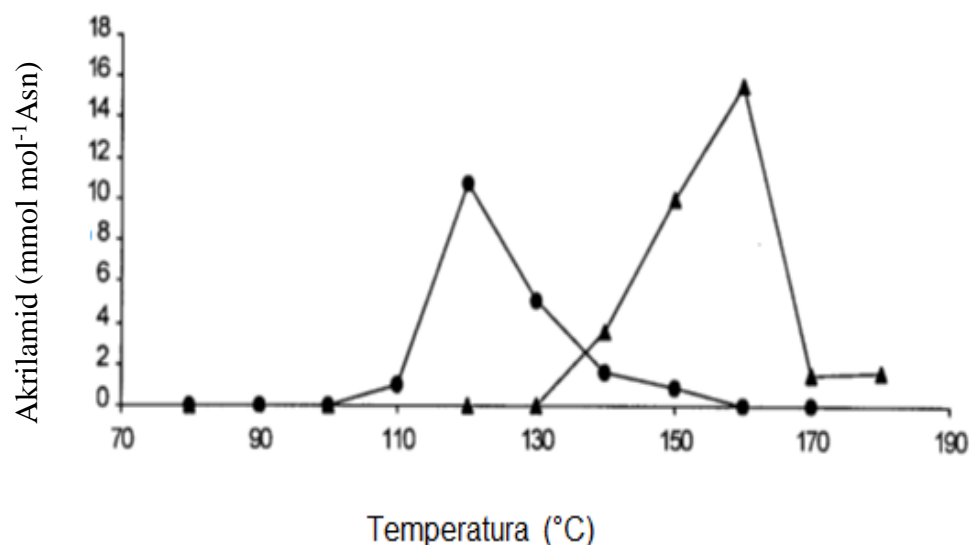
Vrsta karbonilnog spoja	Akrilamid (mmol mol <sup>-1</sup> Asparagina)
2-hidroksi-1-butanal	15,8
Hidroksi aceton	3,97
Glukoza	2,22
Glioksal	0,52
Diacetil	0,38
3-hidroksi-propanamid	0,26
Glioksilna kiselina	0,24

## 2.6. Utjecaj procesnih parametara na udio akrilamida

Brojni znanstvenici (Blank, 2005, Pedreschi i sur., 2014; Surdyk i sur., 2004) su istraživali utjecaj procesnih uvjeta poput temperature i vremena zagrijavanja, pH i udjela vode na nastanak akrilamida u hrani. Dobiveni rezultati upućuju na to da količina akrilamida u hrani u znatnoj mjeri ovisi i o načinu pripreme hrane odnosno procesnim parametrima.

### 2.6.1. Utjecaj temperature i vremena

Mnogi istraživanja su potvrdila da temperatura i vrijeme toplinske obrade hrane značajno utječu na nastanak akrilamida (Mottram i sur., 2002; Stadler i sur., 2002; Pedreschi i sur., 2006), kao i to da za njegov nastanak nisu potrebne vrlo visoke temperature (Blank i sur., 2005; Mottram i sur., 2002). Stadler i suradnici (2002) zaključili su da nastanak akrilamida raste s porastom temperature od 120°C do 170°C, a nakon toga opada. Wedzicha i suradnici (2005) su potvrdili rezultate Stadlera i suradnika (2002) i zaključili su da su i nastanak i eliminacija akrilamida pod utjecajem temperature i vremena pripreme. Značajne količine akrilamida nastaju kada je hrana izložena temperaturama iznad 120 °C, a kada temperatura prijeđe 160 °C nastali akrilamid se dijelom eliminira, i njegova rezidualna količina ovisi o temperaturi i trajanju izlaganja. Većina akrilamida nastaje na kraju procesa prženja kada površina namirnice postaje izrazito suha, zbog visoke temperature i smanjenog udjela vlage (JECFA, 2006). Na Slici 6. prikazan je nastanak akrilamida grijanjem binarne ekvimolarne smjese glukoze i asparagina pri različitim temperaturama i vremenu.



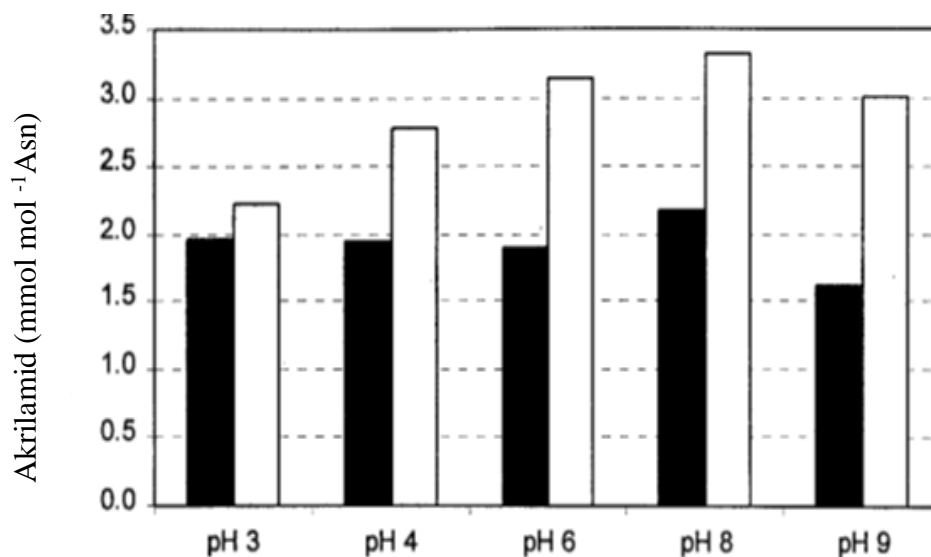
Slika 6. Utjecaj temperature i vremena (60 min ● i 5 min ▲) zagrijavanja na udio akrilamida (Blank i sur., 2005)

Iz prikaza je vidljivo da je međusobna povezanost temperature i vremena snažno utjecala na količinu nastalog akrilamida. Visoke količine akrilamida nastaju već pri 120 °C i dugom

reakcijskom vremenu (60 min.), dok je temperatura od 160 °C potrebna za nastanak najveće količine akrilamida pri kratkom vremenu (5 min.).

### 2.6.2. Utjecaj pH vrijednosti

Maillardove reakcije su ovisne o pH vrijednosti, jer pri nižim pH vrijednostima amino grupe aminokiseline kao pekursora su protonirane i prema tome nedostupne za daljnje reakcije. Vrijednost pH se pokazala kao učinkovita mjera kontrole udjela akrilamida u određenim prehrambenim proizvodima (Jung i sur., 2003). Niža pH vrijednost osigurava umjerenu Maillardovu reakciju, što utječe na smanjenje nastanka akrilamida (Keramat i sur., 2011), a maksimalna vrijednost je dostignuta pri pH 7 ili višem (Elbashir i sur., 2014; Miclack i sur., 2013). Rezultati Blanka i suradnika (2005) također pokazuju manje akrilamida nastaje u fruktoznom sustavu pri pH 3, dok pri pH 8 nastaje više akrilamida (Slika 7.).



Slika 7. Udio akrilamida u binarnoj smjesi asparagina, glukoze (crni stupci) i fruktoze (bijeli stupci) u funkciji pH (Blank i sur., 2005)

### 2.6.3. Utjecaj vlage

Obzirom da akrilamid uglavnom nastaje Maillardovim reakcijama, sadržaj vlage u matriksu je vrlo važan. Temperatura pri kojoj dolazi do nastanka akrilamida ovisna je o sadržaju vlage u hrani (EFSA, 2015). Budući da akrilamid nije pronađen u kuhanim proizvodima, zaključeno je da je nastanak akrilamida ograničen na kulinarske tehnike koje prvo rezultiraju u djelomičnom sušenju (Xu i sur., 2014). Elmore i suradnici (2005) su istraživali utjecaj vode na nastanak akrilamida. Rezultati njihovog istraživanja upućuju na to

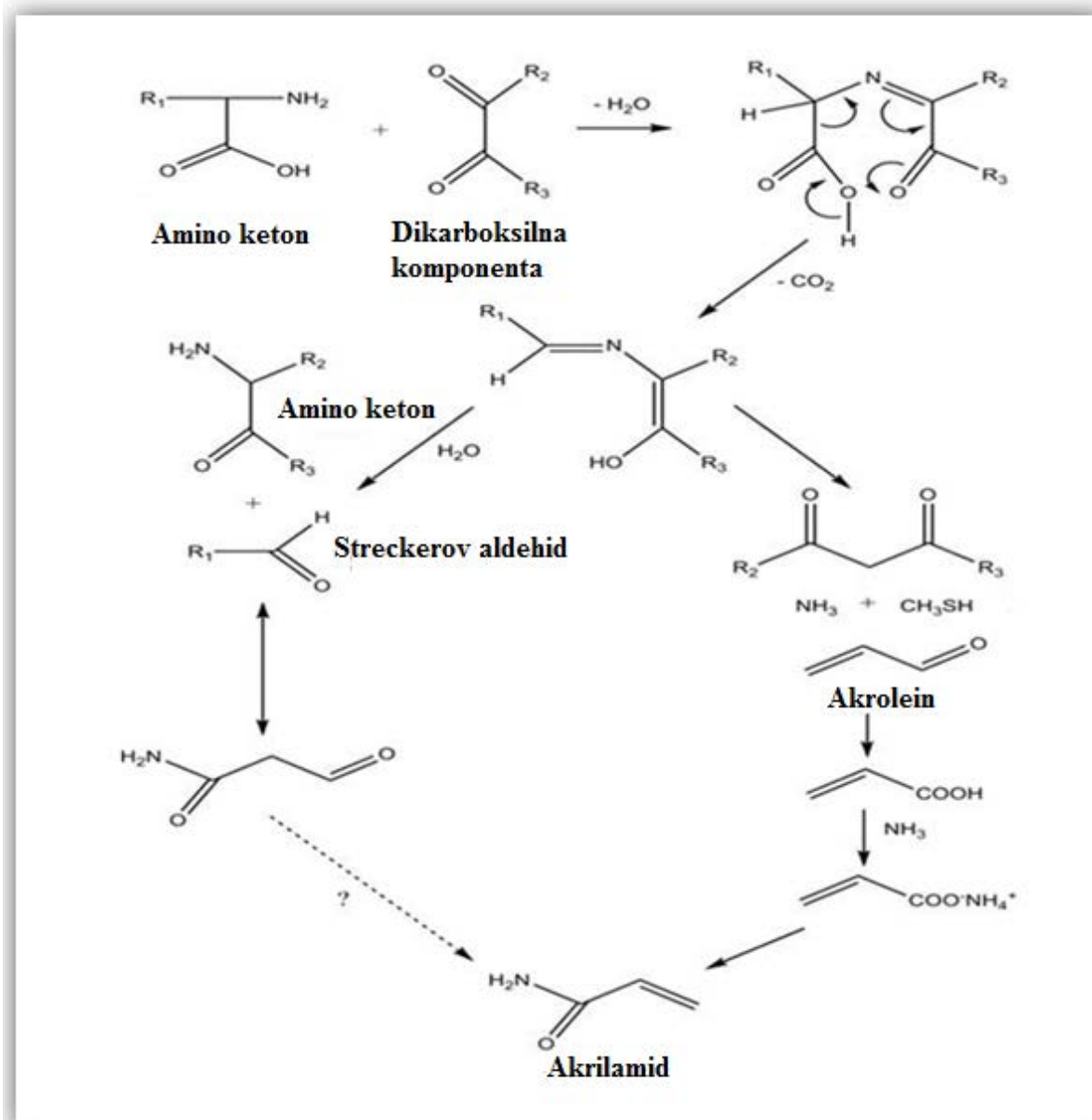
da se tijekom toplinske obrade tijesta sadržaj vode smanjuje, dok se s druge strane sadržaj akrilamida povećava, ali samo kod intenzivnog zagrijavanja, kada unutrašnja temperatura tijesta prelazi 100 °C. Mestdagh i suradnici (2006), došli su do zaključka da nizak udio vode u matriksu doprinosi smanjenju udjela akrilamida u konačnom proizvodu što je u skladu s rezultatima Blanka i suradnika (2005). Rezultati Elmora i suadnika (2005) objašnjeni su činjenicom da unutarnja temperatura tijesta rijetko prelazi 100 °C i voda na toj temperaturi ne isparava i ne stvara se značajna količina akrilamida. Samo intenzivno zagrijavanje i isparavanje vode dovodi do povećanog prinosa akrilamida.

## 2.7. Mehanizmi nastanka akrilamida

Budući da je hrana složen matriks, nastanak akrilamida u realnim uzorcima hrane može se odvijati kroz različite putove i međuprodukte. Iako točan mehanizam nastanka nije poznat, akrilamid uglavnom nastaje u Maillardovoj reakciji koja uključuje slobodnu aminokiselinu asparagin i reducirajuće šećere (Tareke i sur., 2002; Mottram i sur., 2002; Eriksson i sur., 2005). Mehanizam nastanka akrilamida ovisi o brojnim čimbenicima poput temperature, pH vrijednosti, udjelu vode i reaktivnosti reaktanata.

### 2.7.1. Glavni putevi nastanka akrilamida

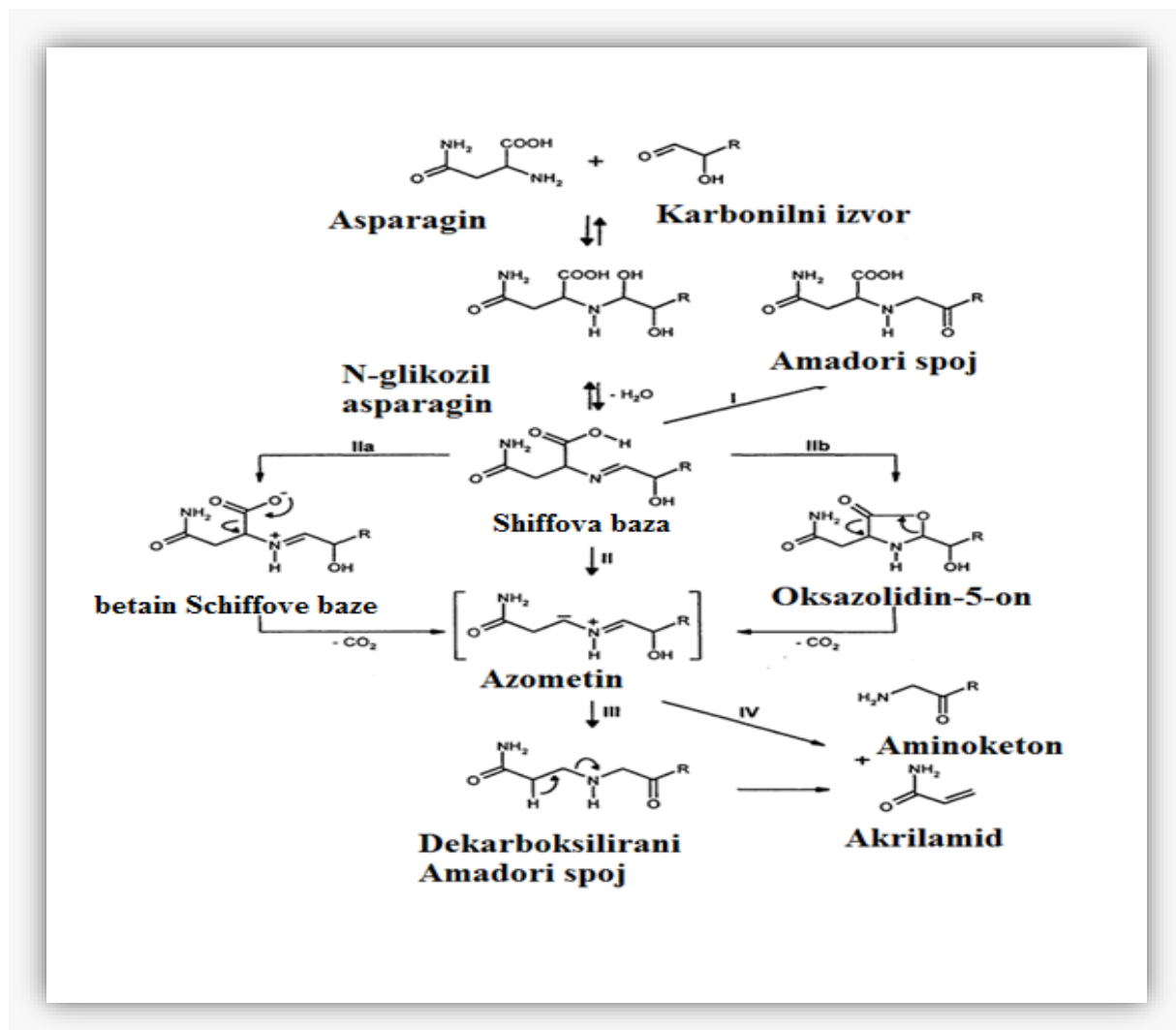
Mottram i suradnici (2002) su Streckerovu razgradnju, odnosno toplinsku degradaciju slobodnog asparagina uz prisustvo šećera predložili kao glavni put nastanka akrilamida. Veliki dio Maillardove reakcije usmjeren je na razgradnju šećera kataliziranu aminokiselinama, a Streckerova razgradnja se može gledati kao razgradnja aminokiseline pokrenuta karbonilnim spojem. Obično se smatra reakcijom između dikarbonilnog spoja u kojem je aminokiselina dekarboksilirana i deaminirana, pri čemu nastaje Streckerov aldehid koji sadrži jedan ugljikov atom manje od izvorne kiseline i  $\alpha$ -aminoketon (Slika 8.). Istraživanja Stadlera i suradnika (2004), a kasnije i Granvogl-a i Schieberle-a (2006) su pokazala da ova vrsta reakcije daje niske prinose akrilamida te je kao glavni put nastanka akrilamida predložen put koji se usredotočuje na razgradnju šećera kataliziranu aminokiselinama (Lineback i sur., 2012).



Slika 8. Reakcije nastanka akrilamida nakon Strecker-ove degradacije asparagina (Keramat i sur., 2011), gdje je R<sub>1</sub>= CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>

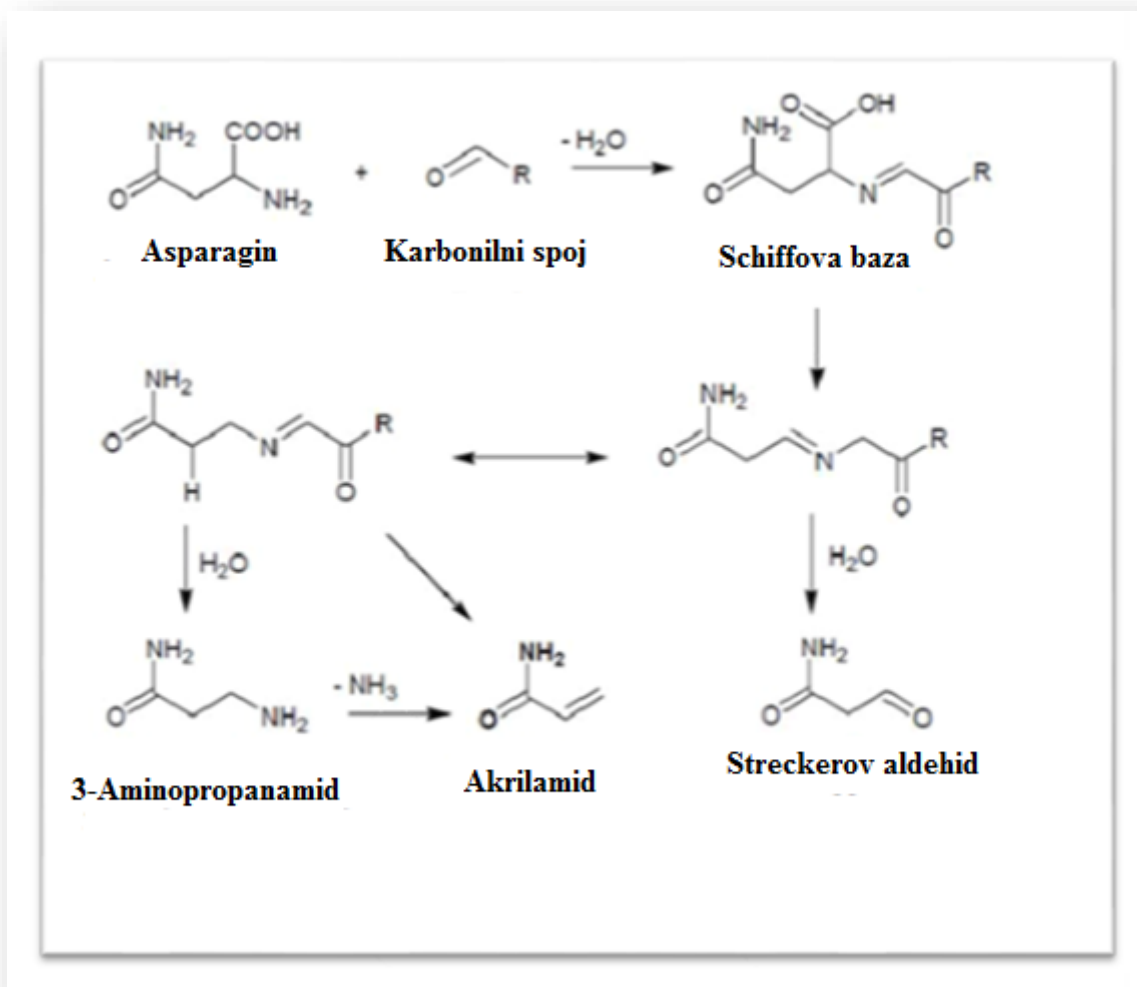
Taeymans i suradnici (2004) kao glavni put nastanka akrilamida spominju Asparagin put (Slika 9.), koji uključuje reakciju karbonilnih spojeva (po mogućnosti  $\alpha$ -hidroksikarbonila) sa asparaginom, što vodi do nastanka N-glikozilasparagina. Adukt, šećer-asparagin generira visoke udjele akrilamida, upućujući na to da je rana Maillardova reakcijaglavni izvor akrilamida. Nakon dehidratacije N-glikozilasparagina previsokim temperaturama, N glikozilnom konjugacijom nastaje Schifova baza. Schifova baza može biti dekarboksilirana direktno ili preko oksozolidin-5-ona do azometina ili može proći transformaciju do Amadori

spoja, koji daju okus i boju proizvoda (Zhang i Zhang, 2007). Akrilamid može nastati direktno iz azometina uz eliminaciju imina, ili dekarboksilacijom Amadori spoja (Slika 9.).



Slika 9. Nastanak akrilamida iz asparagina u prisutnosti  $\alpha$ -hidroksikarbonila (Blank i sur., 2005)

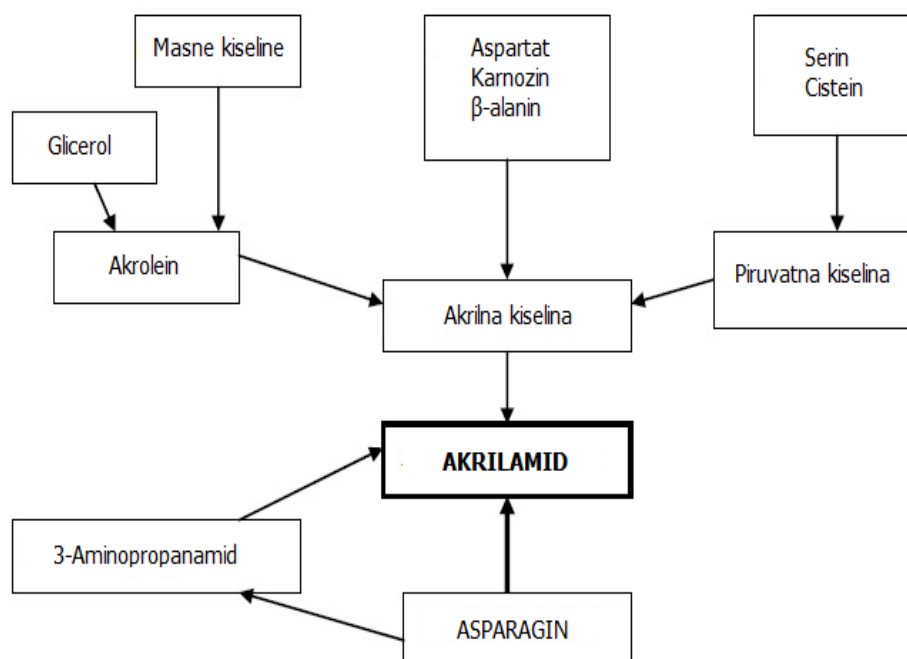
Akrilamid može nastati i indirektno (Slika 10.) ako dekarboksilirana Schifova baza hidrolizira, pri čemu nastaje 3-aminopropanamid (3-APA), koji se dalje razlaže do akrilamida uz eliminaciju amonijaka (Granvogli i Schieberle, 2006).



Slika 10. Nastanak akrilamida indirektnim putem preko 3-APA (Matthaus i Haase,2014)

### 2.7.2. Sporedni putevi nastanka akrilamida

Sporedne reakcije nastanka akrilamida uključuju različite spojeve poput masnih kiselina, aminokiselina, osim asparagina, koji različitim putevima vode do nastanka akrilamida u hrani (Slika 11.).



Slika 11. Sporedni putevi nastanka akrilamida (Eriksson, 2005)

Osim što može biti međuprodukt u Maillardovoj reakciji, 3-APA je prekursor koji otvara mogućnost nastanka akrilamida izvan Maillardove reakcije. Da akrilamid može nastati u velikim količinama i bez interakcija reducirajućih šećera i asparagina, potvrdila su istraživanja Granvogla i suradnika (2004), grijanjem 3-APA u vodenom i suhom mediju. Spoj 3-APA može u sirovoj hrani nastati i enzimskom dekarboksilacijom asparagina uz prisustvo dekarboksilaza (Zhang i Zhang, 2007), ili toplinskom degradacijom asparagina u prisustvu  $\alpha$ -karbonila (Schieberle i sur., 2005; Granvogl i sur., 2004).



U odsustvu reducirajućih šećera, akrolein (2-propenal) i akrilna kiselina (oksidirani akrolein) su jedni od mogućih prekursora za nastanak akrilamida. Akrolein može nastati različitim putovima uključujući oksidacijsku degradaciju lipida, degradaciju ugljikohidrata i proteina putem Maillardove reakcije. Pri toplinskoj obradi lipida mogu nastati veće količine akroleina, koje daljnjim reakcijama mogu dovesti do nastanka akrilne kiseline ili međuprodukata, akrilnih radikala (Keramat i sur., 2011). Pri povoljnim uvjetima i uz prisustvo dušika, oba međuprodukta mogu dovesti do nastanka akrilamida u hrani bogatoj mastima prilikom toplinske obrade. Yasuhara i suradnici (2003) su predložili put nastanka akrilamida tako što akrolein oksidira akrilnu kiselinu i nakon toga reagira s amonijakom dajući akrilamid. Akrolein može reagirati i sa asparaginom pri određenim uvjetima pri čemu mogu nastati značajne količine akrilamida (Stadler i Studer, 2016).

Akrilna kiselina koja ima važnu ulogu u nastanku akrilamida iz akroleina (Yasuhara i sur, 2003) može nastati toplinskom razgradnjom asparaginske kiseline, karnozina i  $\beta$ -alanina (Stadler i sur., 2004). Za pretvorbu akrilne kiseline u akrilamid potrebna je prisutnost amonijaka. Potrebni amonijak može nastati pri toplinskoj obradi. Pirolizom  $\beta$ -alanina nastaje veći dio akrilne kiseline i akrilamida, upućujući na to da je deaminacija glavni put toplinske razgradnje  $\beta$ -alanina. Nastala kiselina tada može reagirati sa dostupnim amonijakom pri čemu nastaje akrilamid (Amrein, 2005).

Dehidracija serina ili cisteina sa ili uz prisustvo šećera može dovesti do nastanka pirogroždane kiseline. Pretvorbom piruvinske kiseline u mliječnu kiselinu i daljnjom dehidracijom u akrilnu kiselinu može nastati akrilamid (Eriksson, 2005).

## 2.8. Prehrambeni unos akrilamida

Toksičnost akrilamida i njegova prisutnost u različitim kategorijama hrane, razlog su zašto mnoge zemlje procjenjuju njegov prehrambeni unos (Pugajeva i sur., 2014). Za odrasle, adolescente i starije osobe procijenjena srednja izloženost se kreće u rasponu od 0.3 to 0.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase/danu, a 95% od 0.6 to 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase/danu, a za potrošače s visokim stupnjem unosa od 1-4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase/danu (EFSA, 2015). Kod djece i mladih izloženost akrilamidu još je i viša u odnosu na odrasle (Dybing i sur., 2005), kada se izrazi putem tjelesne mase i kreće se u rasponu od 0,5-1,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase/danu (EFSA, 2015). Prema prosječnim prehrambenim navikama, ukupan dnevni energetske unos (38%) te potrebni makrohranljivi (36%) i mikrohranljivi (>25%) osiguravaju se uglavnom iz hrane koja sadrži akrilamid (Wilson i sur., 2006). Izloženost prehrambenom unosu akrilamida ovisi o udjelu akrilamida prisutnom u hrani, veličini konzumirane porcije, učestalosti konzumacije kao i o kulinarskim tehnikama te skladištenju hrane (Normandin i sur., 2013). Različite prehrambene navike među različitim populacijama, zemljama, dobu, spolu utječu i na unos akrilamida putem hrane (Virk-Baker i sur., 2014), stoga su i prisutne velike razlike između pojedinih kategorija prehrambenih proizvoda koji doprinose velikom unosu akrilamida (Tablica 5).

Tablica 5. Izloženosti akrilamidu odraslih potrošača ovisno o kategorijama hrane u različitim državama

<i>Država</i>	<i>Kava (%)</i>	<i>Kruh, dvopek, hruskavi kruh (%)</i>	<i>Proizvodi od krumpira i čips (%)</i>	<i>Kolači i krekeri (%)</i>	<i>Žitarice za doručak (%)</i>	<i>Ostalo (%)</i>	<i>Literatura</i>
<i>Nizozemska</i>	18	10	52	20	-	14	Friedman i Levin (2008); Keramat i sur. (2011)
<i>Švedska</i>	40	21,6	42	11	1,5	14,1	Morales i Mesias (2016); Friedman i Levin (2008); Keramat i sur. (2011), Curtis i Halford (2016)
<i>Norveška</i>	29	34,5	30	10,1	1,5	12	Freiselling i sur. (2013); Friedman i Levin (2008); Keramat i sur. (2011)
<i>Njemačka</i>	13	41	48	15	1,2	7,2	Keramat i sur. (2011), Curtis i Halford (2016)
<i>Francuska</i>	28	34,1	9,5	8,2	2,8	0,4	Freiselling, i sur. (2013); Morales i Mesias (2016); Curtis i Halford (2016)
<i>Danska</i>	26,9	50,4	48	5	2,7	0,2	Freiselling i sur. (2013); Granby i sur. (2009)
<i>Grčka</i>	20,1	40,3	13	3,2	0,9	0,2	Freiselling i sur. (2013)
<i>Poljska</i>	27	49	14	6	-	1	Mojska i sur. (2010)

Iz Tablice 5. vidljivo je da određeni prehrambeni proizvodi različito utječu na ukupnu izloženost akrilamidu ovisno o pojedinoj državi, što potvrđuje navode da različite prehrambene navike i kuharska tradicija su važan čimbenik pri procjeni izloženosti akrilamidu putem hrane (Freisling i sur., 2013). Na osnovu pregleda literaturnih podataka vidljivo je da je najveća izloženosti akrilamidu putem kategorija hrane krumpirov čips i pomfrit (do 52% u Nizozemskoj), kruh, dvopek i hruskavi kruh (do 50,4 % u Danskoj) i kava (do 40% u Švedskoj). Rezultati su u skladu s rezultatima Europske Agencije za Sigurnost Hrane (European Food Safety Authority, EFSA), prema kojima proizvodi od prženih krumpira doprinose 49 %, kruh 23%, kolači i krekeri 24% i kava 34 % (EFSA, 2015). Navedeni podaci se odnose na odraslu populaciju.

Za razliku od odraslih, za adolescente i djecu manje je podataka o izloženosti akrilamidu putem hrane, a pregled literarnih podataka prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Izloženosti akrilamidu adolescenata ovisno o kategorijama hrane u različitim državama

<i>Država</i>	<i>Kava (%)</i>	<i>Kruh, dvopek, hruskavi kruh (%)</i>	<i>Proizvodi od krumpira i čips (%)</i>	<i>Kolači i krekeri (%)</i>	<i>Žitarice za doručak (%)</i>	<i>Ostalo (%)</i>	<i>Literatura</i>
<i>Nizozemska</i>	-	10	69	19	-	2	Ötles i Ötles (2004)
<i>Njemačka</i>	13,5	41	45	36	4	5	Friedman i Levin, (2008); Keramat i sur. (2011)
<i>Belgija</i>	-	27	51	25	-	-	Keramat i sur. (2011)

Također je vidljivo da doprinos određenog prehrambenog proizvoda ukupnoj izloženosti akrilamidu varira između različitih država, a najveći doprinos izloženosti akrilamidu kod adolescenata je putem krumpirovog čipsa i pomfrita (do 69% u Nizozemskoj), kruha, dvopeka i hruskavog kruha (do 41% u Njemačkoj) te kolača i krekeri (do 36% u Njemačkoj).

Male razlike unutar određenih kategorija rezultat su razlika u definiranju pojedinih kategorija. EFSA prikuplja podatke od država članica o udjelu akrilamida u prehrambenim proizvodima i godišnje objavljuje dobivene rezultate. Za akrilamid ne postoje zakonski definirane maksimalno dozvoljene koncentracije u pojedinim kategorijama hrane, postoje samo "referentne vrijednosti" odnosno preporuke Europske komisije (EC, 2017/2158 EU). Europska komisija je 2017. godine postavila referentne vrijednosti akrilamida u glavnim prehrambenim proizvodima, na temelju rezultata dobivenih monitoringom (Tablica 7).

Tablica 7. Referentne vrijednosti akrilamida prema Uredbi Komisije EC, 2017/2158/EU

<b>Prehrambeni proizvod</b>		<b>Referentne vrijednosti [<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>]</b>
<b>Pomfrit</b>		500
<b>Čips od svježih krumpira i krumpirovog tijesta Krekeri na bazi krumpira 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>		
	proizvodi od posija i žitarice od cjelovitog zrna,ekspandirane žitarice	300
	proizvodi na bazi kukuruza, zobi, pira, ječma i riže	150
	proizvodi na bazi pšenice i raži	300
<b>Keksi i vafli</b>		350

Prehrambeni proizvod		Referentne vrijednosti [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]
Krekeri osim krekeri na bazi krumpira		400
Hruskavi kruh		350
Medenjaci začinjani đumbirom		800
Proizvodi slični drugim proizvodima iz ove kategorije		300
Pržena kava		400
Instant (topljiva) kava		850
Zamjene za kavu		
(a)	zamjene za kavu isključivo na bazi žitarica	500
(b)	zamjene za kavu isključivo na bazi cikorijske	4000
Dječja hrana, prerađena hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu, osim keksa i dvopeka		40
Keksi i dvopek za dojenčad i malu djecu		150

## 2.9. Smanjenje udjela akrilamida

Prehrambena industrija se suočava sa izazovima vezanim uz modifikaciju procesa pripreme hrane bez utjecaja na kvalitetu proizvoda. Snažni napori na globalnoj razini su poduzeti kako bi se razvila strategija za smanjenje nastanka akrilamida u prehrambenim proizvodima koji izazivaju najviše zabrinutosti. Suradnjom znanstvenika i prehrambene industrije pripremljen je vodič o strategiji smanjenja udjela akrilamida u određenim kategorijama hrane, kojega je sastavila organizacija Food Drink Europe koja zastupa Europsku prehrambenu industriju (FDE, 2013). Izazov za razvoj strategije usmjerene na smanjenje nastanka akrilamida u hrani je velik. S jedne strane treba nastajanje akrilamida u prehrambenom proizvodu svesti na najmanju moguću razinu, a s druge strane zadržati poželjna organoleptička svojstva gotovog proizvoda (Stadler i Struder, 2016). Brojne mjere se koriste za smanjenje udjela akrilamida u različitim prehrambenim proizvodima, a uglavnom su usmjerene na smanjenje nastanka akrilamida tijekom procesa obrade/ pripreme (preventivne mjere) i na uklanjanje ili razgradnju već nastalog akrilamida (strategija uklanjanja) (Anese i sur., 2013).

Zbog toga što je uklanjanje akrilamida iz hrane nepraktično, strategija smanjenja je uglavnom fokusirana na ograničavanje stvaranja akrilamida. Iako potpuna prevencija ili uklanjanje nije moguće, značajno smanjenje udjela akrilamida u hrani se može postići primjenom navedenih mjera.

Preventivne mjere su usmjerene na :

1. odabir sorti voća, povrća i žitarica koje imaju manji udio prekursora akrilamida
2. uklanjanje prekursora prije daljnje obrade (primjenom enzima)
3. optimiranje tehnoloških procesa kako bi se smanjio udio akrilamida (pH vrijednost, temperatura pripreme/obrade, vrijeme obrade i skladištenje)
4. dodatak sastojaka hrane koji sprječavaju nastanak akrilamida (aminokiseline, antioksidansi, soli metala) (Sadd i sur., 2008).

Odabir sorti s niskim udjelom prekursora akrilamida (aminokiselina asparagin i reducirajući šećeri) je jednostavno i učinkovito rješenje za postizanje smanjenja udjela akrilamida u konačnom proizvodu (Xu i sur., 2014). Hrana bogata oboma prekursorima uglavnom je biljnog podrijetla kao što su krumpir i žitarice. Mogućnost uzgajanja žitarica sa niskim udjelom prekursora je ograničena, jer i slobodni asparagin i reducirajući šećeri su esencijalni sastojci u nekoliko biokemijskih puteva. Dok je kod žitarica molarna koncentracija reducirajućih šećera viša u odnosu na asparagin, kod krumpira, asparagin je dominantan u većini slučajeva. To znači da je sadržaj asparagina limitirajući faktor kod žitarica, a kod krumpira reducirajući šećeri (Biedermann i sur., 2002; Tareke, 2003). Unatoč tim ograničenjima, poznato je da količina prekursora varira u određenom opsegu među različitim vrstama krumpira i žitarica, i odabir vrsta sa niskom količinom prekursora može se koristiti pri smanjenju akrilamida (Mestdagh i sur., 2005; Tareke i sur., 2002).

Uklanjanje prekursora prije daljnje obrade uključuje primjenu enzima asparaginaze. Asparaginaza je enzim koji se dobiva iz *Aspergillusoryzae* i ima GRAS status (Generally Recognized As Safe), *Aspergillusniger* i *Bacillus subtilis* (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016). Asparaginaza može selektivno reducirati udio slobodnoga asparagina hidrolizirajući ga do asparaginske kiseline i amonijaka (Ciesarová, 2016) bez nepoželjnog utjecaja na okus i izgled konačnog proizvoda ako se primjenjuje u odgovarajućim koncentracijama (Medeiros Vinci i sur., 2012).

Modifikacija uvjeta obrade može se postići kontroliranjem temperature prženja, vremena, pH vrijednosti, vrste ulja (Zhang i Zhang, 2007). Smanjenje udjela može se postići

snižanjem pH vrijednosti, primjenom produljenog zagrijavanja pri nižim temperaturama, ili pri tlaku nižem od atmosferskog (vakuum prženje). Učinkovitost vakuum prženja ovisit će o sastavu hrane i udjelu vode te prirodi samog spoja (Anese i sur., 2013).

Dodatak različitih aditiva poput antioksidansa, aminokiselina i soli metala je učinkovit način smanjenja udjela akrilamida (Keramat i sur., 2011). Dodani aditivi ne smiju biti toksični i ne smiju djelovati na organoleptička svojstva proizvoda.

## 2.10. Prehrambeni proizvodi s višim udjelom akrilamida

### 2.10.1. Proizvodi od krumpira

Krumpir je jedna od glavnih svjetskih poljoprivrednih kultura koja se svakodnevno konzumira se diljem svijeta. Proizvodi od krumpira uključuju gotove i polugotove proizvode namijenjene za prženje, pečenje ili roštiljanje. Prženi proizvodi od krumpira sadrže visoki udio akrilamida, koji ponekad prelazi i  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Amrein i sur., 2007). Pomfrit kao jedan od najomiljenijih proizvoda pripremljenih od krumpira je ujedno i primarni izvor akrilamida u prehrani. Vrijednosti akrilamida u pomfritu se kreću od 59 do  $5200 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a osim pomfrita visoke vrijednosti akrilamida su određene i u krumpirovom čipsu, i kreću se u rasponu od 117 do  $4215 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Krishnakumar i Visvanathan, 2014). Udio akrilamida u proizvodima od prženog krumpira ovisi o više različitih čimbenika, a to su sirovina, vrsta tla/gnojidba, klimatski uvjeti, skladištenje te uvjeti toplinske obrade. Akrilamid se ne nalazi u sirovom krumpiru ali se u njemu nalaze prekursori važni za nastanak akrilamida (Krishnakumar i Visvanathan, 2014). Gomolji krumpira sadrže značajne količine prekursora akrilamida kao što su slobodni asparagin, glukoza i fruktoza (Zhang i Zhang, 2007). U gomoljima krumpira asparagin je vodeća aminokiselina koja čini 33-59% ukupnih aminokiselina (Lineback i sur., 2012), i njen udio varira od 2 do  $4 \text{ g kg}^{-1}$ , što djelomično objašnjava visoki udio akrilamida u prženim proizvodima od krumpira (Yang i sur., 2016). Udio reducirajućih šećera u krumpiru se kreće od 0,7 do  $3 \text{ g kg}^{-1}$  (Yang i sur., 2016), što bi značilo da su oni limitirajući faktor nastanka akrilamida (Gokmen i Palazoğlu, 2008; Vinci i sur., 2012). Povezanost između koncentracije prekursora i nastanka akrilamida u krumpiru je kompleksna, pri čemu su reducirajući šećeri glavni uzročnici stvaranja akrilamida kod većine, ali i slobodni asparagin doprinosi kod nekih (Muttucumaru i sur, 2017). Eriksson i suradnici (2005) su zaključili da udio reducirajućih šećera određuje udio akrilamida nakon prženja i da se nastanak akrilamida povećava proporcionalno sa količinom reducirajućih šećera, što su kasnije u svojim istraživanjima potvrdili i Amrein i



suradnici (2007). Glavni razlog jest u činjenici da molarna koncentracija asparagina je viša od one reducirajućih šećera i varira manje u usporedbi sa šećerima, kao i činjenici da se reducirajući šećeri troše brže od asparagina tijekom toplinske obrade. Prema Shepardu i suradnicima (2010) asparagin i reducirajući šećeri doprinose otprilike jednako nastanku akrilamida, a Halford i suradnici (2012) tvrde da nastajanje akrilamida u pečenom krumpiru ovisi o količini reducirajućih šećera ukoliko krumpir sadrži veće količine istih, a ukoliko sadrži manje količine reducirajućih šećera količina akrilamida će ovisiti o količini prisutnog asparagina. Na udio prekursora u sirovini, a time i na udio akrilamida u gotovom proizvodu utječu agronomski parametri poput: sorte, gnojidbe, klimatskih uvjeta te skladištenje (Amrein, 2005).

Važnu ulogu kod nastanka akrilamida igra sorta krumpira (Yang i sur., 2016). Udio asparagina i reducirajućih šećera se razlikuje među različitim sortama krumpira (Tablica 8.).

Tablica 8 . Sadržaj prekursora akrilamida u različitim sortama krumpira (Yang i sur., 2016)

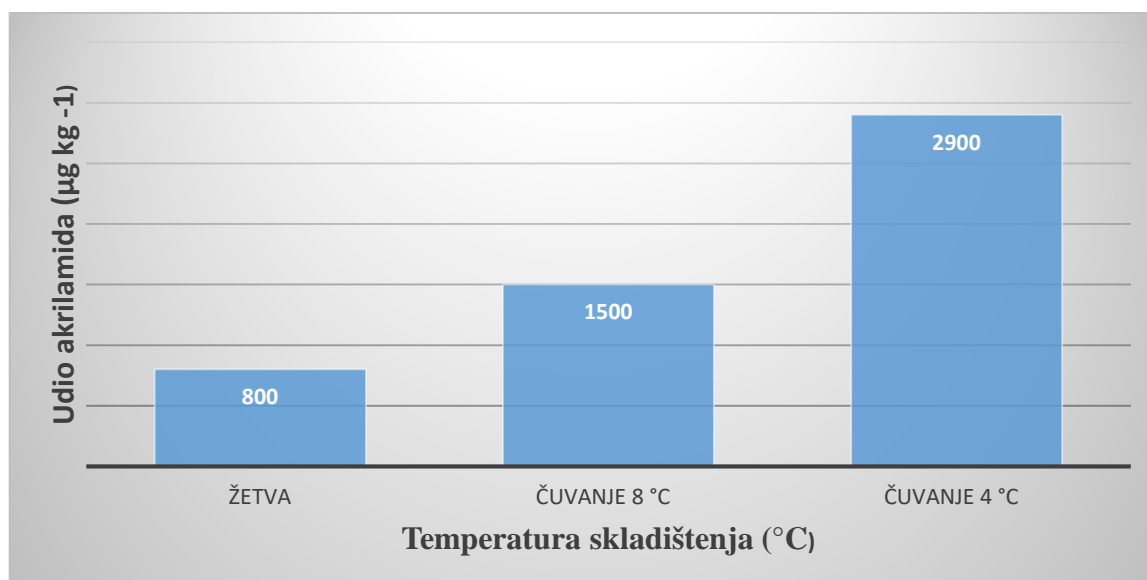
Sorta	Asparagin (g kg <sup>-1</sup> )	Glukoza (g kg <sup>-1</sup> )	Fruktoza (g kg <sup>-1</sup> )
<b>Kennebec</b>	2,03	1,26	0,85
<b>Red Pontiac</b>	2,54	3,14	1,76
<b>Agria</b>	3,21	0,69	0,69

Za komercijalnu proizvodnju prženih krumpira najpoželjnije su sorte krumpira čija se koncentracija reducirajućih šećera kreće ispod  $3 \text{ g kg}^{-1}$  (Yang i sur., 2016). Za proizvodnju pomfrita prikladne su sorte sa velikim dugačkim ovalnim gomoljima koje sadrže umjereno povišenu suhu tvar i nizak udio reducirajućih šećera. Za proizvodnju čipsa preferiraju se sorte s još nižim udjelom šećera, više suhe tvari i srednje veličine ovalnih gomolja (Lineback i sur., 2012).

Vrsta tla i gnojidba također mogu utjecati na udio prekursora akrilamida. Vrsta tla može utjecati na gomolje u smislu kapaciteta zadržavanja vode, drenaže, strukture i sl. Lokacija kultivara ima značajnu ulogu na mineralni sastav gomolja, a time i na udio reducirajućih šećera, koji je negativno povezan sa udjelima kalija i kalcija, a pozitivno sa udjelima cinka i bakra (Medeiros Vinci i sur., 2012). Osim vrste tla, gnojidba može utjecati na sastav gomolja krumpira. Dok primjena dušika povećava količinu asparagina, primjena sumpora smanjuje koncentraciju fruktoze, smanjeni udio dušika pogoduje nastanku šećera, a manjak sumpora dovodi do povećanja količine slobodnog asparagina (Matthäus i Hasse, 2014).

Klimatski uvjeti tijekom rasta gomolja i blizu perioda žetve mogu utjecati na količinu prekursora akrilamida u krumpiru. Rezultati istraživanja De Meulenaer-a i suradnika (2008) su pokazali da sezonske promjene imaju značajan utjecaj na reducirajuće šećere, suhu tvar, ukupne aminokiseline i udio slobodnog asparagina u gomoljima. Kod gomolja koji su rasli za vrijeme toplih ljeta primijećen je nizak udio reducirajućih šećera, koji je u konačnici rezultirao niskim udjelom akrilamida kod prženih proizvoda.

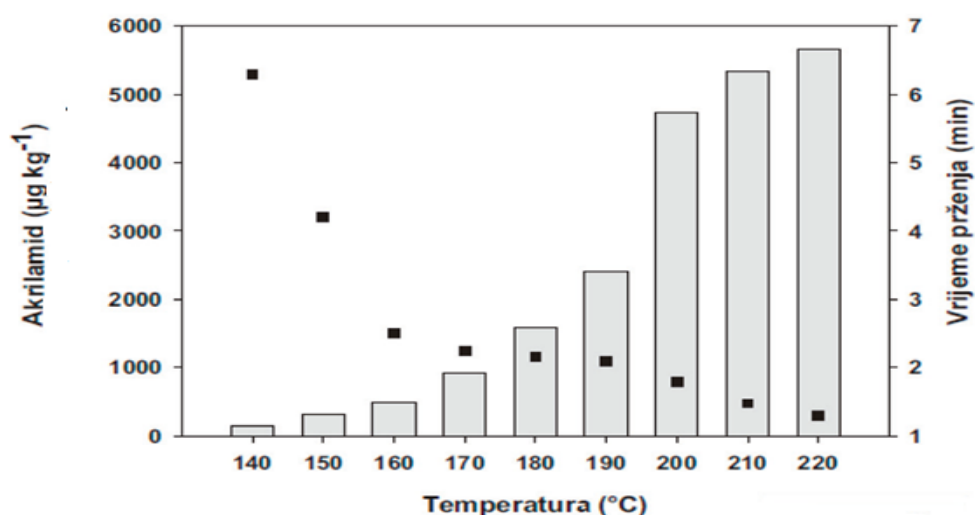
Skladištenje je vrlo važno za kvalitetu krumpira i brojne aspekte obrade i u velikoj mjeri utječe na nastanak akrilamida (Medeiros Vinci i sur., 2012). Gomolji se nakon žetve čuvaju i po nekoliko mjeseci, a niske temperature skladištenja i klijanje glavni su uzrok akumulacije šećera i nastanka akrilamida (Matthäus i Hasse, 2014) (Slika 12.). Da bi se izbjeglo klijanje gomolji se čuvaju pri temperaturi nižoj od  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , što opet pogoduje nakupljanju reducirajućih šećera (De Wilde i sur., 2005; Knutsen i sur., 2009). Gomolje bi bilo idealno čuvati pri temperaturi  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Kumar i sur., 2004). Za razliku od reducirajućih šećera udio asparagina nije osjetljiv na promjene izazvane temperaturom i vremenom čuvanja.



Slika 12. Utjecaj temperature skladištenja na udio akrilamida u konačnom proizvodu (Matthäus i Haase, 2014)

Budući da su prženi proizvodi ukusni i pripremljeni na način koji štedi vrijeme ne iznenađuje previše njihova široka uporaba. Prženjem se komadići hrane uranjaju u vruće ulje (150-190 °C), tako da tijekom ovog procesa istovremeno dolazi do prijenosa topline i mase između ulja i hrane (Hosseini i sur., 2016), pri čemu se razvija boja, tekstura i okus proizvoda. Temperature prženja utječe na udio akrilamida u prženom proizvodu i općenito vrijedi pravilo da se povišenjem temperature prženja povećava i količina nastalog akrilamida (Pedrechi i sur., 2006; Amrein i sur., 2007; Matthäus i Haase, 2014), ali stupanj porasta nije isti za različite sorte krumpira što je opet povezano sa različitim udjelom prekursora (Yang i sur., 2016). Udio akrilamida raste s porastom temperature i vremena prženja, iako količina ostaje relativno niska pri temperaturama do 175 °C, povećanje je izraženo pri višim temperaturama posebice na kraju procesa prženja kako se smanjuje udio vlage u proizvodu (Matthäus i Haase, 2014). Različiti postupci prženja (prženje u dubokom ulju, u klasičnoj pećnici, pećnici na vrući zrak, u mikrovalnoj pećnici), prema istraživanju Giovanelli-a i suradnika (2017), dovode do različitih udjela akrilamida u konačnom proizvodu. Tako su najveći udjeli akrilamida utvrđeni kod krumpira pečenih u mikrovalnoj pećnici (oko 410 µg kg<sup>-1</sup>), a najniži u klasičnoj pećnici (48 µg kg<sup>-1</sup>). Pri prženju se također razvija karakteristična boja, tekstura i okus uzrokovan Maillardovom reakcijom (Medeiros Vinci i sur., 2012). Povezanost boje konačnog proizvoda i udjela akrilamida potvrđena je u brojnim studijama (Pedreschi i sur., 2007; Medeiros Vinci i sur., 2012; Zhang i sur., 2015). Intenzivniji uvjeti prženja dovode do tamnije boje proizvoda i višeg udjela akrilamida. Povećanje udjela akrilamida sa povišenjem temperature slijedi eksponencijalnu funkciju, što upućuje na to da i male razlike u temperaturi prženja mogu imati velike posljedice

za nastanak akrilamida. Rezultati Carrieria i suradnika (2009) potvrđuju prethodno dobivene rezultate Pedreschia i suradnika (2006) o značajnom povećanju udjela akrilamida i uz minimalno povećanje temperature (10%). U njihovim istraživanjima udio akrilamida u prženom krumpiru iznosio je  $800 \mu\text{g kg}^{-1}$  pri  $170 \text{ }^\circ\text{C}$ , odnosno  $3700 \mu\text{g kg}^{-1}$  pri  $190 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Slika 13. Utjecaj temperature i vremena prženja na udio akrilamida u prženom krumpiru (Matthäus i Haase, 2014)

Vrsta ulja za prženje također može utjecati na udio nastalog akrilamida. Ulja se razlikuju prema koeficijentu provodljivosti topline. Prženjem u ulju sa većim koeficijentom provodljivosti topline stvara se deblja korica na prženim krumpirima a upravo u njoj se nalazi najveći udio akrilamida (Zhang i sur., 2015). Istraživanja o utjecaju vrste ulja na nastanak akrilamida dovela su do različitih rezultata. Mathaus i suradnici (2004) nisu pronašli povezanost između utjecaja ulja i nastanka akrilamida u konačnom proizvodu, a Becalski i suradnici (2003) su pokazali da prženje u maslinovom ulju rezultira većim udjelom akrilamida u usporedbi sa prženjem u kukuruznom ulju.

Mehanički postupci obrade krumpira mogu utjecati na udio nastalog akrilamida u prženom krumpiru. Budući da se akrilamid formira u površinskom dijelu proizvoda od krumpira, veličina i oblik proizvoda utječu na konačni udio akrilamida. Veličina porcije utječe na temperaturu i vrijeme koje je potrebno da se dobije proizvod optimalne kvalitete. Rezanje

tanjih i manjih komada rezultirat će većim udjelom akrilamida nakon prženja i obrnuto (Mathauus i sur., 2004)

Reducirajući šećeri su jedan od ključnih reaktanata za nastanak akrilamida, stoga je kontrola reducirajućih šećera uz kontrolu procesnih parametara primarna mjera za smanjenje udjela akrilamida u krumpirovom čipsu i pomfritu. Što se tiče kontrole razine šećera treba voditi računa o agronomskim mjerama kao što su odabir sorte krumpira, pridržavanje dobre agronomске prakse, zrelosti gomolja u vrijeme žetve, kontroli uvjeta skladištenja gomolja od polja do prerade (Keramat i sur., 2011; FDE, 2013), ali ne smiju se zanemariti ni okolišni uvjeti kao što su klimatski uvjeti, lokacija rasta i sl. Za kontrolu procesnih parametara mogu se koristiti fizičke i kemijske metode.

Fizičke metode kontrole procesnih parametara uključuju:

- a) predobradu kod proizvodnje pomfrita
- b) modifikacija uvjeta toplinske obrade
- c) snižavanje pH
- d) povećanje aktivnosti vode
- e) rezanje krumpira na odgovarajući način

Kemijske metode kontrole procesnih parametara uključuju primjenu:

- a) aditiva
- b) aminokiselina
- c) organskih kiselina
- d) asparaginaze
- e) soli metala

Odabir sorti s niskim udjelom glukoze i fruktoze u sirovim krumpirima je nužan za napraviti gotovi proizvod s niskim udjelom akrilamida (Yang i sur., 2016). Važno je uzgajati sorte s niskim udjelom šećera pridržavajući se dobre agronomске prakse.

Da bi dobili gotovi proizvod dobrih organoleptičkih svojstava udio šećera ne smije biti manji od 0,2 g kg<sup>-1</sup>. Kada gomolji krumpira nisu još zreli, količina šećera preseljena iz lišća do gomolja prelazi razinu šećera pretvorenog u škrob (De Wilde i sur., 2006), stoga je važno birati zrelije gomolje. Sorte krumpira s velikim, dugim i ovalnim oblicima sadrže niži udio reducirajućih šećera i veći sadržaj suhe tvari, pa su i prikladnije za prženje u trakama (Yang i sur., 2016). Prema tome, odabir ispravne veličine gomolja može imati važnu ulogu u snižavanju razine akrilamida nakon naknadnog zagrijavanja. Važnu ulogu u smanjenju udjela reducirajućih šećera ima i vrsta gnojidbe. Umjerenjena dušična gnojidba kombinirana sa dobrom opskrbom kalijem može rezultirati niskim udjelom reducirajućih šećera i asparagina u gomoljima (Medeiros Vinci i sur., 2012).

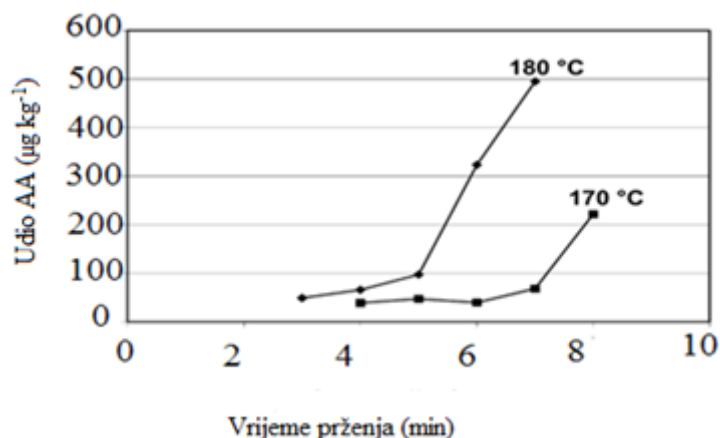
Skladištenje krumpira je neophodno kako bi se omogućila opskrba krumpirima tijekom cijele godine. Iako skladištenje krumpira pri nižim temperaturama ima niz prednosti poput manjeg gubitka mase, sprječavanja klijanja, dovodi i do neželjenog porasta koncentracije reducirajućih šećera. Stoga kako bi se spriječilo obogaćivanje reducirajućim šećerima važna je kontrola uvjeta skladištenja, pri čemu se preporučuje skladištenje pri temperaturi od 8-10 °C i pri relativnoj vlažnosti 85-90% (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016.).

Predobrada krumpira koja uključuje blanširanje sirovih krumpira nije uobičajena radnja u proizvodnji npr. čipsa, i kao takvo može imati nepoželjne utjecaje na teksturu i okus prženog proizvoda (Lineback i sur., 2012), ali je jako važno kod proizvodnje pomfrita. Blanširanjem se uklanjaju prekursori poput reducirajućih šećera prije prženja što u konačnici doprinosi smanjenju udjela akrilamida (Krishnakumar i Visvanathan, 2014), ali i ostale komponente topive u vodi poput vitamina (Matthäus i Hakrilamidse, 2014), pa treba voditi računa o kvaliteti končanog proizvoda. Na blanširanje utječu i količina i temperatura vode (Mestdagh i sur., 2005) kao i vrijeme trajanja postupka (Rydbergi sur., 2005). Blanširanje u toploj vodi se pokazalo učinkovitijim u ekstrakciji glukoze i asparagina u odnosu na uranjanje u hladnu vodu (Rydberg i sur., 2005). Tijekom blanširanja enzimi su inaktivni i stvara se sloj želatinoznog škroba koji smanjuje apsorpciju ulja i poboljšava teksturu (Shojaee-Alibadi i sur., 2013). Smanjenje apsorpcije ulja u prženim krumpirima nakon blanširanja pripisuje se također aktivaciji enzima pektin metil esteraze i želatinizaciji škroba, što za posljedicu ima smanjenje poroznosti koje vodi do smanjenja apsorpcije ulja.

Budući je namjera blanširanja inaktivacija različitih enzima, postoji veliki raspon temperatura i vremena koji se mogu primijeniti kako bi se postigao konačni cilj. Blanširanje doprinosi i jednoličnoj boji konačnog proizvoda. Za razliku od blanširanja sirovog tkiva koje

se primjenjuje za stabiliziranje pigmenata, kod blanširanja krumpira koji se prže, razvoj boje se poboljšava s duljim vremenom uranjanja (Agblor i Scanlon, 2000), stoga je važno uskladiti temperaturu i vrijeme procesa, kako bi se dobio konačni proizvod poželjnih senzorskih svojstava. Mestdagh i suradnici (2008) su pokazali smanjenje udjela akrilamida za 65 i 96% za pomfrit i krumpirov čips nakon blanširanja.

Uvjeti toplinske obrade snažno utječu na nastanak akrilamida u konačnom proizvodu, kao i na razvoj boje, teksture i okus konačnog proizvoda, stoga modifikacija uvjeta toplinske obrade je jedan od načina smanjenja udjela akrilamida u konačnom proizvodu. Prženje pri nižim temperaturama (140 °C) rezultira u produljenju vremena prženja i povećava unos masnoća (Foot i sur., 2007) i na taj način se dobije proizvod nepoželjnih organoleptičkih svojstva. Arias Mendes i suradnici (2013) su pokazali kako korištenje više-stupanjskog pristupa procesu obrade, sa različitim temperaturnim zonama tijekom prženja može dovesti do dobrog balansa između količine akrilamida u konačnom proizvodu i senzornih svojstava. Kod modifikacije uvjeta toplinske obrade najvažnije je završiti prženje na vrijeme, budući se akrilamid stvara na kraju prženja. Snižavanjem temperature kada je udio vlage nizak pri kraju prženja moguće je potaknuti reakcije posmeđivanja, dok bi se za to isto vrijeme ograničio nastanak akrilamida. Razlog tome je što pri niskom udjelu vlage (<20%) pri kraju obrade, energija aktivacije potrebna za nastanak akrilamida je viša od energije aktivacije potrebne za proces posmeđivanja (Matthäus i Haasse, 2014). Temperatura na kraju prženja ovisi o početnoj temperaturi, masi narezanog krumpira po litri ulja i opremi za prženje (Rydberg i sur., 2005). Pedreschi i suradnici (2006) su u svom radu pokazali da snižavanjem početne temperature ulja sa 180 °C na 170 °C, nastaje pomfrit sa nižim udjelom akrilamida (Slika 14.).



Slika 14. Udio akrilamida u pomfritu pri različitim početnim temperaturama ulja i vremenu prženja (Pedreschi i sur. 2006)

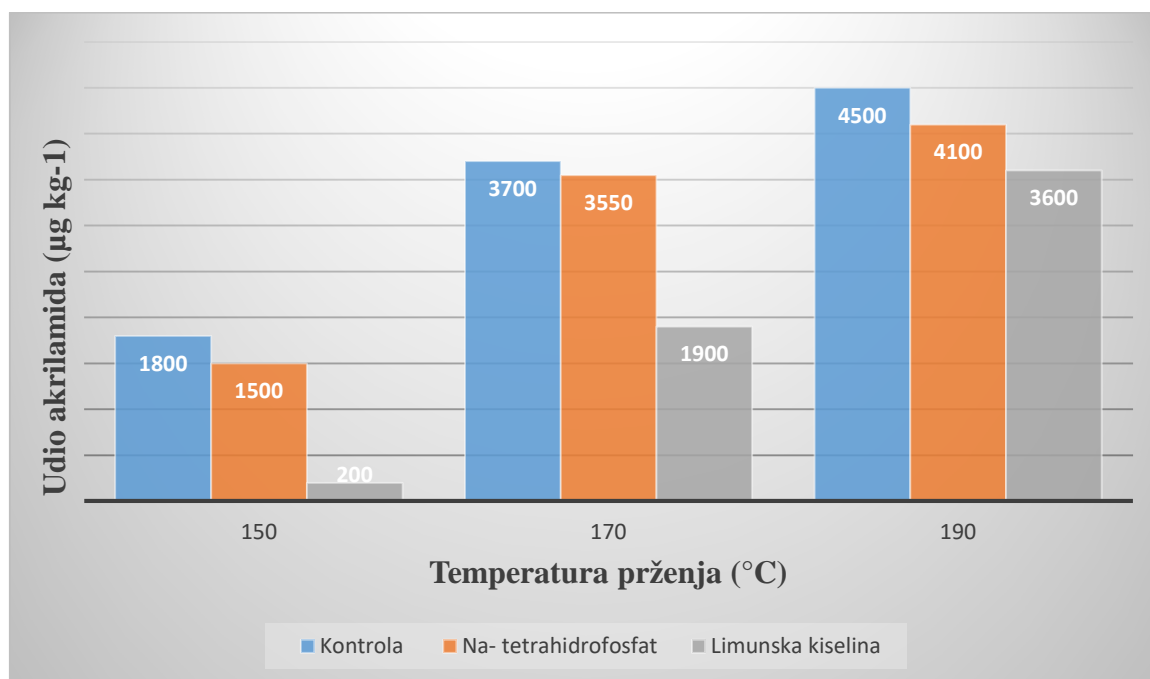
Snižavanjem pH usporava se Maillardova reakcija te se na taj način utječe na udio akrilamida u konačnom proizvodu. Friedman i Levin (2008) su pokazali na primjeru krumpirovog čipsa kako smanjenje pH ispod 6, uklanjanjem u kiseli pufer dovodi do smanjenja udjela akrilamida.

Aktivitet vode u hrani igra značajnu ulogu u smanjenju nastanka akrilamida. Akrilamid nastaje u hrani kada je aktivitet vode niži od 0,8 (Krishnakumar i Visvanathan, 2014). Uklanjanje akrilamida iz npr. krumpirovog čipsa se povećava sa povećanjem aktiviteta vode. Sadd i suradnici (2008) su pokazali kako se povećanjem aktiviteta vode sa 0,64 na 0,95 udio uklonjenog akrilamida povećava za 20 puta.

Rezanje krumpira na deblje komade preporučuje se u cilju smanjenja razine akrilamida u prženom krumpiru budući da se na taj način povećava odnos volumen-površina. Unutrašnjost debljih komada zagrijava se sporije a time se usporava i nastanak akrilamida (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016).



Dodatak aditiva poput organskih kiselina i Ca-soli u krumpir može biti direktno, uranjanjem u otopinu ili špricanjem otopine (Friedman, 2003). Najčešće korišteni aditivi u industriji obrade krumpira su natrij pirofosfat i dekstroza. Natrij pirofosfat se dodaje kako bi se smanjilo tamnjenje narezanih krumpira, dok se dekstroza dodaje jer doprinosi jednoličnoj boji proizvoda (Rydberg i sur., 2005). Organske kiseline se također koriste kao aditivi za smanjenje udjela akrilamida u krumpiru. Bilo koji tretman s kiselinom snižava pH vrijednost hrane a time i nastanak akrilamida, jer dolazi do usporavanja Maillardove reakcije, što potvrđuju i rezultati Pedreschia i suradnika (2006), koji su postigli smanjenje udjela akrilamida za 86% uranjanjem narezanog krumpira u otopinu limunske kiseline u usporedbi s natrij-pirofosfatom (30%) pri istoj temperaturi. Učinkovitim u smanjenju nastanka akrilamida se pokazao i dodatak ružmarina u ulje za prženje kod krumpira, koji je doveo do smanjenja udjela akrilamida i do 25% (Claus i sur., 2008). Dodatak aminokiselina kao što su glicin, alanin i lizin također snižava udio akrilamida u krumpiru. Razlog tome je što se dodane aminokiseline natječu u reakciji sa reducirajućim šećerima i na taj način smanjuju udio akrilamida (Friedman, 2015). Antioksidansi poput ekstrakta bambusovog lišća i soli metala poput  $\text{CaCl}_2$  također su se pokazali učinkovitim u smanjenju nastanka akrilamida (Zhang i Zhang, 2007).



Slika 15. Udio akrilamida u kontrolnom uzorku, i uzorku uronjenjem u  $10 \text{ g L}^{-1}$  limunske kiseline i Na-tetrahidrofosfata (Pedreschi i sur., 2006)

Primjena enzima asparaginaze na proizvode od krumpira koji se sastoje od čvrstih, rezanih komada je kompleksnija zbog manjeg optimalnog kontakta između enzima i substrata (Hendriksen i sur., 2009). Iz tog razloga se za bolji kontakt preporučuje blanširanje. Rezultati

istraživanja su potvrdili da namakanje blanširanih štapića krumpira u otopinu asparaginaze smanjuje razinu akrilamida za 90% tijekom procesa prženja (Pedreschi i sur., 2011). Optimalan pH za aktivnost asparaginaze je između pH 6 i 7 (Medeiros Vinci i sur., 2012), međutim, može se koristiti i u nešto širem rasponu, i to od pH 5 do 8, za proizvode od krumpira kao što su pomfrit i čips (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016).

Iako su brojni naponi uloženi kako bi se pronašle mjere za smanjenje nastanka akrilamida, iz podataka monitoringa u organizaciji EFSA-e u periodu od 2007-2010, i podataka iz 2015 godine (Tablica 9.) za kategorije hrane krumpirov čips i pomfrit vidljivo je kako nije došlo do značajnog smanjenja udjela akrilamida.

Tablica 9. Udio udjela akrilamida u proizvodima na bazi krumpira (EFSA, 2012; EFSA, 2015)

Prehrambeni proizvod	godina	Sv ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	P <sub>95</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Max ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	n (broj uzoraka)
<b>Pomfrit (gotov za jelo)</b>	2007	356	1114	2668	648
	2008	277	767	2466	563
	2009	324	900	338	501
	2010	338	1024	2174	256
	2015	308	904	-	1378
<b>Krumpirov čips</b>	2007	551	1589	1200	293
	2008	580	830	1298	532
	2009	639	2125	1514	414
	2010	675	2080	1538	242
	2015	654	2050	-	-

Sv-srednja vrijednost mjerenja

P95-95 percentilna razina onečišćenja

### 2.10.1.1. Inovativne procesne tehnike

Osim prethodno navedenih mjera usmjerenih na smanjenje udjela prekursora u sirovom krumpiru i udjela akrilamida u prženim proizvodima od krumpira, mogu se primjenjivati i novije tehnike toplinske predobrade i obrade krumpira.

Budući da blanširanjem dolazi do ispiranja prekursora akrilamida, ovisno o stupnju ispiranja koji se želi postići, a s obzirom na udio akrilamida u konačnom proizvodu sam proces blanširanja može biti dugotrajan. Odabir najboljih parametara za blanširanje prije toplinske obrade krumpira nije lagan zadatak, obzirom da primjena različitih temperatura i vremena može značajno utjecati na kvalitetu konačnog proizvoda. Primjena visokih temperatura (85-95 °C) daje bolje rezultate po pitanju učinkovitosti denaturacije enzima, ali vrijeme blanširanja mora biti skraćeno kako bi se izbjeglo omekšavanje tkiva, što smanjuje kvalitetu teksture prženog proizvoda (Agblor i Scanlon, 2000) i dovodi do veće apsorpcije ulja (Mariotti i sur., 2015). Blanširanje pri nižim temperaturama (50-65 °C) nije optimalan izbor, budući da primjena niskih temperatura neće u potpunosti uništiti endogene enzime, a i sami proces dulje traje. S druge strane prema istraživanjima Pedereschi-a i suradnika (2009) kod proizvodnje čipsa, niska temperatura i dugo vrijeme blanširanja doveli su do očuvanja boje i smanjene apsorpcije ulja. Primjena blage do visoke temperature (50-90 °C) kod blanširanja krumpira bi trebala biti dovoljna da se postigne zadovoljavajuće smanjenje udjela akrilamida (Mestdagh i sur., 2008 b), međutim primjena blagih do visokih temperatura može trajati 20 i više minuta, ovisno o primjenjenoj temperaturi. Kako bi se izbjegli navedeni problemi postoji nekoliko tehnoloških rješenja koja se mogu kombinirati s blanširanjem u svrhu smanjenja udjela akrilamida u konačnom proizvodu. Jedno od jednostavnijih rješenja je namakanje odnosno ispiranje. Namakanje odnosno ispiranje u kombinaciji s blanširanjem je jednostavan postupak čijom primjenom dolazi do većeg smanjenja udjela akrilamida u konačnom proizvodu u odnosu na samo blanširanje (Pedreschi i sur., 2011). Međutim kako bi se dodatno skratilo trajanje samog procesa u vodu za blanširanje ili u vodu za uranjanje nakon blanširanja mogu se dodavati različiti aditivi poput organskih kiselina, soli i aminokiselina.

Dodatak kiselina u vodu za blanširanje dovodi do snižavanja pH što za posljedicu ima smanjenje udjela akrilamida (Mestdagh i sur., 2008 c; Vinci i sur., 2011), ali treba voditi računa o koncentraciji takve otopine, jer više koncentracije kiselih otopina utječu na senzorska svojstva konačnog proizvoda i dovode do velikog broja nesukladnih uzoraka (Vinci i sur., 2011). Konvencionalna industrijska proizvodnja pomfrita uglavnom uključuje blanširanje i naknadno uranjanje u otopinu kiselog natrij pirofosfata (SAPP, anorganska sol). SAPP se koristi kako bi se izbjeglo tamnjenje blanširanih krumpira (Camire i sur., 2009; Vinci i sur., 2012), ali zabilježen je i njegov pozitivan utjecaj na smanjenje udjela akrilamida u takvim proizvodima (Fiselier i sur., 2005; Vinci i sur., 2011). U svrhu smanjenja udjela akrilamida u proizvodima od krumpira istraživana je i utjecaj natrij klorida (Pedreshi i sur., 2010) i kalcij klorida (Ou i sur., 2008; Mestdagh i sur., 2008a). Iz presjeka tih istraživanja vidljivo je da dodatak soli dovodi do značajnog smanjenja udjela akrilamida u konačnom proizvodu (>60 %), s tim da primjena soli treba biti kontrolirana zbog utjecaja na senzorska svojstva proizvoda. Primjena aminokiselina u kombinaciji s blanširanjem također dovodi do smanjenja udjela akrilamida u prženim proizvodima od krumpira (Brathen i sur., 2005; Ou i sur., 2008). Blanširanje se obično provodi pri atmosferskom tlaku vrućom vodom ili parom, pri temperaturi 90-95 °C, 1-2 minute (Smith, 2011). Blanširanje vrućom vodom se najčešće primjenjuje, a nakon njega blanširanje vrućim zrakom koje zahtjeva 75-90% manji utrošak energije (Wang, 2008). Uporaba pare umjesto vruće vode samo je jedan od mnogih potencijalnih napredaka u tehnologiji blanširanja. Ostale tehnologije uključuju dodavanje različitih aditiva u vruću vodu, korištenje ultrazvuka, mikrovalova, radiofrekvencije i omsko zagrijavanje (Xin i sur., 2015). Prednosti ovih postupaka su minimalna toplinska oštećenja, homogenost tretmana kao i niske energetske potrebe.

Primjena kemijskih tretmana u kombinaciji sa blanširanjem je poželjna, što se posebno ističe kod smanjenja unosa ulja prženih proizvoda. Blanširanje štapića krumpira u 0,5% otopini  $\text{CaCl}_2$  i uranjanje u 1% vodenu otopinu karboksimetil celularnog hidrokoloidea (Rimac Brnčić i sur., 2004), kao i u 0,1% otopinu askorbinske kiseline (Reis i sur., 2008) dovelo je smanjenja apsorpcije ulja u prženim proizvodima.

Ultrazvučno blanširanje ubraja se u netoplinke postupke blanširanja jedna je od tehnika koja se opsežno proučava zadnjih deset godina, posebno njen utjecaj na hranu. Korištenje ultrazvuka osim što smanjuje količinu toplinske energije potrebnu za toplinske tretmane, poboljšava i prijenos topline. Tehnologija se bazira na primjeni frekvencija između 20 i 100 kHz, snage između 10 i 1000 W cm<sup>-2</sup>, što za posljedicu ima generiranje vibracija za proizvodnju kavitacije pri čemu dolazi do oštećenja staničnih zidova u hrani s visokim udjelom vlage (Richter Reis, 2017). O frekvenciji i intenzitetu ultrazvučnih valova, viskoznosti, površinskoj napetosti i gustoći proizvoda te temperaturi, tlaku i vlažnosti okoline ovisi sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije (Brnčić i sur., 2009). Kao posljedica djelovanja kavitacijskih mjehurića stvaraju se mikrokanalići u tretiranom materijalu, kroz koje se lakše izdvaja vlaga tijekom sušenja. Različita istraživanja (Cruz i sur., 2007; Alexandre i sur., 2011; Day i sur., 2012) dovela su do zaključka da primjena ultrazvučnog blanširanja samog ili u kombinaciji sa drugim toplinskim načinima obrade je učinkovit način za povećanje trajnosti proizvoda i očuvanje kvalitete, bez degradacije pigmenta, što rezultira više očuvanim proizvodom. Obrada ultrazvukom se uglavnom odvija pri sobnoj temperaturi, što doprinosi očuvanju nutritivnih sastojaka (Yolmeh i sur., 2015). Prema istraživanjima Amarala i suradnika (2016) ultrazvučno blanširanje doprinosi i poboljšanju senzorskih značajki prženih proizvoda.

Mikrovalno blanširanje je još jedna opsežno proučavana tehnologija, koja predstavlja prednost kod brzog zagrijavanja hrane. Kod primjene mikrovalnog blanširanja dolazi do ravnomjernije raspodjele temperature u usporedbi s konvencionalnim. Također dolazi do transfera vlage iz unutrašnjosti prema površini, što ograničava porast temperature na površini uzorka i stvara poteškoće kod stvaranja kore koja bi bila barijera isparavanju vode, i u konačnici skraćuje vrijeme toplinske obrade (Tuta i sur., 2011). Mikrovalovi prodiru i apsorbiraju se prije svega u prehrambenim proizvodima, a njihova penetracija je limitirana i prosječno iznosi od 1 do 2 cm pri 2450 MHz za prehrambene proizvode. Zbog ograničenog energetskog potencijala ne uzrokuju promjene u kemijskoj strukturi tvari. Kod primjene mikrovalova treba biti pažljiv jer brzo zagrijavanje može dovesti do gorenja hrane. Prema Ranjan i suradnicima (2016) mikrovalno blanširanje zagrijava materijale koji imaju dielektrična svojstva, i stoga je poznavanje dielektričnih svojstava hrane ključni čimbenik pri blanširanju mikrovalovima. Dielektrična svojstva hrane tijekom mikrovalnog blanširanja su masa, oblik, udio vode, kemijski sastav, položaj orijentacije proizvoda, frekvencija primjenjenog izmjeničnog polja, gustoća, struktura i temperatura. Uslijed djelovanja mikrovalova dolazi do polarizacije molekula hrane, što dovodi do međusobnog trenja molekula i razvoja topline. To je posebno

izraženo kod namirnica koje sadrže dosta vode, stoga su te namirnice i pogodnije za mikrovalnu obradu. Prema istraživanju Severini-a i suradnika (2005) mikrovalno blanširanje kockica krumpira u odnosu na uobičajeno blanširanje rezultiralo je dobivanjem proizvoda bolje boje. Također, rezultati istraživanja Severini-a i suradnika (2016) dobiveni usporedbom blanširanja brokule vrućom vodom, parom i direktno mikrovalovima pokazuju veću uspješnost mikrovalnog blanširanja i blanširanja parom kod inaktivacije enzima, kao i veću očuvanost vitamina C primjenom mikrovalnog blanširanja.

Istraživanja Bernáš-a i Jaworskog (2014) dobivena usporedbom klasičnog blanširanja i mikrovalnog blanširanja na uzorcima gljiva, dovela su do zaključka kako mikrovalno blanširanje pozitivno djeluje na očuvanje suhe tvari, Vitamina B1 i B2, zajedno s inaktivacijom enzima, dok konvencionalno blanširanje se pokazalo uspješnijim kod očuvanja boje gljiva.

Mikrovalno i radiofrekvencijsko zagrijavanje razlikuju se u valnim duljinama i frekvencijama. Za radiofrekvencijsko zagrijavanje u industrijske svrhe koriste se frekvencije u rasponu od 10-50 MHz. Radiofrekvencijsko zagrijavanje ima veću valnu duljinu i nižu frekvenciju od mikrovalnog zračenja, te prema tome elektromagnetski valovi prodiru u proizvod puno dublje, bez rizika za stvaranja manje ili jače zagrijanih područja koja se pojavljuju kod mikrovalnog zagrijavanja (Marra i sur., 2008.).

U usporedbi s konvencionalnim načinom blanširanja, ohmsko blanširanje omogućuje brzo i ravnomjerno zagrijavanje, a u isto vrijeme smanjuje toplinska oštećenja namirnica zbog odsustva vruće površine koja je u direktnom kontaktu s hranom. Ohmsko blanširanje se temelji na prolazu električne energije (niskofrekventne izmjenične struje: 50 ili 60 Hz) kroz prehrambeni proizvod koji služi kao vodič elektriciteta, pri čemu se on brzo i ravnomjerno zagrijava (Chen i sur., 2010). Učinkovitost ohmskog zagrijavanja u velikoj mjeri ovisi o električnoj provodljivosti hrane.

Iako je primjenom klasičnog načina prženja krumpira u dubokom ulju, uz optimiranje procesnih parametara moguće djelovati na smanjenje nastanka akrilamida, pronalazak odgovarajućih načina toplinske obrade koji će dovesti do smanjenja udjela akrilamida i zadržati poželjna senzorska svojstva proizvoda od velike je važnosti. Istraživanja Giovanelli-a i suradnika (2017), pokazala su kako primjena različitih postupaka prženja (prženje u dubokom ulju, u klasičnoj pećnici, pećnici na vrući zrak, u mikrovalnoj pećnici), dovodi do različitih udjela akrilamida u konačnom proizvodu. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju kako su

najveći udjeli akrilamida utvrđeni kod krumpira prženih u mikrovalnoj pećnici (oko 410  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najniži u klasičnoj pećnici (48  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Primjena vakuum prženja pokazala se učinkovitim metodom za smanjenje udjela akrilamida. Granda i Morera (2005) su u svojim istraživanjima postigli smanjenje udjela akrilamida i do 94% primjenom vakuumskog prženja. Loša strana ovakvog načina prženja je povećani udio masti, pa je potrebno primijeniti odmašćivanje (Matthäus i Haase, 2014).

Za razliku od vakuum prženja, prženje u struji vrućeg zraka je tehnika koja omogućuje redukciju masti u prženom proizvodu, i to za 90% (Sansano i sur., 2015), te se stoga smatra zdravijom alternativom prženju u dubokom ulju. Tehnika se sastoji od direktnog kontakta između proizvoda i kapljica raspršenog ulja u komori za prženje. Nastali proizvod je dehidriran, a kora koja je karakteristična za prženi proizvod pojavljuje se postupno. Prema rezultatima istraživanja Sansano i suradnika (2015), primjena prženja u struji vrućeg zraka bez prethodne predobrade pokazala se uspješnom u smanjenju udjela akrilamida u prženim proizvodima od krumpira.

## 2.10.2. Proizvodi na bazi žitarica

Proizvodi na bazi žitarica obuhvaćaju veliku i raznoliku kategoriju proizvoda sa mnogo sastojaka, procesa, recepata i različitih operacija. Prema Pravilniku o žitaricama i proizvodima od žitarica (NN 81/16), proizvodi od žitarica su proizvodi dobiveni daljnjom obradom ili preradom očišćenih žitarica, a namijenjeni su za daljnju proizvodnju i/ili za krajnjeg potrošača. S obzirom na namjenu, sastav, osobine i vrste tehnološkog procesa razvrstavaju se na:

1. Mlinske proizvode (prekrupa, krupica i brašno)
2. Gotove proizvode od žitarica (žitne pahuljice i instant žitarice)
3. Mješavine za pekarske proizvode
4. Pekarske proizvode od tijesta (kruh, peciva, tjestenina)
5. Fine pekarske proizvode i srodne proizvode keksi, krekeri, vafli, medenjaci, hruskavi kruh, kolači i sl.)

Što se tiče izloženosti udjelu akrilamida važni su pekarski proizvodi, fini pekarski proizvodi i gotovi proizvodi od žitarica (Zhang i Zhang, 2007).

Pekarski proizvodi čine velik kategoriju različitih proizvoda kojima je osnova za proizvodnju brašno od žitarica. Razlike u proizvodima rezultat su različitih omjera sastojaka

koji se koriste u proizvodnji i različitim metoda pripreme koje se primjenjuju. Udio akrilamida u pekarskim proizvodima može varirati od nezamijećene količine kao npr. u krušnim mrvicama, niskih udjela u kruhu i pecivima ( $5$  do  $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), izuzetak je hruskavi kruh koji sadrži značajne udjele akrilamida ( $<30$  do  $2085 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) pa do više od  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$  u krekerima i kolačima (Mesias i Morales, 2016). Iako kruh sadrži relativno male udjele akrilamida zbog velike konzumacije jedan je od glavnih doprinositelja unosu akrilamida putem prehrane. Većina akrilamida nalazi se u kori kruha (Surdyk i sur., 2004), a u unutrašnjosti ga gotovo i nema (Şenyuva i Gökmen, 2005).

U kategoriji gotovi proizvodi od žitarica, žitarice za doručak daju značajan doprinos unosu akrilamida putem prehrane u zapadnim zemljama. Izrađuju se različitim procesima kojima je zajedničko da se žitarice kuhaju u vodi, u većini slučajeva sa dodatkom šećera, pri čemu nastaje masa koja se onda može oblikovati u pojedinačne komadiće žitarica. Ti komadići se tada peku kako bi se razvio tostirani okus (Taeymans i sur., 2004). Udio akrilamida u žitaricama za doručak kreće se od  $5$ - $846 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Claus i sur., 2008).

Na udio akrilamida u proizvodima od žitarica utječu:

### **1. Sirovina**

Kruh, kolači, peciva i biskviti se uglavnom rade od pšenice, kukuruza, raži, ječma i ostalih žitarica koje se melju u brašno, koje se onda transformira u tijesto. U proizvodima od žitarica koncentracija reducirajućih šećera je znatno viša od koncentracije slobodnog asparagina (Keramat i sur., 2011), što znači da je udio asparagina limitirajući faktor za nastanak akrilamida (Claus i sur., 2008). Brašno je obično glavni izvor asparagina, ali i ostali sastojci poput orašastih plodova, začini i med također doprinose u određenom udjelu (Arvanitoyannis i Dionisopoulou, 2014). Asparagin se smatra kritičnim faktorom u proizvodnji proizvoda od žitarica, a studije u model sistemima i različiti proizvodi od žitarica pokazuju da je količina asparagina u zrnu direktno povezana sa količinom akrilamida u konačnom proizvodu (Surdyk i sur., 2004; Levine i Smith, 2005). Za razliku od dodatka asparagina, provedena istraživanja o dodavanju šećera u smjesu za proizvodnju pekarskih proizvoda daju vrlo različite rezultate. Istraživanja Surdyka i suradnika (2004) su pokazala da dodatak fruktoze pšeničnome kruhu ne utječe na promjenu udjela akrilamida u konačnom proizvodu. Taeymans i suradnici (2004) su pokazali da dodatak glukoze, fruktoze i saharoze podjednako doprinosi nastanku akrilamida, dok su Gökmen i suradnici (2007) dobili gotovo dvostruko veće količine akrilamida u kolačićima kada su udio saharoze povećali sa  $10$  na  $35$  grama. Asparagin se akumulira u svim žitaricama tijekom normalnog fiziološkog procesa, kao što je klijanje sjemena i transport dušika, i kao odgovor na



vanjske utjecaje uzrokovane npr. nedostatkom minerala (Hamlet i sur., 2008). Tijekom zrenja koncentracija slobodnog asparagina ne raste jer je on inkorporiran u proteine, dok klijanje može dovesti do povećane količine slobodnog asparagina i šećera. Iz svega navedenog vidljivo je da je udio prekursora u sirovom materijalu pod utjecajem različitih čimbenika. Neki od njih koji najviše utječu na udio prekursora, a time i na udio akrilamida u konačnom proizvodu su:

- a.) vrsta žitarice/brašna
- b.) stupanj ekstrakcije brašna
- c.) godina žetve
- d.) obrada tla (gnojidba)
- e.) klijanje

Udio slobodne aminokiseline asparagin razlikuje se od žitarice do žitarice, od brašna do brašna (Tablica 10.).

Tablica 10. Količina asparagina prisutna u različitim vrstama žitarica i njihovim frakcijama

Žitarica	Asparagin (g kg <sup>-1</sup> )	Literatura
<b>Pšenično zrno</b>	0,19-0,374	Ciesarova, 2016; Hamlet i sur., 2008
<b>Pšenične mekinje</b>	0,911-1,48	Ciesarova, 2016; Hamlet i sur., 2008
<b>Pšenične klice</b>	4,9	Hamlet i sur., 2008
<b>Pšenično brašno</b>	0,115-0,5;	Ciesarova, 2016; Hamlet i sur., 2008, Stadler, 2006
<b>Cjelovito pšenično brašno</b>	0,255-0,45	Hamlet i sur., 2008; Capuano i sur., 2009
<b>Zobeno zrno</b>	0,055-1,40	Ciesarova, 2016; Mustatea i sur., 2015
<b>Zobeno brašno</b>	0,50	Ciesarova, 2016
<b>Kukuruzno brašno</b>	0,6-1,07	Stadler, 2006
<b>Raženo zrno</b>	1,07	Ciesarova, 2016
<b>Raženo brašno</b>	0,32-0,88	Mustatea i sur., 2015
<b>Ražene mekinje</b>	3,0	Mesias i Morales, 2016
<b>Cjelovito raženo brašno</b>	1,1	Stadler, 2006
<b>Rižino zrno</b>	0,23	Ciesarova, 2016
<b>Rižino brašno</b>	0,015-0,075	Mustatea i sur., 2015
<b>Pirovo brašno</b>	0,15-0,6	Amrein, 2007

Koncentracija slobodnog asparagina varira u žitaricama zbog promjena u agronomskim i okolišnim uvjetima (Hamlet i sur., 2008), ali općenito gledano ražena brašna sadrže više asparagina od ostalih brašna. Isto tako brašna od cjelovitog zrna pokazuju višu količinu asparagina u odnosu na prosijana. Najviši udio asparagina je u pšeničnoj klici, što je razumljivo, budući da klijanjem zrna dolazi do degradacije škroba i proteina pri čemu se oslobađaju prekursori akrilamida (Mesias i Morales, 2016). Capuano i suradnici (2009) su objavili kako brašna koja imaju visoku nutritivnu vrijednost (poput raženog) zbog visokog udjela prehrambenih vlakana i pepela mogu rezultirati u većoj koncentraciji akrilamida. Pryzgodzka i suradnici (2015) su pokazali kako stupanj ekstrakcije brašna također utječe na udio akrilamida u konačnom proizvodu. Udio asparagina u pšeničnom brašnu sa 70% učinkovitošću ekstrakcije je iznosio  $0,78 \text{ g kg}^{-1}$ , a sa 100% ekstrakcije  $3,2 \text{ g kg}^{-1}$ , u raženom brašnu  $3,22 \text{ g kg}^{-1}$  sa 70% ekstrakcije do  $7,11 \text{ g kg}^{-1}$  sa 100 % ekstrakcije. Razlog tome leži u činjenici da se količina aminokiselina i šećera u brašnu povećava sa stupnjem ekstrakcije tijekom mljevenja i uključenosti vanjskih slojeva zrna (Mesias i Morales, 2016). Sukladno tome prosijano brašno ima niži udio asparagina, dok mekinje imaju daleko viši (Tablica 10).

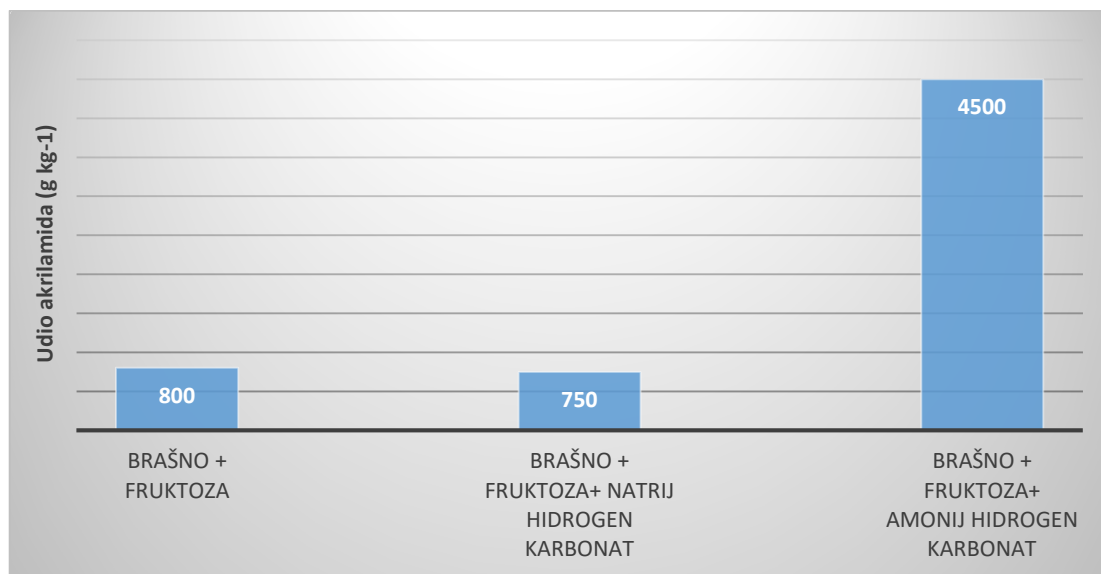
Zbog različitih vremenskih prilika (temperature i vlažnosti), godina žetve igra važnu ulogu na utjecaj asparagina u žitaricama. Suša i visoke temperature doprinose povećanju udjela asparagina, a na kraju i udjela akrilamida u konačnim proizvodima (Konings i sur., 2007).

Claus i suradnici (2006) pokazali su kako primjena dušičnih gnojiva značajno povećava količinu asparagina u pšeničnom zrnu, a time i udio akrilamida u proizvodima od žitarica, ali ne utječe na reducirajuće šećere u pšenici, za razliku od krumpira. Što se tiče sumpornih gnojiva rezultati su različiti. Muttucumaru i suradnici (2006) su utvrdili smanjenje udjela asparagina kada se koristi sumporno gnojivo, a to su kasnije potvrdili i Granvogl i suradnici (2007). Za razliku od njih Claus i suradnici (2006B) nisu uočili povezanost sumporne gnojidbe i udjela asparagina u pšenici.

Klijanje žitarica kao posljedica nepovoljnih vremenskih uvjeta također može u konačnici dovesti do povećanja udjela slobodnog asparagina, a na taj način i do povećanog udjela akrilamida u konačnom proizvodu (Claus i sur., 2008).

## 2. Utjecaj Recepta

Recepti i sastojci igraju važnu ulogu u nastanku akrilamida. Različiti sastojci imaju različite količine prekursora akrilamida koji onda mogu sudjelovati u Maillardovoj reakciji. Osnovni sastojci pekarskih proizvoda su brašno, sol, voda, kvasac i sredstvo za dizanje tijesta. Ovisno o recepturi mogu biti prisutni i drugi sastojci poput masti, ulja, sladila, jaja, med, orašastiplodovi, suho voće, začini i sl. (Mesias i Morales, 2016). Najveći doprinos ukupnom udjelu asparagina daju brašno, orašasti plodovi, med i suho voće. Orašasti plodovi, poput badema značajno doprinose udjelu akrilamida u konačnom proizvodu. Prženi bademi su važan izvor asparagina, a njegov udio se kreće od 445 do 3463  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Amrein, 2005). Osim orašastih plodova i suho voće može imati značajne udjele asparagina. Ozolina i suradnici (2011) su zaključili da suho voće značajno doprinosi udjelu akrilamida u konačnom proizvodu. Razlog tome je visok udio asparagina koji u suhim kruškama može biti i preko 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a u suhim šljivama 270  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Amrein, 2007). Masti i ulja se dodaju u recepte kako bi se poboljšala senzorna i reološka svojstva proizvoda, a istraživanja o utjecaju vrste ulja na udio akrilamida su različita. U istraživanjima Capuano i suradnika (2009), viši udjeli akrilamida su dobiveni kada je korišteno suncokretovo ulje, a niži su dobiveni s palminim uljem. Sredstva za dizanje tijesta se dodaju kako bi se inkorporirali plinovi u pečene proizvode, u svrhu postizanja oblika i volumena. Za podizanje tijesta koriste se kvasci i kemijska sredstva. Kvasac je odgovoran za fermentaciju u tijestu, u kojoj se šećeri pretvaraju u  $\text{CO}_2$  i alkohol. Uporaba kemikalija kao sredstava za podizanje tijesta se smatra bržom i učinkovitijom u odnosu na kvasce (Mesias i Morales, 2016). Najčešće korištene kemikalije u proizvodnji pekarskih proizvoda su natrij hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) i amonij hidrogenkarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), s tim da  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  potiče nastanak akrilamida (Slika17.), na način da potiče fragmentiranje šećera a time i nastanak glioksala i gliceraldehida koji formiraju više akrilamida u reakciji s asparaginom (Amrein i sur., 2004; Amrein, 2005).



Slika 16. Utjecaj sredstava za podizanje tijesta na udio akrilamida (Amrein, 2005)

### 3. Utjecaj procesnih parametara (ili utjecaj toplinske obrade)

Visoke temperature pečenja i nizak udio vlage u pekarskim proizvodima odgovorni su za niz kemijskih reakcija koje utječu na kvalitetu gotovog proizvoda. Dok udio akrilamida kod suhih žitarica doseže maksimum između 180-200 °C nakon čega opada, udio akrilamida u kruhu raste linearno sa vremenom i temperaturom (Claus i sur., 2008). Ključni faktor u senzorskoj kvaliteti pekarskih proizvoda je boja površine (kore) gotovog proizvoda (Pedreschi i sur., 2006). Osim povezanosti sa senzorskim značajkama gotovih proizvoda postoji velika povezanost između boje kore gotovog proizvoda i udjela akrilamida, posebno pri temperaturama iznad 200 °C (Keramat i sur., 2011). Surdyk i suradnici (2004) pokazali su da se više od 99% akrilamida nastalog tijekom pečenja kruha nalazi u kori kruha. Kora kruha nastaje kada je temperatura površine preko 100 °C, pri čemu dolazi do dehidracije. Brathen i Knutsen (2005) su pronašli da odnos kore kruha prema cijelom kruhu i njegova debljina i boja odgovaraju količini nastalog akrilamida, što je u skladu sa istraživanjima Açar i Gökmena (2009) koja ukazuju da manja debljina kore pekarskog proizvoda upućuje i na manji sadržaj akrilamida u proizvodu. Na udio akrilamida osim temperature i vremena utječe i sam prijenos topline (vrsta pećnice). Claus i suradnici (2008) su ispitali utjecaj različitih vrsta pećnica na prijenos topline i nastanak akrilamida. Veći udio akrilamida pronađen je u proizvodima pečenim u konvencionalnim pećnicama u odnosu na palubne. Objašnjenje su pronašli u činjenici što prisilna cirkulacija zraka vodi do bržeg i intenzivnijeg sušenja kore kruha što potiče nastanaka akrilamida.

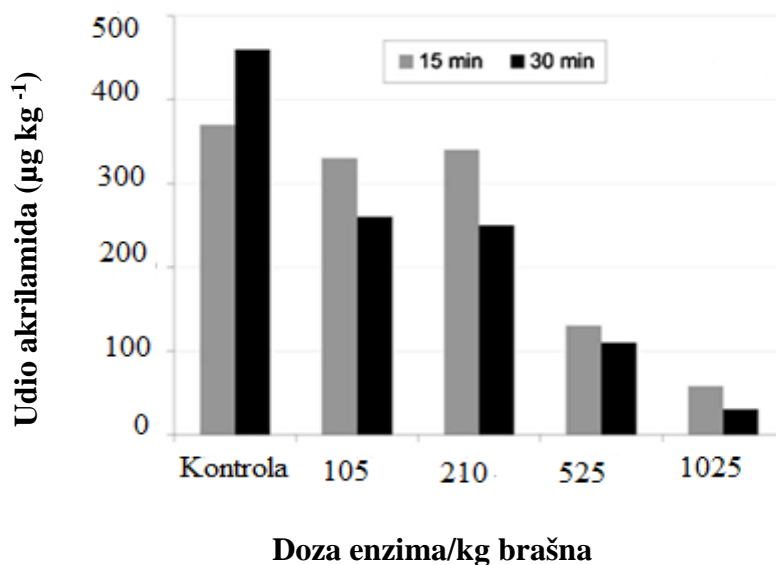
Većina mjera za smanjenje udjela akrilamida u ovoj raznolikoj kategoriji usmjerena je na:

- a) Agronomske parametre, odnosno odabir vrsta žitarica koje sadrže niske udjele prekursora akrilamida
- b) Recepte (uporaba odgovarajućih sredstava za dizanje tijesta, modifikacija receptata ili produljivanje trajanja fermentacije, dodatak enzima i dodatak sastojaka hrane za koje je poznato da sprječavaju nastanak akrilamida poput aminokiselina, antioksidansa, proteina, soli metala i sl.)
- c) Kontroliranje uvjeta toplinske obrade (kontroliranje temperature, vremena, pH i udjela vlage) (Curtis i Halford, 2016).

Zbog razlike u količini slobodnog asparagina unutar iste vrste žitarica i između različitih vrsti, odnosno zbog uzroka tih varijacija (vrsta zrna, sorta, uvjeti rasta, klimatski uvjeti) nemoguće je proizvesti pšenicu ili bilo koju drugu žitaricu sa kontrolirano niskim razinama asparagina (FDE, 2013). Da bi se smanjio udio akrilamida u proizvodima od žitarica treba koristiti brašna koja u startu imaju niži udio asparagina (Tablica 10), pri tome vodeći računa o nutritivnim vrijednostima proizvoda i njegovim karakteristikama (Amrein i sur., 2007). Kao jedna od agronomskih mjera preporučuju se i kontroliranje razine sumpora u tlu. Prema istraživanju Muttucumaru i suradnika (2006) ključni aspekt smanjenja udjela akrilamida bilo bi izbjegavanje nedostatka sumpora tijekom kultiviranja pšenice, budući da smanjeni udio sumpora u tlu tijekom uzgoja žitarica uzrokuje značajno povećanje koncentracije asparagina u zrnu i visoki udio akrilamida u brašnu (Kunkulberga i sur., 2014).

Jedna od metoda smanjenja nastanka akrilamida je uklanjanje prekursora u sirovinama. Vrsta šećera koje se koristi u receptima predstavlja polaznu točku za smanjenje udjela akrilamida. Glavni izvori glukoze i fruktoze u slatkim pekarskim proizvodima su med, invertni šećerni sirup i karamel bojanje (Amrein, 2007). Zamjenom ovih sastojaka npr. korištenjem otopine saharoze, moguće je postići smanjenje udjela akrilamida za više od 50% (Friedman, 2015).

Osim šećera, sol kao važan sastojak pekarskih proizvoda ima inhibicijski učinak na nastanak akrilamida (Claus i sur., 2008). Kod dodavanja soli treba biti pažljiv, kako zbog konačnog okusa proizvoda tako i zbog činjenice da visoke koncentracije soli značajno povećavaju udio akrilamida, vjerojatno zbog inhibicije rasta kvasaca (Keramati i sur., 2011). Jedan od načina uklanjanja prekursora je i dodavanje kvasca u smjesu. Kvasci koriste šećere i asparagin kao svoju „hranu“ i na taj način uklanjaju prekursore (Sakrilmidd i sur., 2008), čime se smanjuje udio nastalog akrilamida. Granby i suradnici (2008) su pokazali da fermentacija kvascem pšeničnog kruha smanjuje nastanak akrilamida i do 80%. Budući da se često kao sredstva za podizanje tijesta koriste kemijska sredstva, strategija smanjenja udjela akrilamida je usmjerena i na zamjenu  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  kao praška za pecivo s  $\text{NaHCO}_3$  (poznatijim kao soda bikarbona) (Lineback i sur., 2012). Amrein i suradnici (2004) su na primjeru medenjaka začinenih đumbirom postigli smanjenje udjela akrilamida za više od 60% kada je  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  zamijenjen s  $\text{NaHCO}_3$ , ali udvostručenje koncentracije  $\text{NaHCO}_3$  nije dovelo do daljnjeg smanjenja udjela akrilamida. Osim navedenih vrsta fermentacije, i lakto-fermentacija koja se koristi kod tehnologije kiselog tijesta dovodi do smanjenja udjela akrilamida, vjerojatno zbog snižavanja pH vrijednosti (Claus i sur., 2008). Osim vrste fermentacije važna je i duljina trajanja fermentacije. Udio akrilamida u konačnom proizvodu razlikovat će se od 60-90% ovisno o trajanju fermentacije (Fredriksson i sur., 2004). Do smanjenja slobodnog asparagina može doći i dodatkom enzima kao što je asparaginaza. Primjena asparaginaze se pokazala kao jedno od najučinkovitijih sredstava za smanjenje udjela akrilamida u proizvodima od žitarica. Smanjenje udjela za čak 35-90% korištenjem asparaginaze postignuto je za različite proizvode od žitarica (uključujući kreker, hruskavi kruh i kolače) (Rad Curtis 2016). Učinkovitost asparaginaze u tijestu ovisit će o količini dodanog enzima, udjelu vlage i trajanju termičke obrade. Anese i suradnici (2011) su došli do zaključka da veći udio vlage u tijestu potiče rad asparaginaze tako što su prekursori mobilniji, a prisutnost masti smanjuje učinak. Isto tako veći udio dodanog enzima, uz optimum od 500-1000 U (Amrein i sur., 2007), i dulji kontakt enzima sa substratom dovodi do većeg smanjenja nastanka akrilamida u konačnom proizvodu (Slika 17.) (Mesias i Morales, 2016).



Slika 17. Utjecaj asparaginaze na sadržaj akrilamida (a) u keksima (Hendriksen i sur., 2009)

Dodatak drugih aminokiselina, poput glicina, pokazao se uspješnim u smanjenju udjela nastalog akrilamida (Friedman i Levin, 2008), i to od 73-96% (Xu i sur., 2014). Razlog tome je kompetitivno djelovanje glicina, pri čemu dolazi do smanjenja nastajanja akrilamida (nastaju drugi spojevi). Vežanje asparagina, dodatkom divalentnih metalnih kationa je još jedna od mjera koja se pokazala uspješnom u smanjenju udjela nastalog akrilamida (FDE, 2013). Razlog tome je što metalni kationi snižavaju pH vrijednost i na taj način usporavaju Maillardovu reakciju. Dodatkom divalentnih kationa poput  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$  u tijesto prije pečenja može se postići smanjenje u količini nastalog akrilamida od 20 do 60% (Keramat i sur., 2011). Različiti aditivi poput antioksidansa i organskih kiselina se također mogu koristiti kao jedna od mjera za smanjenje nastanka akrilamida u konačnom proizvodu. Kod dodatka aditiva važnu ulogu igra količina dodanog aditiva. Antioksidansi iz zelenog čaja, lišća bambusa (Zhang i Zhang., 2007) i vodenog ekstrakta ružmarina (Hedega i sur., 2008) u provedenim istraživanjima doveli su i do smanjenja udjela akrilamida za više od 60%. Organske kiseline poput limunske, tartarske i kloridne, mogu dovesti do smanjenja nastanka akrilamida (Keramat i sur., 2011). Kod dodavanja organskih treba biti oprezan jer može doći do razvoja kiselog okusa proizvoda, a može izostati i posmeđivanje proizvoda (Amrein, 2007).

Kontroliranjem tehnoloških faktora poput pH vrijednosti, temperature, vremena i udjela vlage, djeluje se na put nastanka akrilamida, a time i na udio akrilamida u gotovom proizvodu. Snižavanje pH vrijednosti i temperature koja se koristi pri toplinskoj obradi, skraćivanje vremena toplinske obrade i veći udio vlage u proizvodu mogu dovesti do smanjenja udjela

akrilamida (Claus i sur., 2008). Keramat i suradnici (2011) su u svom istraživanju pokazali kako optimiranje uvjeta pečenja može dovesti do smanjenja nastanka akrilamida i do 50%, a produljeno zagrijavanje pri nižim temperaturama je još jedna pogodna mjera za smanjenje udjela akrilamida (Claus i sur., 2008). Alternativne tehnike pečenja poput pečenja infracrvenim zrakama ili pečenje s parom, dovode do nižeg udjela akrilamida u gotovom proizvodu, ali negativno utječu na nastanak boje i formiranje okusa (Friedman, 2015), stoga se ne preporučuju. Količina vode u proizvodu može imati inhibitorni ili ubrzavajući utjecaj na Maillardovu reakciju. Taeymans i suradnici (2004) su u svojim istraživanjima došli do zaključka da povećanje udjela vlage u konačnom proizvodu (sa 2% na 10%) smanjuje udio akrilamida u konačnom proizvodu za 10 puta. Iako ove metode postižu učinkovito smanjenje nastajanja akrilamida, pojedine specifične senzorske značajke proizvoda mogu biti narušene (Xu i sur., 2014).

Napori uloženi kako bi se udio akrilamida smanjio doprinijeli su smanjenju udjela akrilamida u proizvodima na bazi žitarica (Tablica 11), a najveće smanjenje uočeno je u kategoriji hrane "meki kruh" i "prerađena hrana na bazi žitarica za djecu".



Tablica 11. Udio akrilamida u proizvodima od žitarica (EFSA, 2012; EFSA, 2015)

Prehrambeni proizvod	godina	Sv ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	P <sub>95</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Max ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	n (broj uzoraka)
Meki kruh	2007	75	310	1778	176
	2008	53	264	565	259
	2009	46	140	1460	182
	2010	30	94	425	150
	2015	40	137	-	535
Žitarice za doručak	2007	149	420	1600	144
	2008	155	520	2072	166
	2009	139	414	1435	191
	2010	138	353	1290	174
	2015	113	348	-	561
Keksi, krekeri, hruskavi kruh i sl.	2007	326	1235	1290	174
	2008	272	967	3307	898
	2009	247	876	4095	964
	2010	333	1337	5849	462
	2015	264	1077	-	1974
Prerađena hrana na bazi žitarica za djecu	2007	119	440	1215	170
	2008	69	255	1200	194
	2009	72	222	710	153
	2010	51	250	470	128
	2015	103	200	-	394

### 2.10.3. Kava i zamjene za kavu

Kava je zajedno sa čajem među najpopularnijim napicima u svijetu, prvenstveno zbog svoje arome i okusa. Iako u svijetu postoji više od 80 sorti kave, dvije sorte su važne s ekonomske točke gledišta. To su sorte Arabica i Robusta, s tim da sorta Arabica je na tržištu zastupljena i do 70%, a ostatak je sorta Robusta (Farah, 2012). Kava se prži pri visokim temperaturama, od 220-250 °C (Zhang i Zhang, 2007), a vrijeme i brzina prženja igraju važnu ulogu za senzorna svojstva kave, kao što su aroma, boja i okus. Tijekom prženja zelenih zrna kave, razvija se tamno smeđa, skoro crna boja, aroma od arome zelenog graha prelazi u aromu svježje pržene pa čak i zapaljene note. Razlog tome su različiti monomerni i polimerni spojevi koji nastaju tijekom Maillardove reakcije i reakcije pirolize ugljikohidrata (Bagdonaite i sur.,

2008). Određivanje udjela akrilamida u kavi je od velike važnosti budući je to napitak koji se svakodnevno konzumira diljem svijeta, i značajno doprinosi ukupnom prehrambenom unosu akrilamida (Tablica 5.). Zbog eventualnog štetnog učinka kofeina, mnogi zamjenski bezkofeinski proizvodi su razvijeni. Kod bezkofeinskih proizvoda kao glavna sirovina koristi se ječam, prženi korijen cikoriije i pržena raž (Anese, 2016). Kava i zamjene za kavu, pripremaju se kuhanjem prženih zrna kave ili drugih zamjenskih sastojaka. Stupanj ekstrakcije akrilamida iz kave u vodu ovisit će o temperaturi vode, kontaktnom vremenu između kave i vode i primjenjenom pritisku, a sve skupa ovisi i o aparaturi za pripremu kave (Mesias i Morales, 2016). Tijekom pripreme kave skoro sav akrilamid prisutan u prahu kave prelazi u tekuću fazu napitka kave, zbog velike topljivosti akrilamida u vodi (Andrezejewski i sur., 2004). Ekstrakcija se povećava sa porastom temperature vode i kontaktnog vremena, i kreće se u rasponu od 92-99% (Alves i sur., 2010) ovisno o sorti kave. U usporedbi sa ostalim prženim ili pečenim proizvodima, pržena kava zapravo sadrži relativno niske udjele akrilamida. Udio akrilamida u prženoj mljevenoj kavi se kreće od 197-256  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Mesias i Morales, 2016), a u instant kavi je veći i kreće se od 229-1123  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (EFSA, 2012). Udio akrilamida u zamjenama za kavu ovisi o vrsti početne sirovine. U zamjenama za kavu na bazi cikoriije udio akrilamida može biti veći i od 4000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Anese, 2016).

Na udio akrilamida u kavi i zamjenama za kavu utječu:

### ***1. Sirovina***

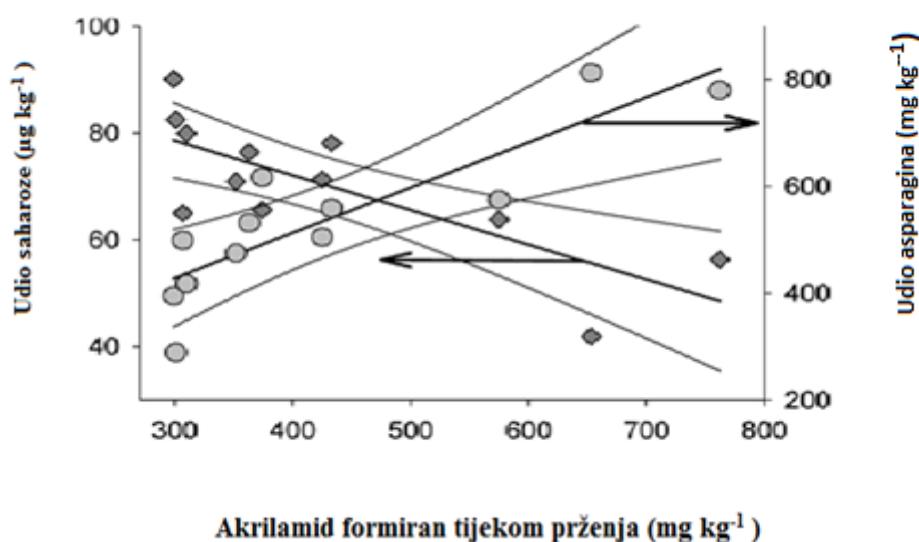
Opseg nastanka akrilamida ovisit će o početnoj koncentraciji prekursora i njihovom omjeru u zelenim zrnima kave, odnosno o vrsti sirovine. Osim vrste sirovine na udio prekursora u sirovom materijalu utječu i sorta kave, porijeklo kao i uvjeti skladištenja.

Kava je bogata aminokiselinama asparagin i alanin, a njihov udio ovisi o sorti kave (Arvanitoyannis i sur., 2013). Osim aminokiselina, u kavi je i velik udio saharoze (Tablica 12). Tijekom prženja kave saharoza se razgrađuje na reducirajuće šećere fruktozu i glukozu (Xu i sur., 2014). Lantz i suradnici (2006) su zaključili da Robusta sorte kave sadrže veće udjele slobodnog asparagina u odnosu na Arabica sorte, a time i veće udjele akrilamida nakon prženja.

Tablica 12. Udio asparagina i saharoze u različitim sortama kave (Bagdonaite i sur., 2008)

Sorta kave	Asparagin ( $mg\ kg^{-1}$ )	Saharoza ( $mg\ kg^{-1}$ )
<i>Robusta</i>	800	50
<i>Arabica</i>	500	80

Asparagin je u kavi prisutan u većoj količini u odnosu na saharozu, i stoga je on limitirajući faktor za nastanak akrilamida u kavi (Anese, 2016). Pozitivna korelacija između nastanka akrilamida i koncentracije asparagina je pronađena kako za kavu, tako i za zamjenske proizvode na bazi cikorijske (Mesias i Morales, 2016). Bagdonaite i suradnici (2008) su u svom radu pokazali da je količina nastalog akrilamida u kavi proporcionalna količini prisutnog asparagina, a obrnuto proporcionalna količini saharoze (Slika 18.).



Slika 18. Ovisnost nastanka akrilamida o količini saharoze i asparagina u kavi (Bagdonaite i sur., 2008), gdje je  $\blacklozenge$  udio saharoze, a  $\blacklozenge$  udio Asparagina ( $\mu g\ kg^{-1}$ )

Osim sorte kave, na udio nastalog akrilamida u konačnom proizvodu utječe i porijeklo sirovine. Alves i suradnici (2010) su u svom radu na primjeru različitog porijekla Sorte Arabica i sorte Robusta, zaključili da udio akrilamida varira od 29,1 do 50,8  $\mu g\ L^{-1}$  za sortu Arabica, a od 56,9 do 97,3  $\mu g\ L^{-1}$  za sortu Robusta. U zamjenama za kavu na bazi cikorijske, visoke vrijednosti povezane su sa visokim udjelom fruktoze, što opet rezultira u visokom udjelu akrilamida (Mojska i Gielecińska, 2013), ali kao ni za kavu, tako ni za zamjene za kavu nije pronađena veza između udjela šećera i nastalog akrilamida (FDE, 2013).

Akrilamid nije stabilan u zrnima kave tijekom skladištenja. Na njegov udio tijekom skladištenja utječe temperatura skladištenja i trajanje samog skladištenja. Razlog tome može biti hidroliza, razgradnja ili polimerizacija akrilamida do koje dolazi tijekom samog skladištenja (Friedman i Levin, 2008).

### **1. Utjecaj procesnih parametara**

U kavi akrilamid nastaje na samom početku prženja, kada njegova vrijednost doseže i do  $7000 \mu\text{g kg}^{-1}$ , nakon čega opada prema kraju, i to u usporedbi s najvećom zabilježenom razinom i do 10 puta (Zhang i Zhang, 2007). Razlog smanjenju udjela akrilamida je vjerojatno potrošnja prekursora, pa je gubitak u nastanku veći od samog nastanka akrilamida (Mesias i Morales, 2016). Prema istraživanju Bagdonaitė i suradnika (2008), najveći udio akrilamida u kavi nastaje prženjem pri nižim temperaturama ( $220^{\circ}\text{C}$ ) i kroz kratki vremenski period (15 min). Prženje uzrokuje kemijske promjene u kavi, smanjuje njezinu vlažnost i kava postaje pogodna za konzumaciju. Koji program prženja primijeniti ovisit će o vrsti zrna (sastavu, veličini i vlažnosti), i on se za svaku kavu posebno optimira (Amrein, 2005). Različiti udjeli akrilamida u kavi su posljedice različitih sorti uzetih u postupak, različitih načina pripreme i različitih metoda ekstrakcije. Sukladno tome, dobiveni udjeli akrilamida se kreću u rasponu od  $29\text{--}75 \mu\text{g L}^{-1}$  za tursku kavu, od  $33,2\text{--}42,3 \mu\text{g L}^{-1}$  za espresso kavu, i od  $1,7\text{--}15 \mu\text{g L}^{-1}$  za filter kavu (Mesias i Morales, 2016). Teško je pronaći rješenje za smanjenje udjela akrilamida u kavi i zamjenama za kavu, a da se pri tome ne djeluje na senzorna svojstva proizvoda, a sam proces prženja se ne može puno mijenjati, budući je uska veza između razvoja akrilamida i poželjnih karakterističnih senzorskih svojstava (Anese, 2016). Bilo koji pokušaj sprječavanja Maillardove reakcije kao moguće mjere za smanjenje udjela akrilamida doveo bi do smanjenja antioksidacijskih svojstava kave (Mesias i Morales, 2016). Još uvijek se zapravo traži strategija koja bi se mogla primijeniti na smanjenje udjela akrilamida u kavi.

Strategija smanjenja može uključivati preventivne mjere koje su usmjerene na prekursore i na mehanizam nastanka poput:

- a) Odabir sorte kave/mješavina za kavu
- b) Primjena asparaginaze
- c) Vakuum prženje
- d) Određivanje stupnja prženja

i mjere koje su usmjerene na uklanjanje nastalog akrilamida:

- a) Skladištenje
- b) Superkritični CO<sub>2</sub> (Anese, 2016)

Budući je koncentracija asparagina u zelenim zrnima kave visoka (Tablica 12), ne daje mogućnost za kontrolu ili redukciju odabirom zrna sa relativno niskim udjelom asparagina. Smanjenje udjela akrilamida može se postići odabirom mješavina kave s većim udjelom Arabica sorte, budući da ona sadrži manje udjele asparagina koji je ključan prekursor nastanka akrilamida u kavi, kao i samim tehnikama pripreme kave.

Tretiranje zelenih plodova kave asparaginazom, može biti jedan od načina smanjenja udjela akrilamida, a sam stupanj smanjenja ovisi o mješavini kave i načinu prženja. Učinkovitost asparaginaze se može poboljšati predtretmanima, kao što su sušenje i uporaba pare (Anese, 2016). Asparaginaza može smanjiti udio akrilamida i do 45%, ali će utjecati na okus proizvoda koji više neće biti karakterističan za kavu, stoga se nije pokazala kao djelotvoran alat za smanjenje udjela u kavi i cikoriji (FDE, 2013).

Vakuum prženjem može se postići smanjenje udjela akrilamida i za 50%, u odnosu na konvencionalno prženje, što upućuje na to da nizak tlak tijekom prženja sprječava da se akrilamid akumulira (Friedman, 2015).

Udio akrilamida opada sa produljivanjem trajanja prženja, i različito od svih ostalih kategorija prehrambenih proizvoda udio akrilamida u kavi opada sa povećanjem temperature odnosno sa nastajanjem tamnije boje proizvoda (FDE, 2013). Znači zrna kave koja su jače pržena imaju manji udio akrilamida, ali kod odabira ove strategije smanjenja treba voditi računa o senzornim karakteristikama proizvoda.

Udio akrilamida se smanjuje tijekom skladištenja pržene kave i zamjena za kavu. Na to smanjenje najviše utječe temperatura skladištenja. Čuvanjem kave pri sobnoj temperaturi dolazi do gubitka akrilamida i to od 40-66% u prženoj kavi (Andrezejewski i sur., 2004), a u instant kavi kroz period od godinu dana i do 67% (Bagdonaite i sur., 2008). Prilikom odabira ove mjere za smanjenje udjela akrilamida također treba voditi računa o senzornim karakteristikama proizvoda.

Superkritični CO<sub>2</sub> kao ekstrakcijsko sredstvo ima jaku snagu, na koju najviše utječe temperatura. Pri temperaturi 100 °C i 9,5% etanolom kao otapalom, moguće je ukloniti i do 70 % prisutnog akrilamida, a bez smanjenja udjela kofeina (Anese, 2016).

Kao što je vidljivo iz podataka u Tablici 13. primjenjene mjere za smanjenje udjela akrilamida nisu dovele do njegovog smanjenja. Primijećeno je čak i značajno povećanje od 41% u kategoriji " kava i zamjene za kavu " u periodu od 2007-2010 godine, ali ga je teško usporediti za dostupnim podacima iz 2015 godine, budući su u EFSIN-om izvješću iz 2015 god. prikazane srednje vrijednosti (sv) posebno za kavu, a posebno za zamjene za kavu.

Tablica 13. Udjeli akrilamida u kavi i zamjenama za kavu (EFSA, 2012; EFSA, 2015)

Prehrambeni proizvod	godina	Sv (µg kg <sup>-1</sup> )	P <sub>95</sub> (µg kg <sup>-1</sup> )	Max (µg kg <sup>-1</sup> )	n (broj uzoraka)
<b>Kava i zamjene za kavu</b>	2007	373	1084	4700	312
	2008	393	1340	7095	443
	2009	463	2300	4300	279
	2010	527	2000	8044	151
	2015-kava	317	878	-	682
	2015-zamjene za kavu	1499	4500	-	88

## 2.11. Analitičke metode za određivanje akrilamida u hrani

Da bi se uzorci hrane mogli analizirati na prisustvo akrilamida, moraju biti zadovoljeni određeni kriteriji u pogledu točnosti metode, granice određivanja (eng. Limit of detection, LOD), granice kvantificiranja (eng. Limit of quantification, LOQ), preciznosti, ponovljivosti, osjetljivosti, linearnosti i sl. (EFSA, 2015). Zbog male molekulske mase akrilamida, visoke polarnosti i velike reaktivnosti, analiziranje akrilamida pri nižim udjelima u hrani je veliki izazov (Oracz i sur., 2011). Od 2002. godine do danas razvijene su brojne analitičke metode, koje su se s vremenom poboljšavale. Službena metoda za određivanje akrilamida u hrani još uvijek ne postoji, međutim naponi da se standardizira metoda za određivanje i kvantificiranje akrilamida u hrani se nastavljaju (Mesias i Morales, 2016; EFSA, 2015). Većina tih metoda zasniva se na plinskoj (eng. Gas chromatography, GC) ili tekućinskoj (eng. Liquid chromatography, LC) kromatografiji sa spektrometrijom masa (eng. Mass spectrometry, MS) (Bagdonaitė i sur., 2008; Mastovska i Lehotay, 2006).

### 2.11.1. Priprema uzoraka

Analiziranje akrilamida u hrani uglavnom uključuje kompletnu pripremu uzoraka, od homogenizacije, bubrenja, ekstrakcije, pročišćavanja i derivatizacije, a broj i osobitost uključenih koraka ovisit će o analitičkoj metodi (Crews, 2016). Priprema uzoraka ima veliki utjecaj na udio izmjerene akrilamida u uzorcima hrane, zato je prvi korak u analizi akrilamida osigurati reprezentativni homogeni uzorak.

#### Uzorkovanje i homogenizacija

Budući da se akrilamid uglavnom nalazi na površini uzorka (Surdyk i sur., 2004), i ne raspodjeljuje se jednolično kroz hranu, kako bi se osigurala točnost rezultata potrebno je homogenizirati cijeli uzorak. Homogenizaciji obično prethodi mljevenje krutih uzoraka, kako bi veličina čestica uzorka bila što manja (Petersen i Tran, 2005). Mljevenjem i miješanjem postiže se ravnomjerna raspodjela analita u uzorku, i na taj način se osiguravaju preduvjeti za točnost rezultata (Crews, 2016).

### Ekstrakcija

Ekstrakcijski uvjeti su jedan od kritičnih parametara kod pripreme uzoraka za određivanje akrilamida u hrani. Odabir metode ekstrakcije i pročišćavanja ovisi o matriksu hrane. Na djelotvornost postupka ekstrakcije utječe homogenizacija uzorka, odabir ekstrakcijskog otapala, omjer otapala i uzorka, primjena mehaničke sile i dr. (Elbashir i sur., 2014). Brojni naponi su uloženi kako bi se razvio najbolji ekstrakcijski postupak sa fokusom na uvjete kromatografskog razdvajanja i MS detektora (Gökmen i sur, 2009, Crews, 2016). Metode koje se najčešće koriste za ekstrakciju akrilamida iz uzoraka hrane su:

- a) ekstrakcija s vodom
- b) ekstrakcija s organskim otapalom
- c) QuEChERS (brz, jednostavan, jeftin, učinkovit, robustan i siguran) ekstrakcija

Voda je visoko učinkovito ekstrakcijsko otapalo za akrilamid, zbog visoke hidrofilnosti i topljivosti akrilamida u vodi (Senyuva i Gökmen, 2006), i nije potrebno posebno podešavati pH vrijednost (Eriksson, 2005). Prednosti vode kao otapala su što se istovremeno neće ekstrahirati i nepolarne komponente i lipidi, pa stoga nije potrebno primijeniti korak odmašćivanja, a i troškovi izvedbe su niski i nema nepoželjnog utjecaja na okoliš (Crews, 2016). Ekstrakcija se uglavnom sastoji od miješanja homogenog uzorka s vodom, što doprinosi bubrenju uzorka, i na taj način omogućuje bolji pristup potencijalno adsorbiranom ili nedostupnom akrilamidu (Biederman i sur., 2002; EFSA, 2015). Ekstrakcija s vodom se obično provodi pri sobnoj temperaturi (Tareke i sur., 2002), iako su neki autor predložili i povišenje temperature, kako bi se omogućio bolji prolazak ekstrakcijskog otapala u matriks hrane (Petersson i sur., 2006; Senyuva i Gökmen, 2006). Za poboljšanje učinkovitosti ekstrakcije može se primijeniti i mehanička sila, pa se u tu svrhu koriste različite vrste tresilica i homogenizatora (Albishri i El-Hady, 2014; Bagdonaite i sur., 2008). Iako ekstrakcija s vodom daje zadovoljavajuće rezultate, ko-ekstrahirane komponente poput šećera, proteina i organskih kiselina mogu utjecati na kromatografsku učinkovitost, zbog čega neki autori (Ciesarova i sur., 2004; Jezussek i Schieberle, 2003) predlažu uporabu organskih otapala poput heksana i etil acetata.



*QuEChERS ekstrakcija* ili disperzivna ekstrakcija na krutoj fazi (eng. Dispersive solid phase extraction, dSPE) je novija jednostavna metoda pripreme. Prednosti ove metoda su mala potrošnja otapala, povoljna cijena i primjenjivost na različite analite. Metoda se bazira na ekstrakciji s vodom i razdjeljivanju s acetonitrilom, koji sadrži soli  $MgSO_4$  i  $NaCl$  (Mastovska i Lohotay, 2006). Voda potiče ekstrakciju akrilamida, dodatak soli potiče separaciju vode i acetonitrila i ubrzava proces prelaska akrilamida u acetonitrilni sloj. Acetonitril se na kraju pročišćava na kolonama koje sadrže sorbent za ekstrakciju na čvrstoj fazi i bezvodni  $MgSO_4$  (Mastovska i Lohotay, 2006; Zhang i sur., 2005).

Budući da nakon ekstrakcije s vodom dolazi do ko-ekstrakcije i drugih komponenti, koje mogu između ostalog dovesti i do stvaranja emulzije, ekstrakt se ili centrifugira ili ide na daljnje čišćenje (Xu i sur., 2014). Postupci čišćenja uključuju:

- a) Taloženje proteina – prisutnih u ekstraktu pomoću primjene organskih otapala poput ACN, metanola, etanola ili filtriranjem kroz filtere (Gokmen i sur., 2005, Jezussek i Schieberle, 2003).
- b) Uklanjanje masnoća - uglavnom se radi kod uzoraka hrane na bazi krumpira i žitarica (Senyuva i Gökmen, 2006), jer visok udio masti u ekstraktu može uzrokovati probleme kod kromatografskog razdvajanja (Elbashir i sur., 2014). Za odmašćivanje se najčešće koriste otapala poput diklormetana, heksana, petroleum-etera i ostala nepolarna otapala (Zhang i Zhang, 2007).
- c) Primjenu različitih kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi (eng. Solid phase extraction, SPE) (EFSA, 2015). Princip rada se zasniva na prolasku ekstrakta kroz malenu kolonu s punilom. Kolona obično sadrži absorbens koji veže analit, a ko-ekstrahirajuće nečistoće se ispiru otapalom, prije nego se analit eluira otapalom veće jakosti (Crews, 2016). Kod analize akrilamida SPE obično uključuje kombinaciju različitih sorbensa (Florisil, Silica) kako bi se uklonilo što više interferirajućih spojeva (Elbashir i sur., 2014).

### 2.11.2. Razdvajanje, identifikacija, detekcija i kvantifikacija akrilamida

U službenoj kontroli za određivanje udjela akrilamida u uzorcima hrane primarno se koriste metode plinske i tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa, bilo praćenjem odabranih reakcija (eng. Single ion monitoring, SIM) ili praćenjem višestrukih reakcija (eng. Multiple reaction monitoring, MRM), i to 56% metoda tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s tandemskom spektrometrijom masa (eng. High performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS), a 37% metoda plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (eng. Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) (EFSA, 2015). Glavna razlika između ova dva postupka je što analiziranje akrilamida GC-MS metodom zahtjeva prethodnu derivatizaciju, za razliku od izravnog analiziranja akrilamida metodom tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (eng. Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) (Crews, 2016). Identifikacija se bazira na usporedbi vremena zadržavanja analita (eng. Retention time, RT) sa RT unutarnjeg standarda (eng. Internal standard, IS) ili vanjskog standarda (eng. External standard, RS). Uporaba izotopnih analoga akrilamida kao unutarnjeg standarda ima velike prednosti. Dodatak unutarnjeg standarda može poboljšati točnost rezultata, budući se gubitak prisutnog akrilamida u hrani tijekom obrade korigira korištenjem unutarnjeg standarda (EFSA, 2015). Unutarnji standardi imaju ista kemijska i fizikalna svojstva kao analit koji se određuje, a MS detektori omogućuju odvajanje mase analita i njegovog izotopnog analoga (Soares, 2015). Kao izotopno označeni standardi koriste se akrilamid-D<sub>5</sub>, <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-akrilamid ili <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-akrilamid (EFSA, 2015).

#### LC-MS/MS metode

Zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti i bez potrebe za derivatizacijom, HPLC-MS/MS (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa tandemskom spektrometrijom masa) i UPLC-MS/MS (tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti sa tandemskom spektrometrijom masa) metode, postale su metode izbora za određivanje akrilamida u različitim uzorcima hrane. Metode bazirane na ovim tehnikama ispunjavaju zahtjeve Uredbe 2017/2158 po pitanju postizanja odgovarajuće LOD i LOQ. Za kromatografsko razdvajanje uglavnom se predlaže kromatografija reverzne faze sa C18 kolonom (Rufian-Henares i Morales, 2006), a kao postupak ionizacije najviše se koristi ionizacija elektro raspršenjem (Electro-spray ionization, ESI) (Oracz i sur., 2011.). LC-MS/MS metoda ima visoku selektivnost posebno u SRM načinu rada, jer se prate tranzicije od iona prekursora do iona produkta (Mesias i Morales, 2016).

Glavni ioni promatrani u analizi uzoraka na prisustvo akrilamida u hrani LCM/MS-MS metodom su:  $m/z=72$  za protonirani molekularni ion  $[\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2]^+$ ,  $m/z=55$  za ion nastao gubitkom  $\text{NH}_2$   $[\text{CH}_2=\text{CH=O}]^+$  i  $m/z=27$  za ion nastao gubitkom CO  $[\text{CH}_2=\text{CHCNH}]^+$ . Za kvantitativno određivanje akrilamida prate se prijelazi  $m/z 72>55$ ,  $m/z 72>54$  i  $m/z 72 >27$ , te  $m/z 72>58$  za izotopno obilježeni akrilamid ( $\text{D}_3$ -akrilamid i  $^{13}\text{C}_3$ -akrilamid) (Mesias i Morales, 2016).

### GC-MS metode

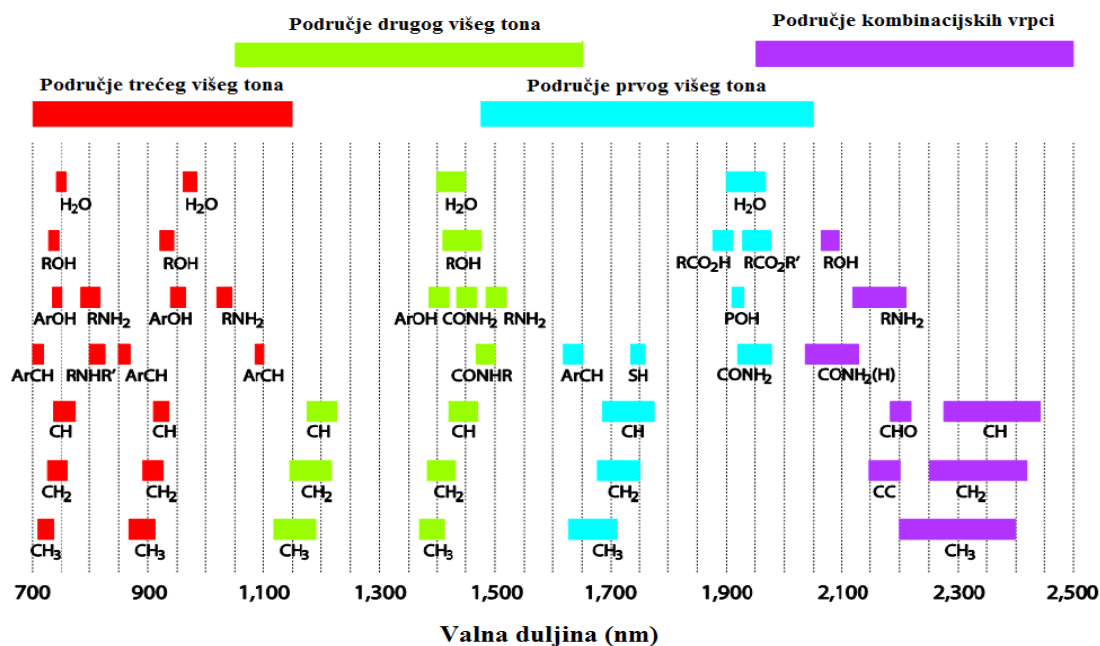
Različiti sustavi detekcije mogu biti povezani sa GC-om kod određivanja akrilamida, kao što su: sustav masene spektrometrije (eng. Mass spectrometry), sustav masene spektrometrije visoke razlučivosti (eng. High resolution mass spectrometry, HRMS), sustav zahvata elektrona (eng. Electron capture detector, ECD), sustav tandemске spektrometrije masa (eng. tandem mass spectrometry, MS/MS) i sustav plameno ionizacijske detekcije (eng. Flame ionization detection, FID) (Becalski i sur., 2005; Kim i sur., 2011), ali najviše se koristi GC-MS sustav (Biederman i sur., 2002b). Analiziranje akrilamida putem GC-MS (plinska kromatografija sa spektrometrijom masa) sustava može biti sa ili bez derivatizacije (Lineback i sur., 2012). Zbog niske hlapivosti i polarosti akrilamida (Kepekci i sur., 2012), i nedostatka karakterističnih iona u masenom spektru, budući da masu glavnih iona  $m/z=55$  i  $m/z=57$ , mogu imati i druge ko-ekstrahirane komponente (Biedermann i sur., 2002b), većina ih se ipak radi sa derivatizacijom. Derivatizacija se uglavnom radi bromiranjem (Eriksson, 2005). Bromiranjem nastaje 2,3-dibromopropionamid, spoj koji je manje polaran i ima veću molekularnu masu ( $M_r$ ), pa ga je lakše detektirati MS-om, a i bolje je topljiv u nepolarnim otapalima (Soares, 2015). Primjena GC-MS metode uključuje praćenje iona  $m/z=106$  za 2,3-dibromopropionamide,  $m/z=108$  za  $[\text{C}_2\text{H}_3^{79}\text{Br}]^+$ ,  $m/z=150$  za  $[\text{C}_2\text{H}_3^{81}\text{Br}]^+$ ,  $m/z=150$  za  $[\text{C}_3\text{H}_5^{79}\text{BrNO}]^+$  i  $m/z=152$  za  $[\text{C}_3\text{H}_5^{81}\text{BrNO}]^+$ . Za IS 2,3-dibromo( $^{13}\text{C}_3$ )propionamid prate se ioni:  $m/z=110$  za  $[\text{C}_2\text{H}_4^{81}\text{Br}]^+$ ,  $m/z=153$  za  $[\text{C}_3\text{H}_5^{79}\text{BrNO}]^+$  i  $m/z=155$  za  $[\text{C}_3\text{H}_5^{81}\text{BrNO}]^+$  (Soares, 2015).

### Ostale metode određivanja akrilamida

Ostale analitičke metode uključuju određivanje akrilamida primjenom pirolitičke plinske kromatografije sa spektrometrijom masa, infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (eng. Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) te blisko infracrvena spektroskopije (eng. Near infrared spectroscopy, NIR) (EFSA, 2015). Blisko infracrvena spektroskopija je vrsta vibracijske spektroskopije koja se temelji na apsorpciji

elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih duljina od 750-2500 nm, što odgovara energijama fotona od  $2.65 \times 10^{-19}$  do  $7,96 \times 10^{-20}$  J (Pasquini, 2003).

Vibracijska spektroskopija u infracrvenom (eng. Infrared, IR) području temelji se na svojstvu molekula da apsorbiraju zračenje valnih duljina koje odgovaraju energiji potrebnoj za prijelaz između kvantiziranih vibracijskih energetske razine (Metrohm, 2013). Molekula može apsorbirati infracrveno zračenje ako tijekom vibracije dolazi do promjene dipolnog momenta. S obzirom da je najlakši, atom vodika je podložan najjačim vibracijama tako da glavne vrpce NIR spektra odgovaraju vezama koje sadrže vodik i druge lakše atome (prvenstveno C-H, N-H, O-H i S-H) (Blanco i Villarroya, 2002). Energetske razine molekularnih vibracija su kvantizirane, odnosno mogu poprimiti samo diskretne vrijednosti koje se nazivaju energetskim razinama. Te energetske razine označavaju se vibracijskim kvantnim brojem  $\nu$  koji može biti bilo koji cijeli broj uključujući nulu. Fundamentalni vibracijski prijelazi odnose se na energetske prijelaze iz  $\nu=0$  u  $\nu=1$  i njihove apsorpcijske vrpce pojavljuju se u NIR spektrima (LibreTexts, 2016). NIR spektri su specifični po tome što obuhvaćaju kombinacijske vrpce i vrpce viših tonova (overtona). Do viših tonova dolazi kada molekula apsorbira zračenje koje dovodi do prijelaza iz  $\nu=0$  u  $\nu=2$  (prvi viši ton),  $\nu=0$  u  $\nu=3$  (drugi viši ton) itd. (LibreTexts, 2016). Cijeli NIR spektar sastoji se od četiri viša tona, a jačina apsorpcijskih vrpce smanjuje se sa svakim višim tonom (Esteve Agelet i Hurburgh Jr., 2010). Područje viših tonova nalazi se između valnih duljina 780 i 2000 nm (Metrohm, 2013). Na višim valnim duljinama (1900-2500 nm) nalazi se područje kombinacijskih vrpce. Kombinacijske vrpce nastaju u poliatomnim molekulama kada energija jednog fotona dovodi do istovremenog povećanja vibracijskog kvantnog broja dvije ili više veza (Blanco i Villarroya, 2002). Slika 19. prikazuje položaje najvažnijih apsorpcijskih vrpce NIR spektra za pojedine funkcijske skupine.



Slika 19. Položaj najvažnijih apsorpcijskih vrpca u NIR spektru (prema Metrohm, 2013)

Iz ovih razloga NIR spektri sadrže široke, preklapajuće apsorpcijske vrpce koje nije moguće direktno interpretirati, već se podaci obrađuju posebnim statističkim (kemometrijskim) metodama.

U praćenju kakvoće hrane blisko-infracrvena spektroskopija ima brojne prednosti u odnosu na tradicionalne analitičke metode. To je brza, nedestruktivna metoda, pogodna za in-line upotrebu (Pasquini, 2003), koju karakterizira točnost i pouzdanost (Huang i sur., 2008). Zahtjevi za pripremu uzoraka su minimalni i ne zahtijeva utrošak kemijskih reagensa (Metrohm, 2013) što smanjuje troškove analize i količinu otpada. S druge strane, vrpce NIR spektara su manje informativne i zahtijevaju daljnju obradu multivarijatnim metodama analize (Jednačak i Novak, 2013). Kao sekundarna metoda analize zahtijeva izradu kalibracijskih modela. PCA (eng. principal component analysis) ili analiza glavnih komponenti je metoda multivarijatne statističke analize. Koristi se u obradi NIR spektara u svrhu smanjenja dimenzionalnosti podataka. NIR spektri daju veliku količinu podataka o jednom uzorku, a glavna svrha PCA analize je prepoznavanje i ekstrakcija najvažnijih informacija iz izmjerenih spektara čime se smanjuje količina podataka (Abdi i Williams, 2010). Koristi se u kvalitativnoj analizi za prepoznavanje uzoraka u skupu podataka (Metrohm, 2013), grupiranje i procjenu strukture podataka (Jednačak i Novak, 2013). Dobiveni podaci o svakom uzorku mogu se prikazati u n-dimenzionalnom prostoru gdje svaka točka predstavlja određenu varijablu (Jednačak i Novak,

2013), odnosno apsorbanciju NIR zračenja pri određenoj valnoj duljini. Uz pomoć PCA formiraju se nove varijable koje se nazivaju glavnim komponentama (principal components ili PC), a dobivaju se linearnim kombinacijama izvornih varijabli. Pri tome su uvjeti da prva glavna komponenta (PC-1) predstavlja najveću moguću varijaciju u podacima (Abdi i Williams, 2010), a svaka sljedeća glavna komponenta mora biti ortogonalna u odnosu na prethodnu (s matematičkog gledišta PC su vektori) i takva da predstavlja sljedeću najveću varijaciju u podacima (Metrohm, 2013). Vektori PC-1 i PC-2 čine novi koordinatni sustav na koji se projiciraju točke iz originalnog n-dimenzionalnog prostora. Koordinate točaka u ovom koordinatnom sustavu nazivaju se faktorskim bodovima (eng. scoreplots). Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava njihovo grupiranje (Jednačak i Novak, 2013). Linearna diskriminantna analiza (eng. Linear discriminant analysis, LDA) spada u nadgledane metode klasifikacije. Takve metode koriste informacije o pripadnosti uzoraka nekoj kategoriji za izradu modela koji bi služio u klasifikaciji novih uzoraka u jednu od poznatih kategorija na temelju podataka dobivenih mjerenjem. LDA je slična PCA u smislu da obje metode smanjuju dimenzionalnost podataka. Međutim, LDA se temelji na odabiru onih linearnim kombinacija originalnih varijabli koje maksimiziraju varijancu između i minimiziraju varijancu unutar pojedinih kategorija (Berrueta i sur., 2007). Istraživanje Adedipe i suradnika (2015) pokazuje da se primjenom NIR spektroskopske metode mogu detektirati različite koncentracije akrilamida, kako u model sustavima, tako i u realnim uzorcima te da se ta metoda može koristiti kao probirna metoda, ili kao On-line metoda za razdvajanje uzoraka sa visokim i niskim udjelom akrilamida. Za određivanje povezanosti velikog udjela reducirajućih šećera odnosno udjela akrilamida s konačim izgledom prženih proizvoda od krumpira može se provesti i ispitivanje boje, usporedbom prženih uzoraka s nijansama boja USDA/Munsell. Konačna boja prženog proizvoda može se izmjeriti i s pomoću posebnih uređaja tipa Agtron. (Ur. 2017/2158 EU).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Prisutnost akrilamida u hrani koja se nalazi na tržištu RH

Određivanje udjela akrilamida u hrani koja se nalazi na tržištu RH provedeno je na ukupno 195 uzoraka. Od ukupnog broja analiziranih uzorka 185 uzoraka analizirano je u sklopu monitoringa Ministarstva zdravlja, a 10 uzoraka je preuzeto od pravnih osoba.

Tablica 14. Uzorci analizirani u sklopu praćenja razina akrilamida primjenom UPLC-MS/MS i NIR metode s područja RH u periodu od 2016-2017 godine

Vrsta uzorka	Broj uzoraka
Čips	25
Pomfrit	20
Kruh, peciva i hruskavi kruh	30
Vafli, grickalice, krekeri i keksi	96
Kave i zamjene za kavu	8
Žitarice za doručak	10
Proizvodi na bazi žitarica za djecu	6

#### 3.2. Prisutnost akrilamida u prženim krumpirima

Za ispitivanja utjecaja inovativnih procesnih tehnika na udio akrilamida u prženim proizvodima od krumpira, odabrano je 5 različitih sorti krumpira nabavljenih putem trgovačke mreže:

- Sorta Sante-za prženje
- Sorta Spunta-za prženje
- Sorta Artemis-za prženje
- Sorta Soraya-za kuhanje
- Blue Salad-za prženje

### 3.3. Označavanje uzoraka

Uzorci su označavani prema kraticama navedenim u Tablici 15. Imena sorti krumpira pisana su punim nazivom.

Tablica 15. Označavanje toplinski obrađenih uzoraka

Oznaka načina toplinske obrade	Značenje oznake
OF	Prženje u ulju
AF	Prženje u struji vrućeg zraka
VOF	Blanširanje u vodi nakon kojeg slijedi prženje u ulju
VAF	Blanširanje u vodi nakon kojeg slijedi prženje u struji vrućeg zraka
VCaCl <sub>2</sub> OF	Blanširanje u vodi uz dodatak 0,3% CaCl <sub>2</sub> nakon kojeg slijedi prženje u ulju
VCaCl <sub>2</sub> AF	Blanširanje u vodi uz dodatak 0,3% CaCl <sub>2</sub> nakon kojeg slijedi prženje u struji vrućeg zraka
MVOF	Mikrovalno blanširanje nakon kojeg slijedi prženje u ulju
MVAF	Mikrovalno blanširanje nakon kojeg slijedi prženje u struji vrućeg zraka
MVCaCl <sub>2</sub> OF	Mikrovalno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl <sub>2</sub> nakon kojeg slijedi prženje u ulju
MVCaCl <sub>2</sub> AF	Mikrovalno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl <sub>2</sub> nakon kojeg slijedi prženje u struji vrućeg zraka
UZVOF	Ultrazvučno blanširanje nakon kojeg slijedi prženje u ulju
UZVAF	Ultrazvučno blanširanje nakon kojeg slijedi prženje struji vrućeg zraka
UZVCaCl <sub>2</sub> OF	Ultrazvučno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl <sub>2</sub> nakon kojeg slijedi prženje u ulju
UZVCaCl <sub>2</sub> AF	Ultrazvučno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl <sub>2</sub> nakon kojeg slijedi prženje u struji vrućeg zraka



### 3.4. Kemikalije

Za određivanje reducirajućih šećera, slobodne aminokiseline asparagin i akrilamida korišteni su certificirani referentni materijali navedeni u Tablici 16.

Tablica 16. Popis certificiranih referentnih materijala

Naziv	Kratica	Čistoća [%]	Proizvođač
Akrilamid	AA	≥ 99.0	dr. Ehrenstofer GmbH, Augsburg, Njemačka
Akrilamid 1,2,3- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	AA-IS	≥ 99.0	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, Sjedinjene Američke Države
Fruktoza	Fru	> 99.0	Sigma Aldrich, Steinheim, Švicarska
Glukoza	Glu	> 99.0	Dr. Ehrenstofer GmbH, Augsburg, Njemačka
Saharoza	Sah	> 99.0	ChromaDex, California, Sjedinjene Američke Države
L-Asparagin	Asn	≥ 99.0	Sigma Aldrich, Steinheim, Švicarska

Uz certificirane referentne materijale korišteni su i kemikalije i reagensi navedeni u Tablici 17.

Tablica 17. Popis korištenih kemikalija i reagensa

Naziv	Kratica	Čistoća [%]	Proizvođač
N-heksan		GC ECD	Merck, Kenilworth, Sjedinjene Američke Države
Acetonitril	ACN	UHPLC	ITW Reagents, Barcelona, Španjolska
Metanol		HPLC	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
Florenil-metil-oksikarbonil klorid	FMOc	≥ 97.0	Sigma-Aldrich, Steinheim, Švicarska
Ftaldehid	OPA	≥ 97.0	Sigma Aldrich, Steinheim, Švicarska
3-Merkaptopropionska kiselina	3-MPA	≥ 99.0	Sigma Aldrich, Steinheim, Švicarska
Klorovodična kiselina (37%)		p.a.	Merck, Hohenbrunn, Njemačka
Boraks Anhydrous		≥ 98.0	Sigma Aldrich, Steinheim, Švicarska
Metanol		HPLC	Panreac, Appli Chem, Darmstadt, Njemačka
Mravlja kiselina, 98 %		p. a.	Scharlau, Barcelona, Španjolska
Ultra čista voda			Nirosta VV System, Nirosta water technologies, Osijek, Hrvatska
Smjesa soli za QuEChERS; MgSO <sub>4</sub> (4g)+ NaCl (0,5g)			Bekolut, Hauptstuhl, Njemačka
Smjesa soli za d-SPE: MgSO <sub>4</sub> (1200 g) + PSA (400 mg)			
Kalcijev-klorid, bezvodni	CaCl <sub>2</sub>	≥95%	Gram Mol, Zagreb

### 3.5. Pribor i instrumenti

Za pripremu i obradu uzoraka korišteni je slijedeći pribor i instrumenti:

- Mikroštrcaljke proizvođača Brand (Wertheim, Njemačka)
- Kivete PTFE od 50 mL, Sarstedt (Nümbrecht, Njemačka)
- Analitička vaga osjetljivosti 0,01 mg, Mettler Toledo GmbH (Giessen, Njemačka)
- Filteri- Acrodisc, najlonska membrana, promjera 13 mm, veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  i 0,45  $\mu\text{m}$  (Pall Corporation, Michigan, SAD)
- Ultrazvučna kupelj Branson 1210, Branson Ultrasonics (Danbury, SAD)
- Rotaciona tresilica Ika Vortex Genius 3 (Staufen, Njemačka)
- Horizontalna miješalica IKA-WERKE (Staufen, Njemačka)
- Centrifuga Rottina 38 (Hettich, Belgija)
- Mikser Retsch GM 300 (Haan, Njemačka)
- pH-metar MPC 227, Mettler Toledo GmbH (Giessen, Njemačka)
- Visoko djelotvorni tekućinski kromatograf (HPLC) Shimadzu Class-VP 6,12 (Kyoto, Japan) s RI (Refractive indeks) detektorom, opremljen s automatskim uzorkivačem, uređajem za otklanjanje plinova, grijačem kolone i jedinicom za kontrolu sustava.
- Waters Xevo TQ MS Ultra visoko djelotvorni kromatograf sa dvostrukim spektrometrom masa- UPLC MS-MS (Waters Corp., Milford, MA), opremljen s termostatiranim automatskim uzorkivačem, grijačem kolone, MS pumpom s otplinjačem (Waters Xevo TQMS), generatorom dušika i sustavom za računalnu obradu podataka.
- NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$
- Visoko djelotvorni tekućinski kromatograf (HPLC) Agilent 1100 Series (Santa Clara, SAD) opremljen s autoinjektorom, dvije binarne pumpe, uređajem za otklanjanje plinova, grijačem kolone, jedinicom za kontrolu sustava, UV-detektorom s nizom fotodioda i fluorescencijskim detektorom (FLD). Program za upravljanje instrumentom i obradu podataka ChemStation.
- Kolone za tekućinsku kromatografiju: Luna C18, duljine 150 mm  $\times$  2,0 mm unutarnjeg promjera, veličine čestica 3  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, California, USA); Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E duljine 250 mm  $\times$  4,6 mm unutarnjeg promjera, veličine čestica 5,0  $\mu\text{m}$  (Shodex, Ontario, Canada), Zorbax Eclipse-AAA, duljine 150 mm  $\times$  3,0 mm u.p., veličine čestica 3,5  $\mu\text{m}$  (Agilent, SAD).

- Laboratorijski sušionik (Instrumentaria)
- Kolorimetar CM-2500d (Konica Minolta, Japan)
- Teksturometar (Texture analyzer HD.Plus ,Stable Micro System, Velika Britanija)
- Mikrovalna pećnica (Gorenje MO20MW, Slovenija) snage 700W
- Friteza za prženje u dubokom ulju (Tefal Versalio 7in1, FR 4900 70, Kina) snage 1460-1600W
- Friteza za prženje na vrući zrak (Tefal, Actifry, FZ701015, Francuska) snage 1280-1400W
- Uređaj za usitnjavanje (Ariete, Pimmy, Kina) snage 350W
- Friteza Tefal (Super Frituese, Francuska) snage 2000W
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 70H, Elma, Siegen, Njemačka); 37 kHz

### 3.6. Postupci

#### 3.6.1. Određivanje suhe tvari

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupni sadržaj tvari iz sastava proizvoda, koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Ovisno o sastavu proizvoda za određivanje suhe tvari primjenjuje se tri postupka sušenja: sušenje na 105 °C, sušenje u vakuumu i destilacija. Sušenjem pri 105 °C određuje se ostatak uzorka nakon sušenja do konstantne mase, a primjenjuje se za određivanje suhe tvari u proizvodima od voća i povrća (AOAC, 1980). (AOAC (1980) Official methods of analysis (13th ed.), Washington DC: Association of Official Analytical Chemists).

**Postupak određivanja:**

U izvaganu posudicu stavi se oko 2,5 g pripremljenog uzorka, koji se dobro izmiješa i izvaže. Potom se ispitivana količina uzorka stavi u laboratorijski sušionik zagrijan na  $105 \pm 0,5$  °C i suši se 1 sat. Potom se uzorak vadi iz sušionika, hladi u eksikatoru i važe. Sušenje se nastavlja sve dok razlika u masi nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g.

$$s.t.(%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad /1/$$

Gdje je:

$m_0$  (g) - masa posudice i pomoćnog materijala

$m_1$  (g) - masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja

$m_2$  (g) - masa posudice s ostatkom nakon sušenja.

### 3.6.2. Određivanje ugljikohidrata HPLC metodom

#### 3.6.2.1. Priprema standardnih otopina

Certificirani referentni materijali Fruktoze, Glukoze i Saharoze odvagani su na analitičkoj vagi osjetljivosti 0,01 mg. Odvagano je po  $\sim 2,1$  g svakog certificiranog referentnog materijala u odmjerne tikvice od 100 mL. U tikvice je dodano 50 mL redestilirane vode, nakon čega su tikvice nadopunjene do oznake acetonitrilom (ACN). Daljnjim razrjeđivanjem pripremljene su radne otopine standarda. Radne otopine pripravljane su neposredno prije početka analize.

#### 3.6.2.2. Priprema uzoraka

Odvagano je 5 g homogeniziranog uzorka u odmjerne tikvice od 50 mL. Dodano je 25 ml redestilirane vode i tikvice su nadopunjene s ACN do oznake. Uzorci su nakon toga homogenizirani i profiltrirani preko 0,45  $\mu$ m membranskih filtera. Za kvantitativno određivanje ciljanih spojeva u ekstraktu uzoraka korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s RI detektorom.

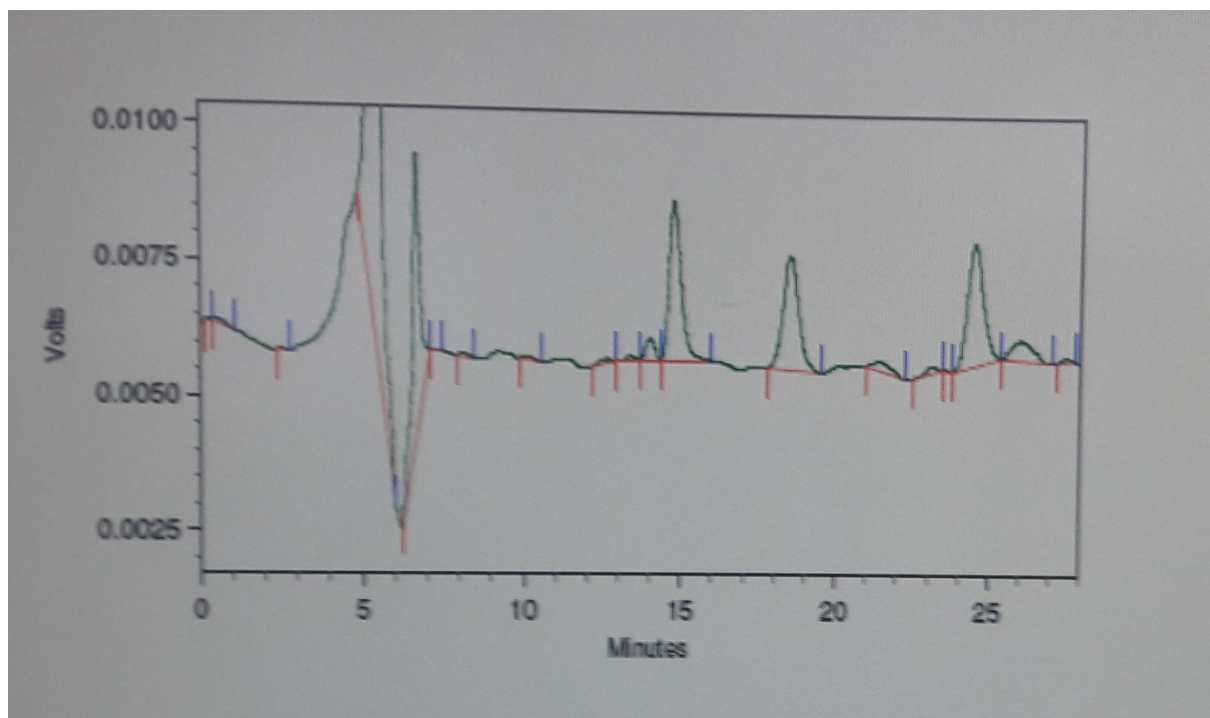
## 3.6.2.3. Uvjeti rada HPLC-a

Analiti su razdvojeni tekućinskom kromatografijom na koloni Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E. Temperatura kolone pri analizi održavana je na 40 °C. Protok pokretne faze podešen je na 1 mL min<sup>-1</sup>, a volumen injektiranog uzorka bio je 20 µL. Kao mobilna faza korištena je otopina ACN:H<sub>2</sub>O u omjeru V/V=75:25. Šećeri eluirani s tekućinsko-kromatografske kolone detektirani su i kvantitativno određeni RI detektorom.

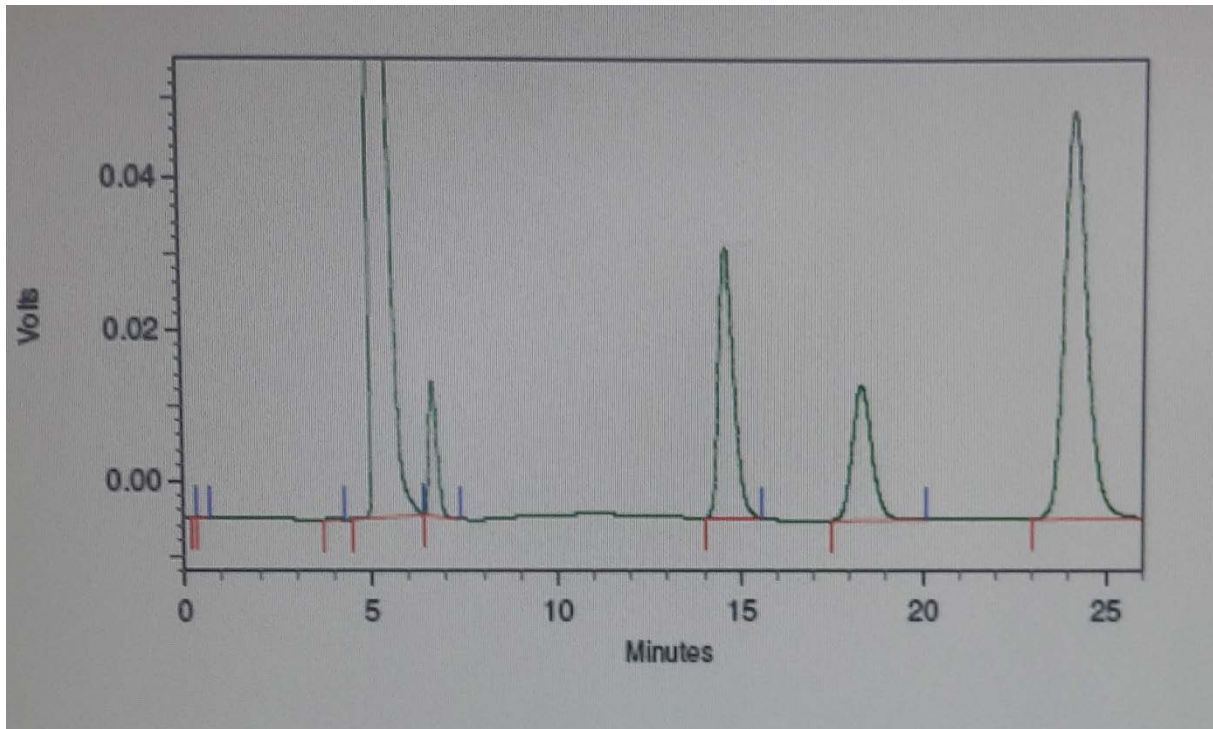
## 3.6.2.4. Kvantitativno određivanje ugljikohidrata

Metoda za određivanje masenog udjela ugljikohidrata je validirana i akreditirana kao vlastita metoda. Validacijom metode postignuta je granica kvantifikacije (eng. Limit of quantification, LOQ) metode od 0,35 g/100 g otopine. Prisutnost traženih ugljikohidrata u otopini uzorka utvrđuje se usporedbom vremena zadržavanja (RT) analita koji se nalaze u uzorku s onim referentne tvari.

- a) radna otopina standarda ugljikohidrata s pripadajućim vremenima zadržavanja (RT fruktoza=14,95; RT glukoza=18,3 i RT saharoza=24,1)



- b) uzorak krumpira sa određenim udjelom ugljikohidrata pri odgovarajućim vremenima zadržavanja



Slika 20. HPLC kromatogrami radne otopine standarda (a) i uzorka krumpira (b) pri kromatografskim uvjetima navedenim u poglavlju 3.2.1.3.

Količine prisutnih ugljikohidrata u uzorku izračunate su prema slijedećoj formuli:

$$\omega_{UH} = \frac{\gamma_{o\check{c}} \times V(\text{tikvice})}{m(\text{uzorka})} [\text{g kg}^{-1}] \quad /2/$$

Gdje je

$\omega_{UH}$  – izračunati maseni udio ugljikohidrata u uzorku ( $\text{g kg}^{-1}$ )

$\gamma_{o\check{c}}$  – očitana masena koncentracija ugljikohidrata iz baždarnog pravca ( $\text{g L}^{-1}$ )

$V_{\text{tikvice}}$  – volumen tikvice pripremljenog uzorka (mL)

$m_{\text{uzorka}}$  – masa uzorka uzetog u postupak (g)

### 3.6.3. Određivanje slobodne aminokiseline asparagin HPLC metodom

#### 3.6.3.1. Priprema standardnih otopina

Certificirani referentni materijal Asn odvagan je na analitičkoj vagi osjetljivosti 0,01 mg. Odvavano je 10 mg certificiranog referentnog materijala u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica je nadopunjena vodom do oznake. Daljnjim razrjeđivanjem u vodi pripremljene su radne otopine standarda. Radne otopine pripremljene su neposredno prije početka analize.

#### 3.6.3.2. Ekstrakcija slobodnih aminokiselina

Odvavano je 1 g homogeniziranog uzorka, dodano je 5 mL 0,1 M HCl i uzorak je promiješan na rotacionoj tresilici 30 sekundi. Uzorci su ekstrahirani u ultrazvučnoj kupelji 1h, nakon čega su centrifugirani 15 minuta pri 4500 okr  $\text{min}^{-1}$ , a izdvojeni supernatant je profiltriran kroz membranski filter. Za kvalitativno i kvantitativno određivanje slobodnih aminokiselina u ekstraktu gljiva korištena je tekućinska kromatografija visokog razlučivanja s fluorescencijskim detektorom.

#### 3.6.3.4. Uvjeti rada HPLC-a

Analiti su prije razdvajanja tekućinskom kromatografijom obrnutih faza na koloni Zorbax Eclipse-AAA derivatizirani. Primarna aminokiselina Asn je derivatizirana smjesom 3-merkaptopropionske kiseline (3-MPA) i ftaldehida (OPA). Početna smjesa za derivatizaciju primarnih aminokiselina pripravljena je na način da je otopini OPA masene koncentracije 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  u 0,02 M boratnom puferu (pH 10,2) dodano 1,0% 3-MPA. Reagensi su čuvani na tamnom u hladnjaku. Radna smjesa za derivatizaciju primarnih aminokiselina pripravljena je razrjeđivanjem 20  $\mu\text{L}$  početne smjese sa 140  $\mu\text{L}$  0,1 M boratnog pufera. Derivatizacija je provedena uporabom automatskog injektora: uzimanjem 2,5  $\mu\text{L}$  boratnog pufera i 0,5  $\mu\text{L}$  uzorka te njihovim miješanjem. Nakon 0,5 min dodano je 0,5  $\mu\text{L}$  reagensa 3-MPA/OPA i promiješano. Dodano je 0,5  $\mu\text{L}$  reagensa FMOC, promiješano i dodano 32  $\mu\text{L}$  vode. Nakon miješanja na kolonu je injektirano 18  $\mu\text{L}$ . Temperatura kolone pri analizi održavana je na 40 °C. Temperatura odjeljka za injektiranje uzoraka bila je 15 °C, a protok pokretne faze bio je 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$ .



Primijenjeno je gradijentno ispiranje s dva eluensa: 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 (Slika 21.).

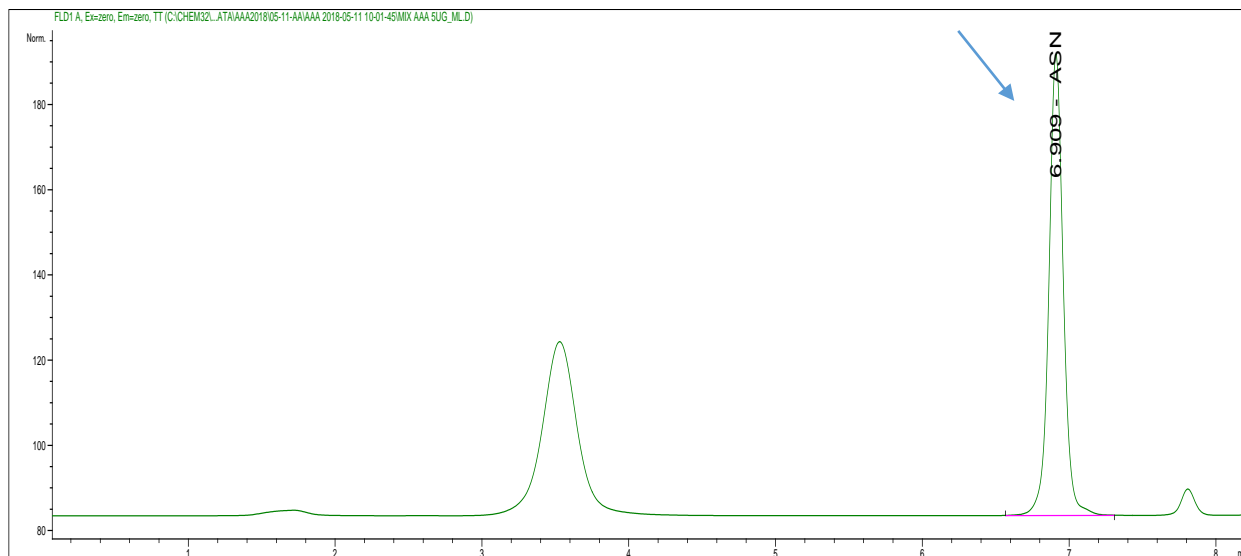


Slika 21. Tekućinski kromatograf sa fluorescencijskim detektorom

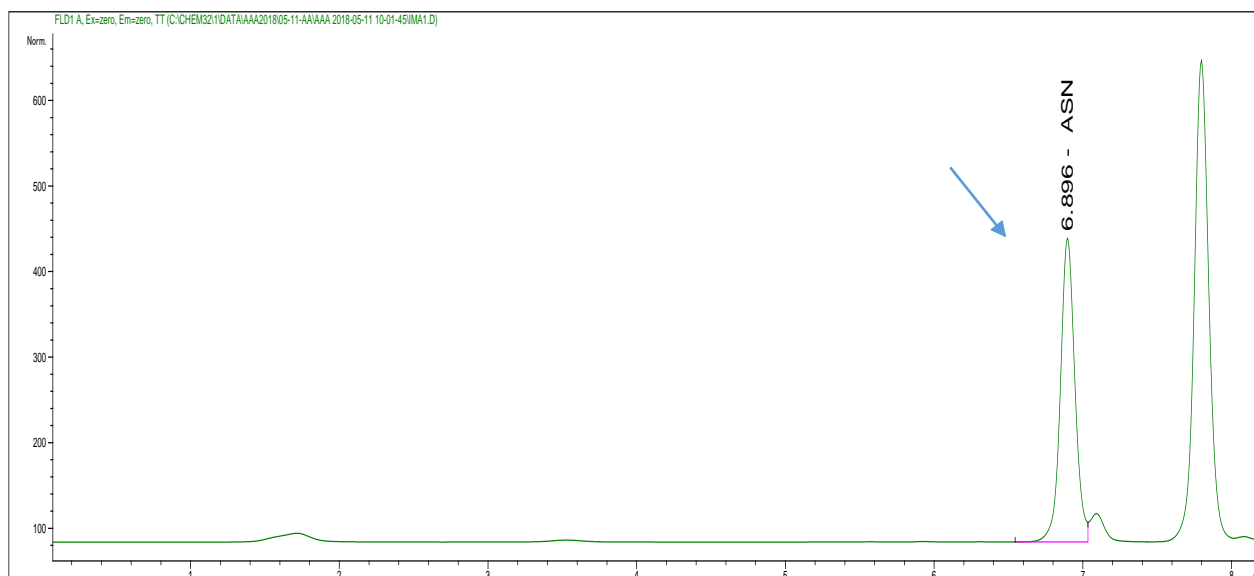
## 3.6.3.5. Kvantitativno određivanje aminokiseline asparagin

Metoda za određivanje masenog udjela aminokiseline asparagin je validirana. Validacijom metode postignuta je granica kvantifikacije (LOQ) metode od  $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ . Prisutnost aminokiseline asparagin u otopini uzorka utvrđuje se usporedbom vremena zadržavanja analita koji se nalaze u uzorku s vremenom zadržavanja referentne tvari (Slika 22.).

a) radna otopina standarda slobodne aminokiseline asparagin pri  $RT=6,909$



b) uzorak krumpira s određenim udjelom asparagina pri  $RT=6,896$



Slika 22. HPLC kromatogrami radne otopine standarda (a) i uzorka krumpira (b) pri kromatografskim uvjetima navedenim u poglavlju 3.2.2.3.

Količina slobodne aminokiseline asparagin u uzorku izračunate su prema slijedećoj formuli:

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

Gdje je:

$\omega_a$  – izračunati maseni udio aminokiseline u uzorku ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

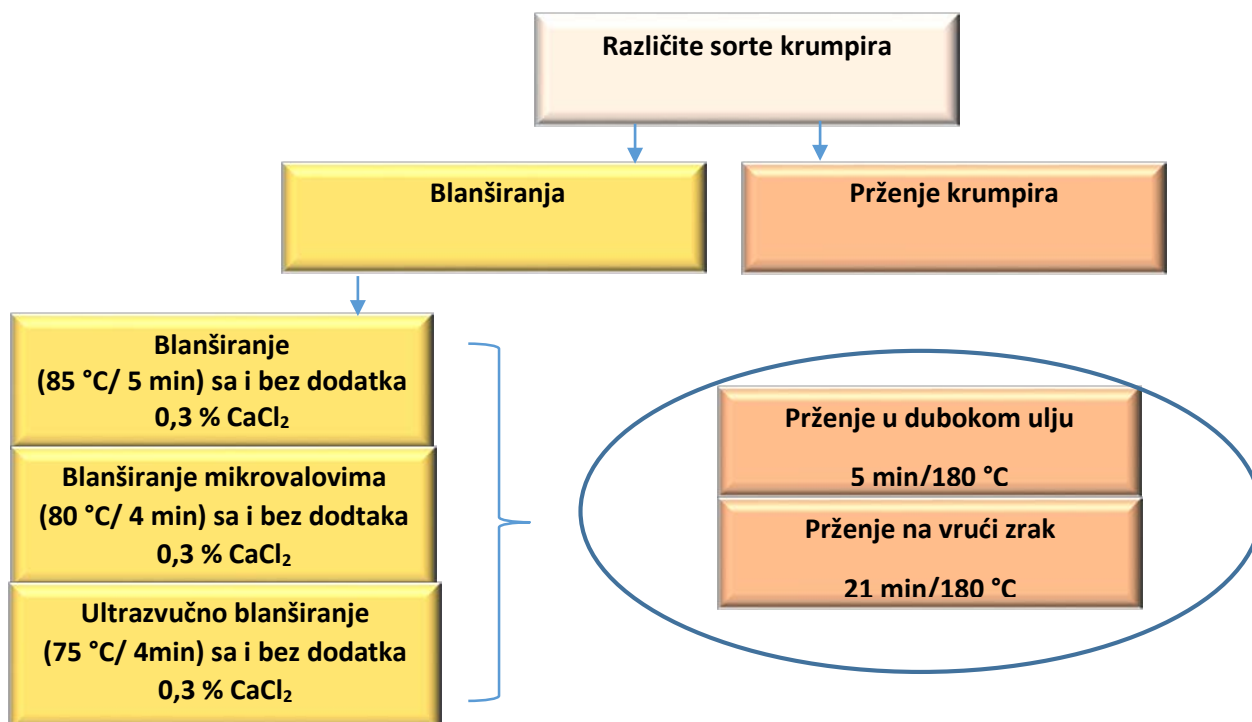
$\gamma_{\text{oč}}$  – očitana masena koncentracija aminokiseline iz baždarnog pravca ( $\text{ng mL}^{-1}$ )

$V_{\text{tikvice}}$  – volumen ekstrakta pripremljenog uzorka (mL)

$m_{\text{uzorka}}$  – masa uzorka uzetog u postupak (g)

#### 3.6.4. Toplinska obrada uzoraka

Uvjeti toplinske predobrade i obrade uzoraka primjenjeni u ovom radu određeni su temeljem provedenih preliminarnih istraživanja. Uzorci odabranih sorti krumpira neposredno prije provođenja toplinske obrade su oprani, oguljeni i narezani ručnom rezalicom za krumpir. Veličina štapića krumpira bila je 90x6x6 mm. Za potrebe toplinske obrade, uvijek je izvagana ista količina narezanih štapića krumpira (200 g). Svaka od korištenih sorti krumpira pržena je u dubokom ulju odnosno struji vrućeg zraka uz primjenu različitih načina blanširanja (Slika 23.).



Slika 23. Prikaz različitih načina toplinske predobrade i obrade uzoraka krumpira

### **Blanširanje**

Prije provođenja prženja dio uzoraka krumpira je blanširan. Blanširanje je provedeno je na nekoliko načina:

- blanširanje u vodi pri 85 °C u trajanju od 5 minuta,
- blanširanje mikrovalovima (80 °C, trajanje 4 minute)
- ultrazvučno blanširanje (75 °C, trajanje 4 minute).
- 

Blanširanje u vodi pri 85 °C provedeno je u fritezi (Tefal, Super Frituese, Francuska, 2000W). Prije samog postupka blanširanja, podešeno je da friteza vodu odnosno otopinu kalcijeva-klorida zagrije te nakon stavljanja krumpira održava na 85 °C. Blanširanje mikrovalovima provedeno je u mikrovalnoj pećnici (Gorenje MO20MW, Slovenija) pri maksimalnoj snazi uređaja od 700 W. Ultrazvučno blanširanje provedeno je u ultrazvučnoj kupelji (Elmasonic P 70H, Elma, Siegen, Njemačka) pri frekvenciji od 37 kHz i amplitudi 100%.



Slika 24. Ultrazvučna kupelj Elmasonic P 70H, Elma, Siegen, Njemačka

Blanširanja su provedena u vodi i 0,3%-tnoj otopini kalcijeva-klorida. Prilikom svih provedenih procesa blanširanja omjer krumpira i vode, odnosno krumpira i otopine kalcijeva-klorida bio je stalan (1:2).

### Prženje

Neposredno nakon pranja, guljenja i rezanja krumpira uzorci su prženi. Blanširani krumpiri su prije prženja stavljeni na papirnate ručnike kako bi se uklonio višak tekućine i nakon toga su prženi. Prženje uzoraka krumpira provedeno je na dva načina- prženje u dubokom ulju i prženje u struji vrućeg zraka.

Prženje u dubokom ulju provedeno je u fritezi (Tefal Versalio 7in1, FR 4900 70, Kina) koja je do oznake na uređaju bila napunjena uljem za prženje (Palm olein, Zvijezda). Primjenjena temperatura prženja bila je 180 °C, a vrijeme prženja 5 minuta. Po završetka prženja krumpiri su izvađeni na papirnate ručnike kako bi se uklonio suvišak masnoće.



Slika 25. Friteza za prženje (Tefal Versalio 7in1, FR 4900 70, Kina)

Prženje krumpira u struji vrućeg zraka provedeno je u fritezi za prženje na vrući zrak (Tefal, Actifry, FZ701015, Francuska) uz dodatak ulja (3 g) prema uputama za prženje krumpira priloženim uz uređaj. Za vrijeme prženja krumpir se kontinuirano miješa unutar friteze. Primjenjena temperatura prženja bila je 180 °C, a vrijeme prženja 21 minutu.



Slika 26. Friteza za prženje na vrući zrak (Tefal, Actifry, FZ701015, Francuska)

### 3.6.5. Određivanje udjela akrilamida UPLC-MS/MS metodom

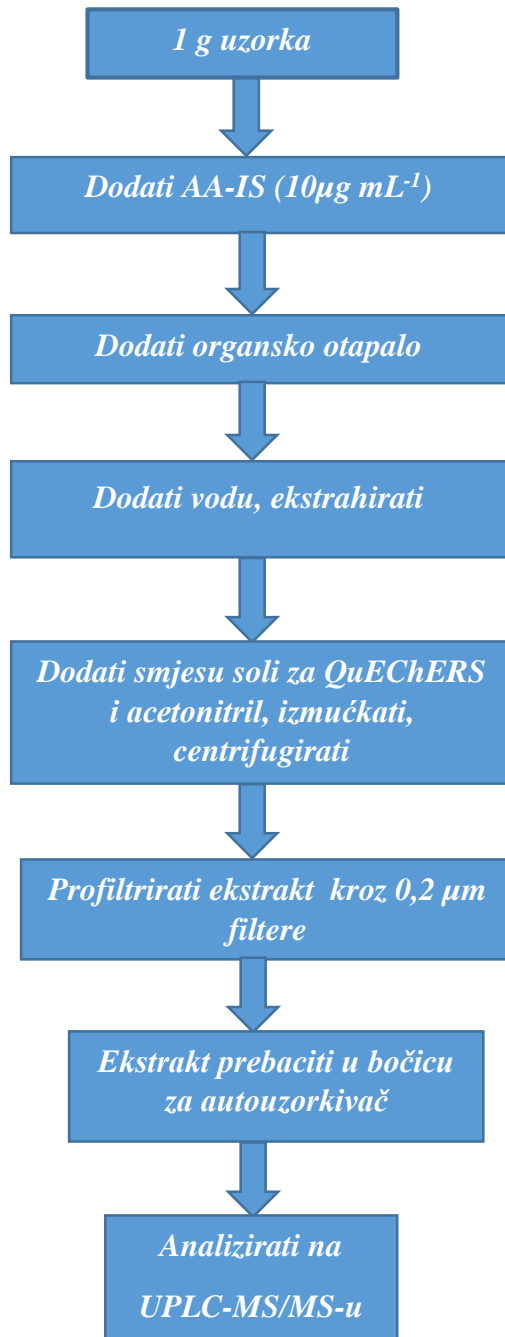
#### 3.6.5.1. Priprema standardnih otopina

Razrjeđivanjem certificiranog referentnog materijala u metanolu napravljene se standardne otopine masene koncentracije od 1,0-1,5 mg mL<sup>-1</sup>. Daljnjim razrjeđivanjem tako pripremljene standardne otopine u metanolu pripremljene su radne otopine standarda u koncentracijama 10 µg mL<sup>-1</sup> i 1 µg mL<sup>-1</sup>, kao i ostale otopine po potrebi, npr. za izradu kalibracijskog pravca. Tako pripremljene radne otopine standarda čuvaju se na tamnom i hladnom mjestu.

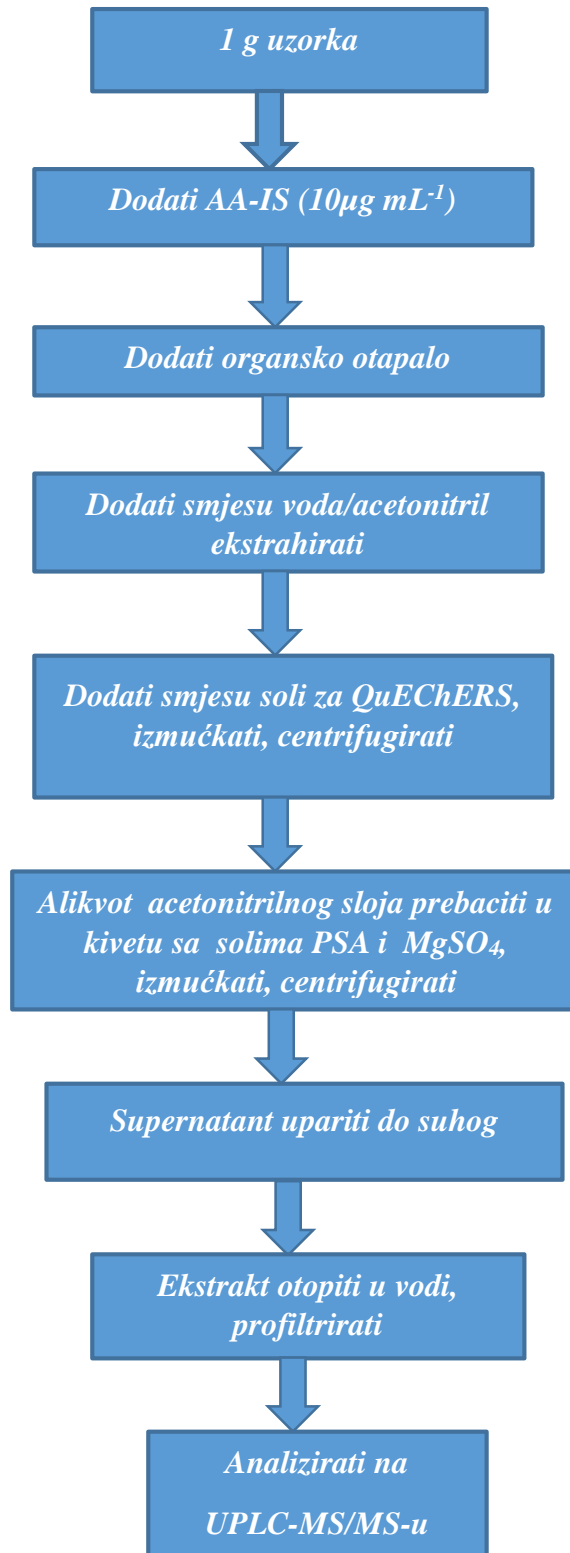
#### 3.6.5.2. Priprema uzoraka

Obzirom na primjenu nove Uredbe (EU) 2017/2158 o uspostavi mjera za ublažavanje učinaka i razina referentnih vrijednosti radi smanjenja prisutnosti akrilamida u hrani od 11.04.2018., došlo je do određenih promjena vezanih uz pripremu uzoraka za određivanje udjela akrilamida. Obzirom da su u novoj uredbi između ostalog izmjenjeni i zahtjevi vezani za granicu kvantifikacije metode za određivanje udjela akrilamida u prženim prehrambenim

proizvodima, validacijom metode određena je nova granica kvantifikacije od  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Kako bi se mogli ispuniti zahtjevi navedene uredbe u samom procesu pripreme uzoraka za određivanje udjela akrilamida došlo je do malih preinaka. Stoga su i uzorci u kojima se određivao udio akrilamida pripremani na dva načina prikazana na Slikama 27 i 28.



Slika 27. Priprema uzoraka za određivanje udjela akrilamida u uzorcima analiziranim u sklopu monitoringa



Slika 28. Priprema uzoraka za određivanje udjela akrilamida u prženim krumpirima



## 3.6.5.3. Uvjeti rada UPLC-MS/MS-a

Akrilamid je kvantitativno određen primjenom vezanog sustava UPLC-MS/MS (Slika 29.).

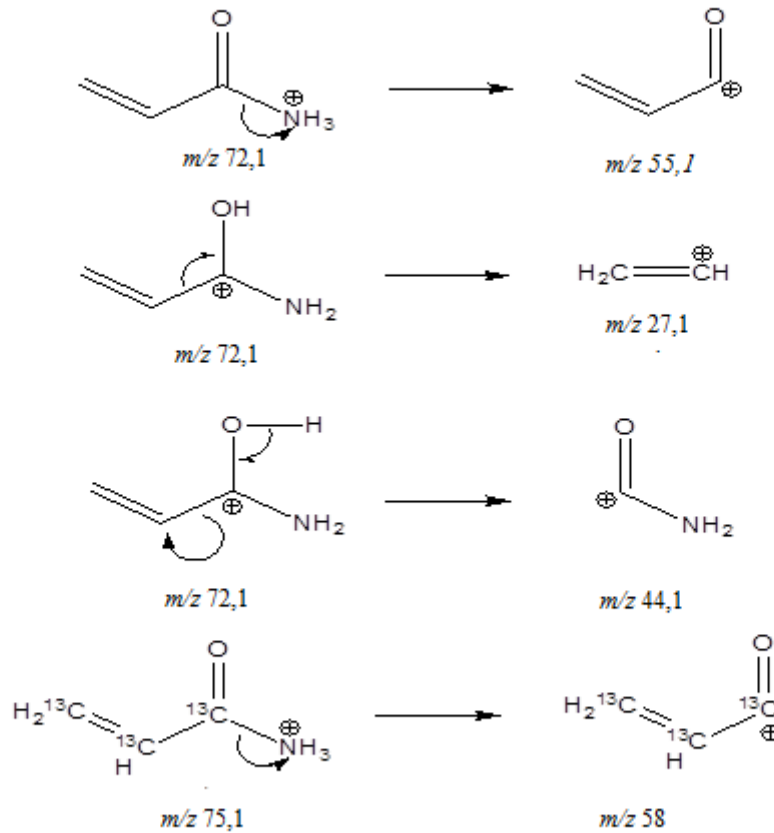


Slika 29. Vezani sustav tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti–tandemski spektrometar masa

Analiti su razdvojeni tekućinskom kromatografijom obrnutih faza na koloni Luna C18, pri čemu je primjenjeno gradijentno ispiranje. Temperatura kolone pri analizi održavana je na 30 °C. Volumen injektiranog uzorka bio je 10 µL. Mobilna faza se sastojala od otapala: A-0,1% otopina mravlje kiseline i B-metanol.

Metoda se bazira na praćenju praćenja odabranih reakcija (SRM), gdje se prate fragmentni ioni određenog  $m/z$  nastali disocijacijom protoniranog molekuskog iona  $[M+H]^+$  induciranom kolizijom s atomima inertnog plina.

Napon na kapilari postavljen je na 22 V, a kolizijska energija (eng. Collision energy, CE) je bila 10 V. Praćene su slijedeće tranzicije iona:  $m/z$  72,1→55,1;  $m/z$  72,1→44,1 i  $m/z$  72,1→27,1 za akrilamid, a tranzicija  $m/z$  75,1→58 za unutarnji standard  $^{13}C_3$ -akrilamid (Slika 30).



Slika 30. Odabrane tranzicije molekulskih iona akrilamida i unutarnjeg standarda akrilamida

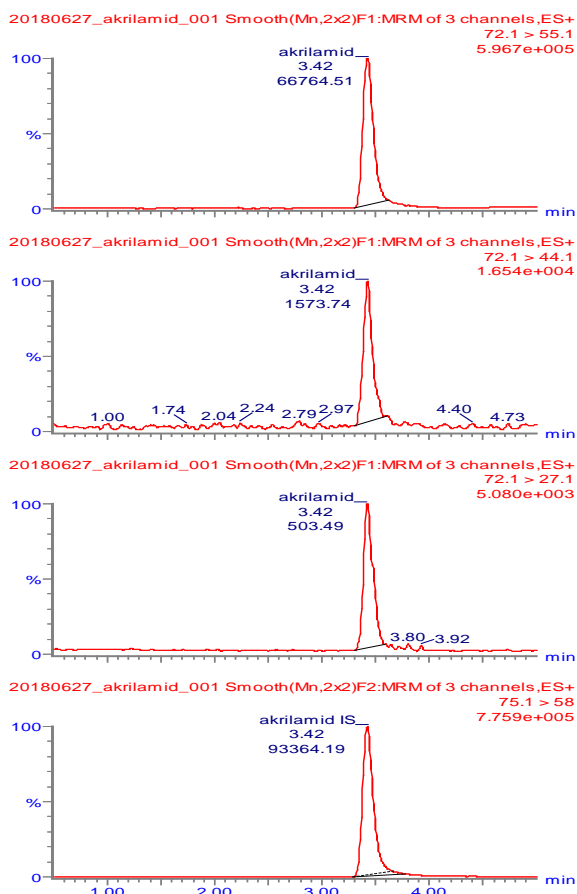
#### 3.6.5.4. Kvantitativno određivanje udjela akrilamida

Metoda za određivanje udjela akrilamida validirana je i akreditirana kao vlastita metoda. Metoda se primjenjuje za određivanje udjela akrilamida u prehrambenim proizvodima u količini većoj ili jednakoj  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Tijekom validacije metode postignuta je LOD od  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  i LOQ od  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , odnosno nakon stupanja na snagu nove uredbe postignuta je LOD od  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  i LOQ od  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Iskorištenja postupka pripreme nalaze se u rasponu od 75-110%, a preciznost metode pri uvjetima ponovljivosti bila je manja od 5%.

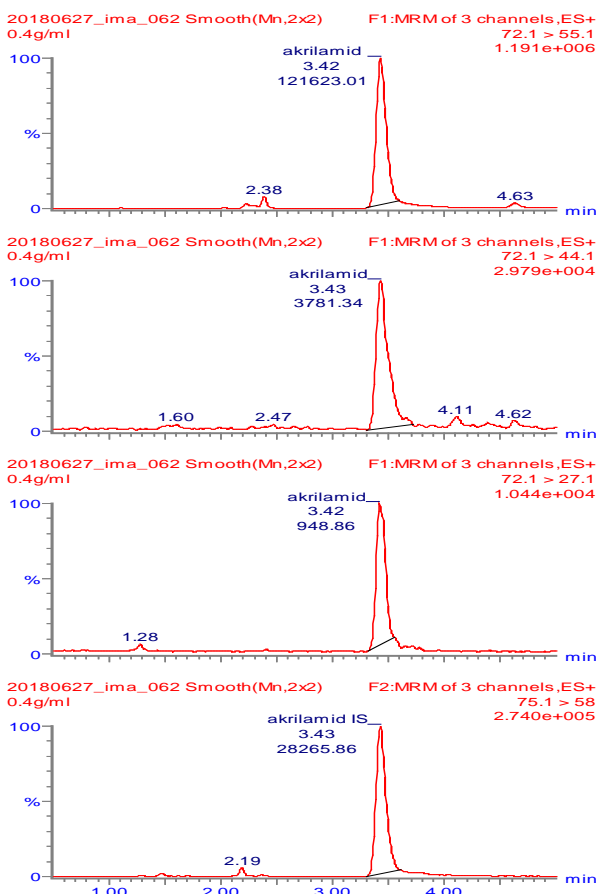
Prisutnost akrilamida u uzorku utvrđena je:

1. Usporedbom vremena zadržavanja pikova akrilamida i unutarnjeg standarda akrilamida u uzorku s vremenom zadržavanja pikova akrilamida i unutarnjeg standarda u radnom standardu (Slika 31.).

a) Standard akrilamida



b) uzorak prženog krumpira



Slika 31. Praćenje odabranih reakcija standarda akrilamida i unutarnjeg standarda (akrilamid IS) (a) i uzorka s određenim udjelom akrilamida i unutarnjeg standarda (b), uz RT=3,42;3,43.

2. Praćenjem odabranih prijelaza; induciranom kolizijom s atomima inertnog plina molekularni ion određenog  $m/z$  disocira na fragmentne ione točno određenog  $m/z$  (Slika 30.).

Kvantificiranje akrilamida u uzorku provedeno je primjenom metode unutarnjeg standarda. Primjenom metode unutarnjeg standarda smanjuje se utjecaj matriksa, iskorištenja i utjecaj odziva detektora. Količine prisutnog akrilamida u uzorku očitane su iz kalibracijskog pravca, izrađenog na osnovu odnosa odziva akrilamida i unutarnjeg standarda (eng. Response factor, RF) i masenog udjela akrilamida ( $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

$$RF = \frac{\text{Pov} \frac{AA}{IS} \text{ u uzorku}}{\text{Pov} \frac{AA}{IS} \text{ u uzorku s IS}} \times \gamma(AA-IS) \quad /4/$$

gdje je:

RF- omjer površina pika kvalifikacijskog iona (eng. Qualification ion, QI) akrilamida i QI-unutarnjeg standarda akrilamida, pomnožen s masenom koncentracijom unutarnjeg standarda akrilamida.

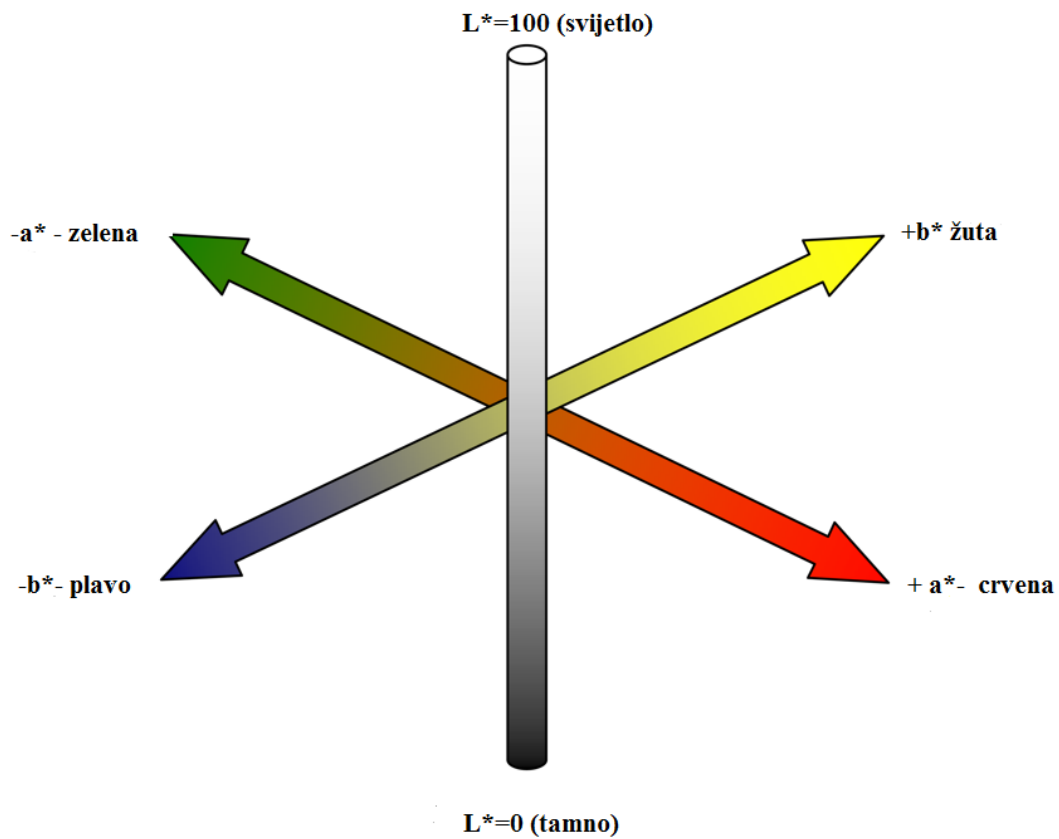
### 3.6.6. Kolorimetrijsko određivanje boje

Mjerenje boje u uzorcima krumpira nakon prženja u ulju i struji vrućeg zraka uz prethodnu toplinsku predobradu uzoraka primjenom različitih tehnika blanširanja određeno je kolorimetrom (CM-2500d, Konica Minolta, Japan) (Slika 31).



Slika 32. Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta, 2014)

Dobiveni podaci obrađeni su pomoću SpectraMagic NX softwera, po CIELAB sustavu boja koji se temelji na objektivnom vrednovanju boja, i koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko.



Slika 33. Prikaz načina očitavanja boja u CIELAB sustavu ([www.repro.grf.unizg.hr](http://www.repro.grf.unizg.hr))

Boja je prikazana vrijednostima:

L\*-određuje svjetloću uzorka, odnosno skalu sive boje, pri čemu je vrijednost 0 potpuno crna boja, a 100 potpuno bijela boja.

a\*-određuje udio zelene, odnosno crvene komponente i ima raspon od -100 do +100, gdje negativne vrijednosti označavaju približavanje zelenoj boji, a pozitivne vrijednosti približavanje crvenoj boji.

b\*-određuje udio žute, odnosno plave komponente ima isti raspon vrijednosti kao a\*, gdje negativne vrijednosti označavaju približavanje plavoj boji, a pozitivne vrijednosti približavanje žutoj boji.

Mjerenje boje uzoraka krumpira provedeno je odmah nakon završenog procesa prženja. Boja uzoraka krumpira mjerena je direktno na površini krumpira, a za svaki provedeni proces prženja i različite načine predobrade uzoraka parametri boje (L\*, a\* i b\* vrijednosti) određeni su na 7 uzoraka krumpira. Na temelju izmjerenih L\*, a\* i b\* vrijednosti računaju se promjene navedenih parametara boja kod uzoraka krumpira pripremljenih različitim postupcima prženja (sa ili bez prethodne predobrade-blanširanja) u odnosu na kontrolni uzorak (uzorak pržen u dubokom ulju bez prethodnog blanširanja)

Promjene parametara u odnosu na kontrolni uzorak računaju se prema slijedećim formulama:

$$\Delta L = L \text{ uzorak} - L \text{ kontrolni uzorak} \quad /5/$$

gdje : +  $\Delta L$  znači da je uzorak svjetliji od kontrolnog uzorka, a -  $\Delta L$  znači da je uzorak tamniji od kontrolnog uzorka

$$\Delta a = a \text{ uzorak} - a \text{ kontrolni uzorak} \quad /6/$$

gdje : +  $\Delta a$  znači da je uzorak crveniji od kontrolnog uzorka, a -  $\Delta a$  znači da je uzorak zeleniji od kontrolnog uzorka

$$\Delta b = b \text{ uzorak} - b \text{ kontrolni uzorak} \quad /7/$$

gdje : +  $\Delta b$  znači da je uzorak žući od kontrolnog uzorka, a -  $\Delta b$  znači da je uzorak plavlji od kontrolnog uzorka.

Ukupna promjena boje uzoraka krumpira računa se prema niže navedenoj formuli:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad /8/$$

$\Delta L = L$  uzorak –  $L$  kontrolni uzorak

gdje : +  $\Delta L$  znači da je uzorak svjetliji od kontrolnog uzorka, a -  $\Delta L$  znači da je uzorak tamniji od kontrolnog uzorka

$\Delta a = a$  uzorak –  $a$  kontrolni uzorak /9/

gdje : +  $\Delta a$  znači da je uzorak crveniji od kontrolnog uzorka, a -  $\Delta a$  znači da je uzorak zeleniji od kontrolnog uzorka

$\Delta b = b$  uzorak –  $b$  kontrolni uzorak /10/

gdje : +  $\Delta b$  znači da je uzorak žući od kontrolnog uzorka, a -  $\Delta b$  znači da je uzorak plavlji od kontrolnog uzorka.

Parametar  $\Delta E$  pokazuje koliko neki proizvod odstupa od referentne boje (Tablica 18.).

Tablica 18. Značenje razlike između izmjerene  $\Delta E$  vrijednosti i referentne vrijednosti (Xiao, 2008).

$\Delta E$	Značenje
0-0,5	<i>Razlike u tragovima</i>
0,5-1,5	<i>Mala razlika</i>
1,5-3,0	<i>Primjetna razlika</i>
3,0-6,0	<i>Značajna razlika</i>
6,0-12,0	<i>Velika razlika</i>
>12,0	<i>Vrlo velika razlika</i>

Kako bi se ispitala potencijalna povezanost parametara boje prženog krumpira i sadržaja akrilamida u njemu, provedena je regresijska analiza. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) korišteni su kao ulazni parametri modela kojem je cilj predvidjeti udio akrilamida a prema sljedećem odnosu:

$$AA_i = x_1 \cdot L_i^* + x_2 \cdot a_i^* + x_3 \cdot b_i^* + x_4 \quad /11/$$

Gdje je

AA – sadržaj akrilamida

$x_1, x_2, x_3, x_4$  - konstante modela

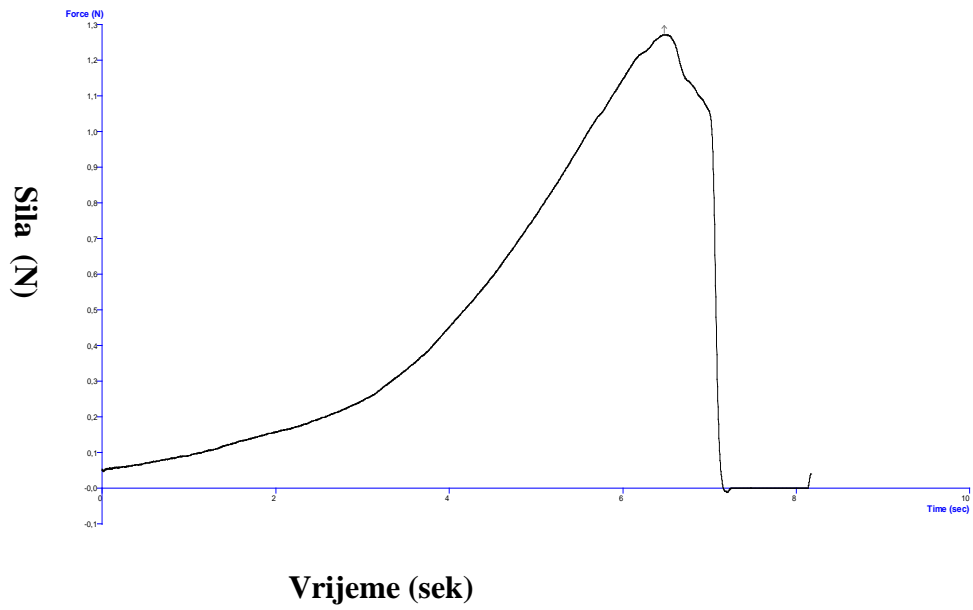
i-sorta krumpira

Ovaj oblik jednadžbe se može primijeniti na samo jednoj sorti krumpira (prema predprocesiranju i načinu prženja), a i kao opći model.

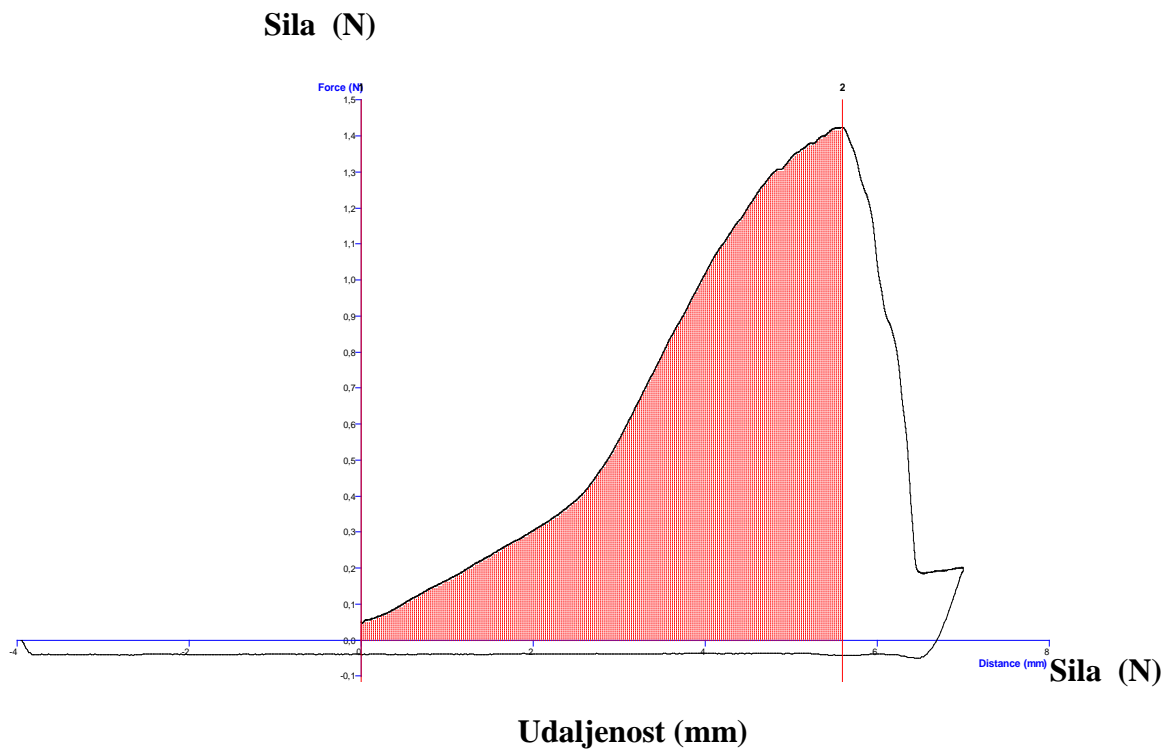
### 3.6.7. Određivanje teksturalnih svojstava

Mjerenje teksturalnih svojstava prženih krumpira određena je pomoću analizatora teksture (Slika 36.) Texture analyzer HD Plus (Stable Micro System, Velika Britanija) prema metodi koju su u svom radu opisali Heredia i sur. (2014). Mjerenja su provedena odmah nakon prženja i uklanjanja suviška masnoće, pri temperaturi konzumiranja (otprilike  $50 \pm 3$  °C). Mjerenja su provedena sondom promjera 2 mm i silaznom brzinom sonde  $1 \text{ mms}^{-1}$ . Koristeći TE 32 Texture Exponent određena je maksimalna sila (F max) izražena u N na osnovi dobivenih krivulja ovisnosti sile i udaljenosti (Slika 34 i 35.). Maksimalna sila definirana je kao sila koja je potrebna da sonda probije vanjski površinski sloj prženog krumpira. Za svaki način prženja krumpira (sa ili bez predobrade blanširanjem) provedeno je mjerenje na 7 nasumično odabranih uzoraka krumpira te je izračunata srednja vrijednost.





Slika 34. Karakterističan graf za određivanje tvrdoće i elastičnosti



Slika 35. Karakterističan graf za određivanje rada



Slika 36. Analizator teksture

### 3.6.8. Bliska infracrvena spektroskopija (NIR)

Infracrvena spektroskopija primjenjena je u svrhu određivanja, odnosno izrade kalibracijskog modela koji bi se mogao koristiti za predikciju udjela akrilamida u različitim kategorijama prehrambenih proizvoda (Tablica 14). NIR spektroskopija je brza i specifična tehnika čiji se princip rada zasniva na apsorpciji elektromagnetskog zračenja valne duljine u rasponu od 780-2500 nm. NIR spekter hrane obuhvaća široko skupove koji proizlaze iz preklapanja odgovarajućeg uglavnom overtona i kombinacija vibracijskih vrpca koji uključuju C-H, O-HH i N-H kemijske veze.



Slika 37. NIR instrument spojen na računalo sa instaliranim programom SPEC-32 (a), izvor zračenja (b) i sonda (c)

Za snimanje spektara uzoraka koristio se NIR spektrometar modela Control Development Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50  $\mu\text{m}$  s instaliranim Control Development software-om SPEC 32 (Slika 37). NIR spektri su snimljeni u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm. Snimanje se provelo sondom na površini proizvoda bez prethodne pripreme uzoraka. Za svaki uzorak snimljena su tri spektra, a za daljnju obradu koristio se prosjek spektara. Svaki spektar snimljen je u izvornom obliku te nakon primjene funkcije umekšavanja (eng. smoothing) programa SPEC32.

### 3.6.9. Statistička analiza

Multivarijatna analiza eksperimentalnih podataka dobivenih NIR spektroskopijom i LC-MS metodom određivanja akrilamida provedena je korištenjem XLSTAT statističkog računalnog programa (verzija 2018.5, Addinsoft) za MS Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i programa Unscrambler X (verzija 10.4, CAMO Software AS., Oslo, Norway).

Podaci o uzorcima korišteni u ovom radu činili su dvije matrice. Matrice podataka sa kojima se radilo sadržavale su podatke o NIR spektrima, kodirane podatke o vrsti uzoraka (Tablica 21) te podatke o sadržaju akrilamida (Tablica 20). Svaki uzorak sniman je tri puta te je izračunata srednja vrijednost što rezultira sa 4 retka podataka za svaki uzorak. Jedna matrica sadržavala je izvorne NIR spektre, a druga NIR spektre nakon primjene funkcije umekšavanja programa SPEC 32. To je činilo dvije matrice dimenzija 96 redaka i 800 stupaca za matricu s izvornim NIR spektrom i 199 redaka i 776 stupaca za matricu s originalnim NIR spektrom.

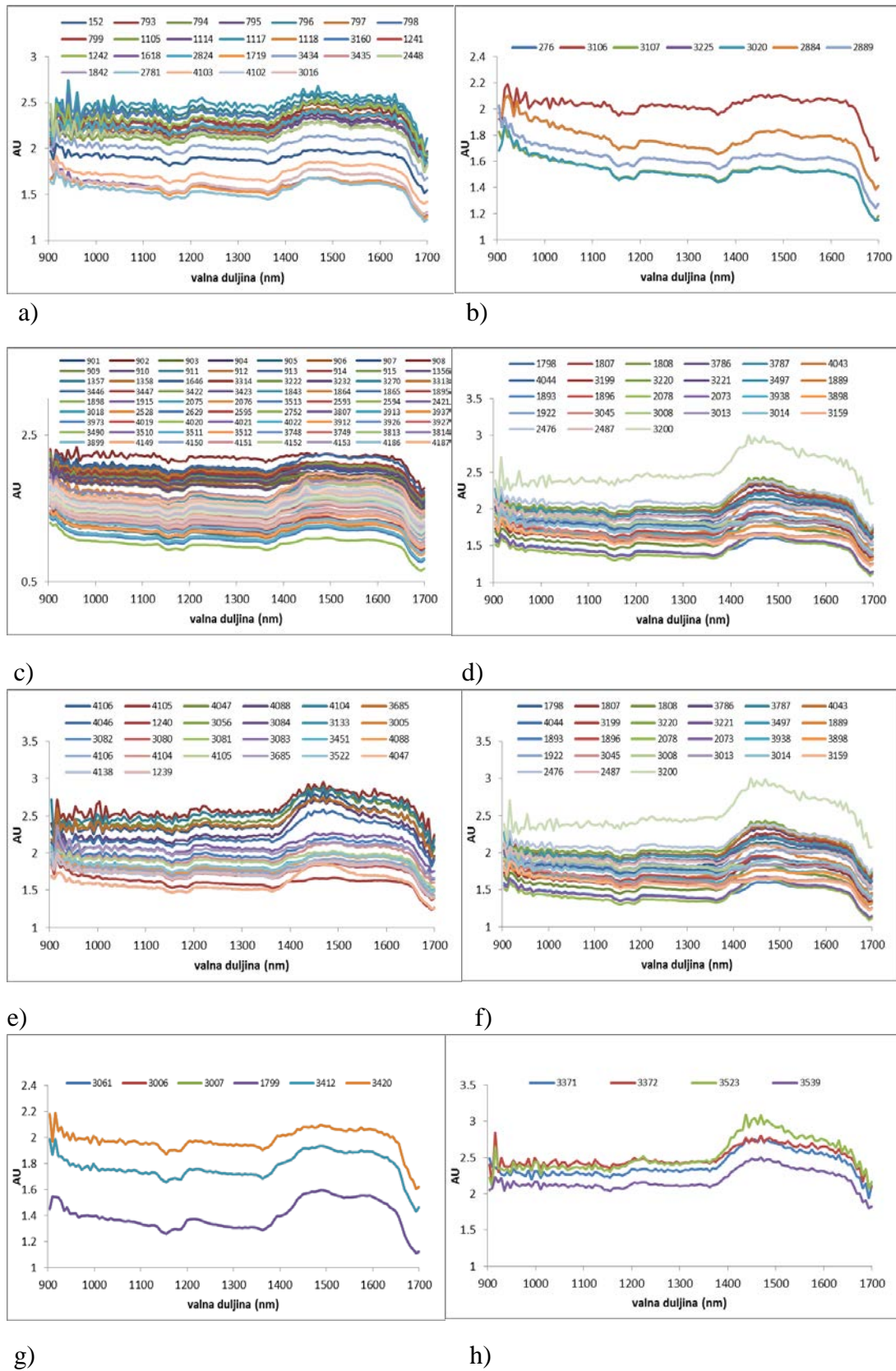
Program XLSTAT korišten je za analizu glavnih komponentata (PCA), provedbu linearne diskriminantne analize (LDA).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Prisutnost akrilamida u hrani na tržištu RH

Tablica 19. Udio akrilamida u uzorcima analiziranim u sklopu monitoringa primjenom UPLC-MS/MS metode u periodu od 2016-2017 godine

Kategorije uzoraka	Broj uzoraka	Najniži udio AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Najviši udio AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Indikativne vrijednosti ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	% uzoraka iznad dozvoljenih vrijednosti prema 2013/647/EU
Čips	25	152	4353	1000	19,2
Pomfrit	20	127	1680	600	20
Kruh, peciva i hruskavi kruh	30	<50	464	150 do 450	10
Vafli, grickalice, krekeri i keksi	96	<50	982	500	11,6
Kave i zamjene za kavu	8	302	920	450 do 2000	0
Žitarice za doručak	10	<50	375	200 do 400	10
Proizvodi na bazi žitarica za djecu	6	<50	67	50 do 200	0



Slika 38. NIR spektri za različite kategorije uzoraka: a) krumpirov čips i čips od krumpirovog tijesta; b) kava i zamjene za kavu; c) vafli, grickalice, krekeri i keksi; d) kruh, peciva,

hruskavi kruh; e) pomfrit; f) žitarice za doručak; g) proizvodi na bazi žitarica za djecu i h) meso i riba

Tablica 20. Matrica LDA analize kategorije proizvoda

Stvarno \ predvideno	1	2	3	4	5	6	7	8	Ukupno	Stopa točnosti (%)
1=Čips	25	0	0	0	0	0	0	0	25	100,00%
2=Kava i zamjene za kavu	0	8	0	0	0	0	0	0	8	100,00%
3=vafli,grickalice, krekeri i keksi	0	95	1	0	0	0	0	0	96	1,04%
4=Kruh, peciva i hruskavi kruh	0	0	0	30	0	0	0	0	30	100,00%
5=pomfrit	0	0	0	0	20	0	0	0	20	100,00%
6=žitarice za doručak	0	0	0	0	0	10	0	0	10	100,00%
7=proizvodi na bazi žitarica za djecu	0	0	0	0	0	0	6	0	6	100,00%
8=proizvodi na bazi mesa i riba	0	0	0	0	0	0	0	4	4	100,00%
<b>Ukupno</b>	25	103	1	30	20	10	6	4	199	52,74%

Tablica 21. Matrica LDA analize udjela akrilamida iznad  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ 

stvarno\ predvideno	AA>500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AA<500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ukupno	Stopa točnosti (%)
AA>500	41	0	41	100,00%
AA<500	7	151	158	95,63%
Ukupno	48	151	199	96,52%

#### 4.2. Udio prekursora akrilamida u različitim sortama krumpira

Tablica 22. Udjeli prekursora akrilamida i suhe tvari u različitim sortama krumpira

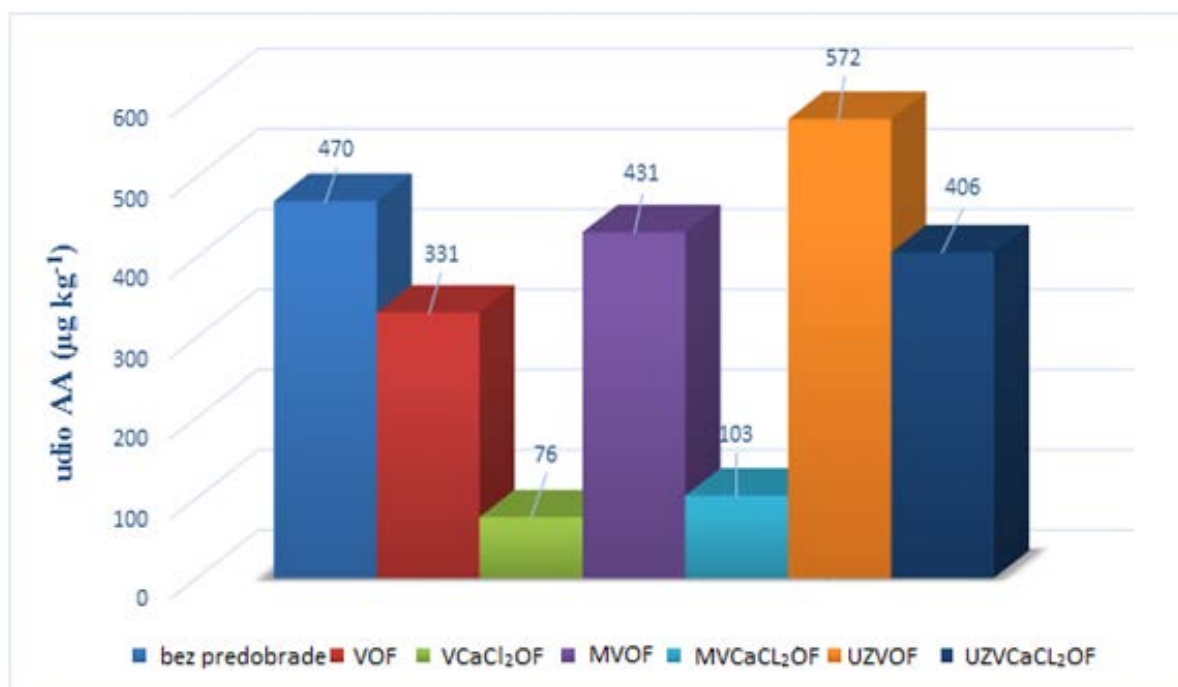
Sorta krumpira	Udio glukoze ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Udio fruktoze ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Udio saharoze ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Udio asparagina ( $\text{g kg}^{-1}$ )	Suha tvar ( $\text{g}/100\text{g}$ )
Spunta	3,1	2,0	1,9	0,0751	19,58
Artemis	2,4	2,0	3,3	0,0404	17,45
Soraya	3,3	4,7	3,2	0,0727	20,4
Blue salad	2,9	2,5	2,0	0,0744	16,99
Sante	1,2	1,3	2,2	0,0636	24,52

### 4.3. Utjecaj inovativnih procesnih tehnika na udio akrilamida u prženom krumpiru

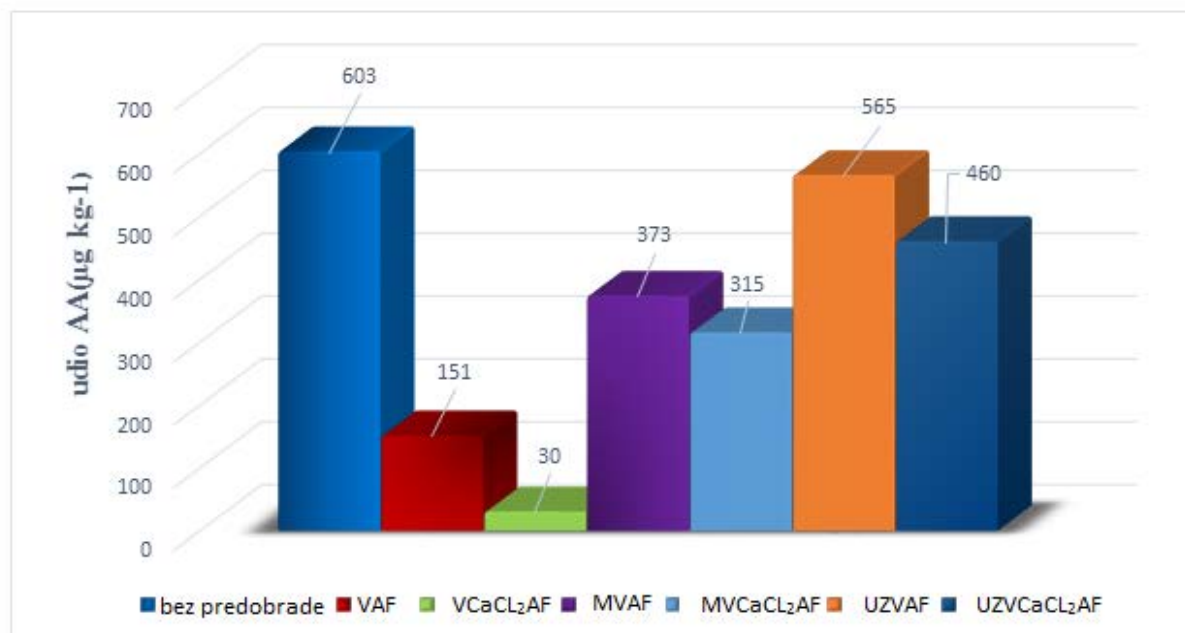
Tablica 23. Udjeli akrilamida u različitim sortama krumpira nakon primjene različitih inovativnih tehnika predobrade i obrade

Različite tehnike toplinske predobrade i obrade	Sorta Sante AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Sorta Blue salad AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Sorta Spunta AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Sorta Artemis AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Sorta Soraya AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<b>OF</b>	470	1076	800	1106	1482
<b>AF</b>	603	442	1000	1300	1518
<b>VOF</b>	331	950	154	1033	1072
<b>VAF</b>	151	450	310	533	930
<b>VCaCl<sub>2</sub>OF</b>	76	1005	336	338	235
<b>VCaCl<sub>2</sub>AF</b>	30	216	289	468	289
<b>MVOF</b>	431	526	715	1200	1300
<b>MVAF</b>	373	657	734	357	1100
<b>MVCaCl<sub>2</sub>OF</b>	103	357	550	734	119
<b>MVCaCl<sub>2</sub>AF</b>	315	441	332	468	652
<b>UZVOF</b>	572	1055	813	721	1224
<b>UZVAF</b>	565	986	708	838	1220
<b>UZVCaCl<sub>2</sub>OF</b>	406	973	246	316	1094
<b>UZVCaCl<sub>2</sub>AF</b>	460	193	510	1187	1010

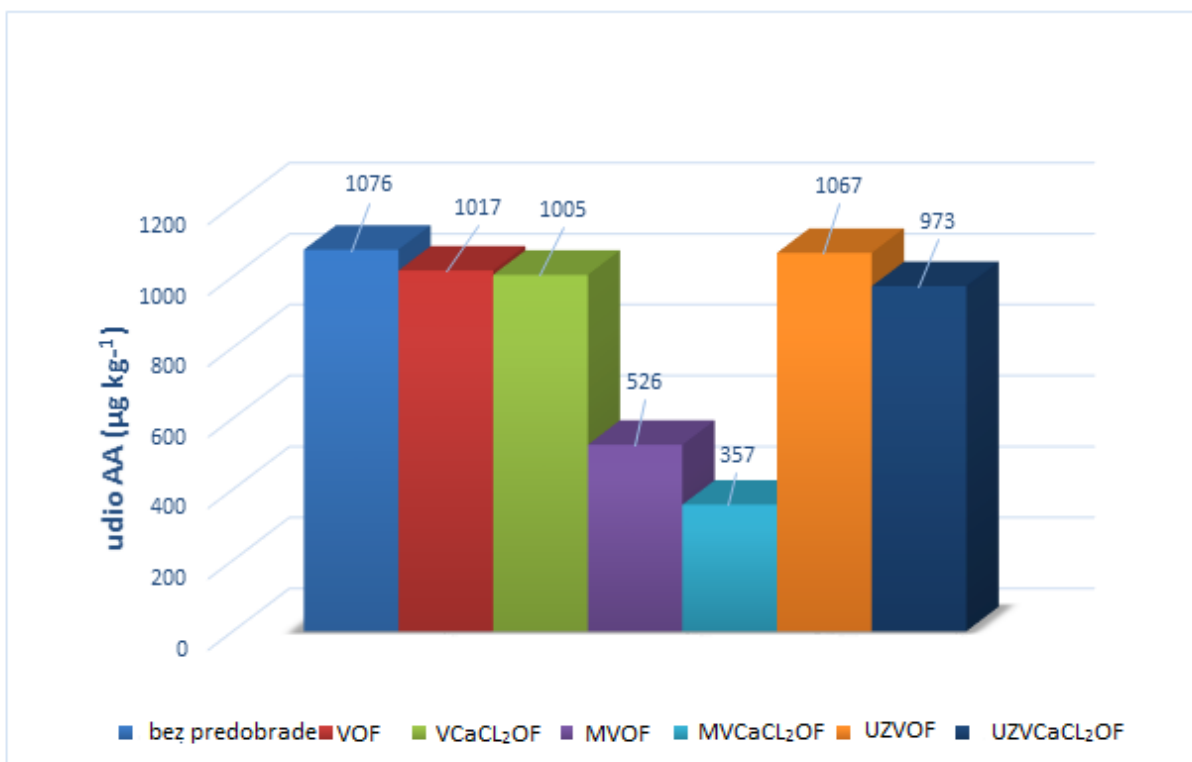




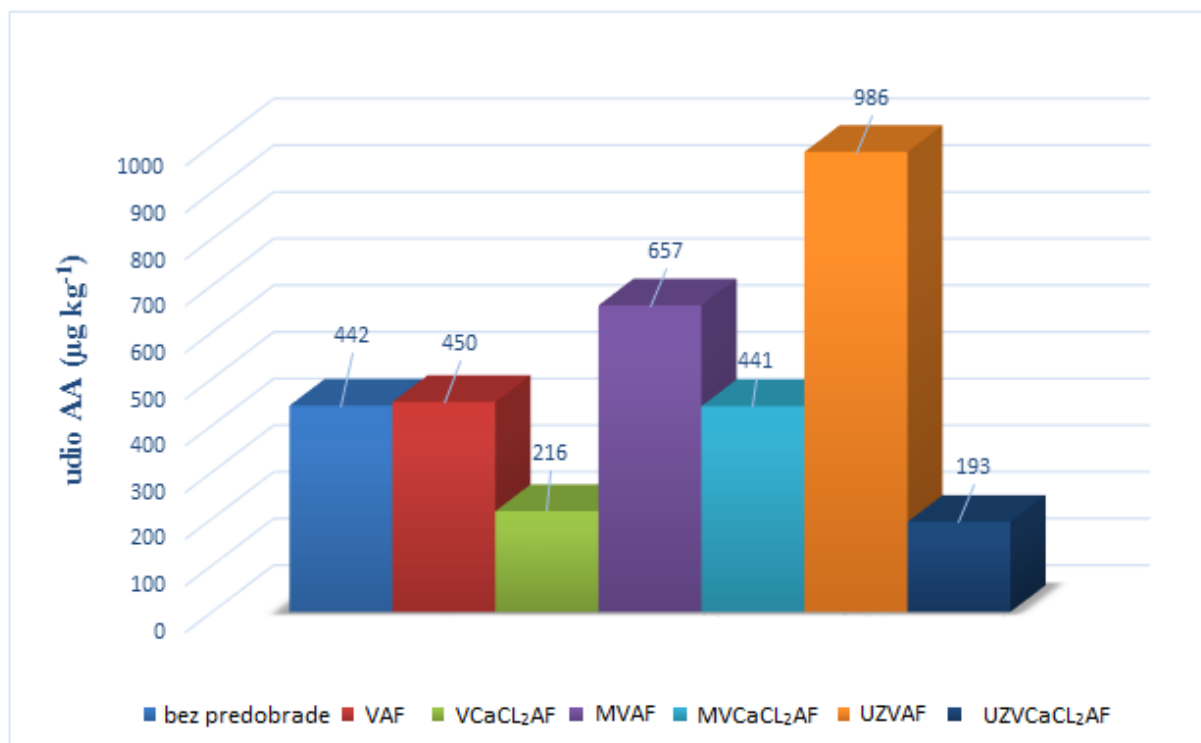
Slika 39. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima krumpira sorte Sante prženim u dubokom ulju



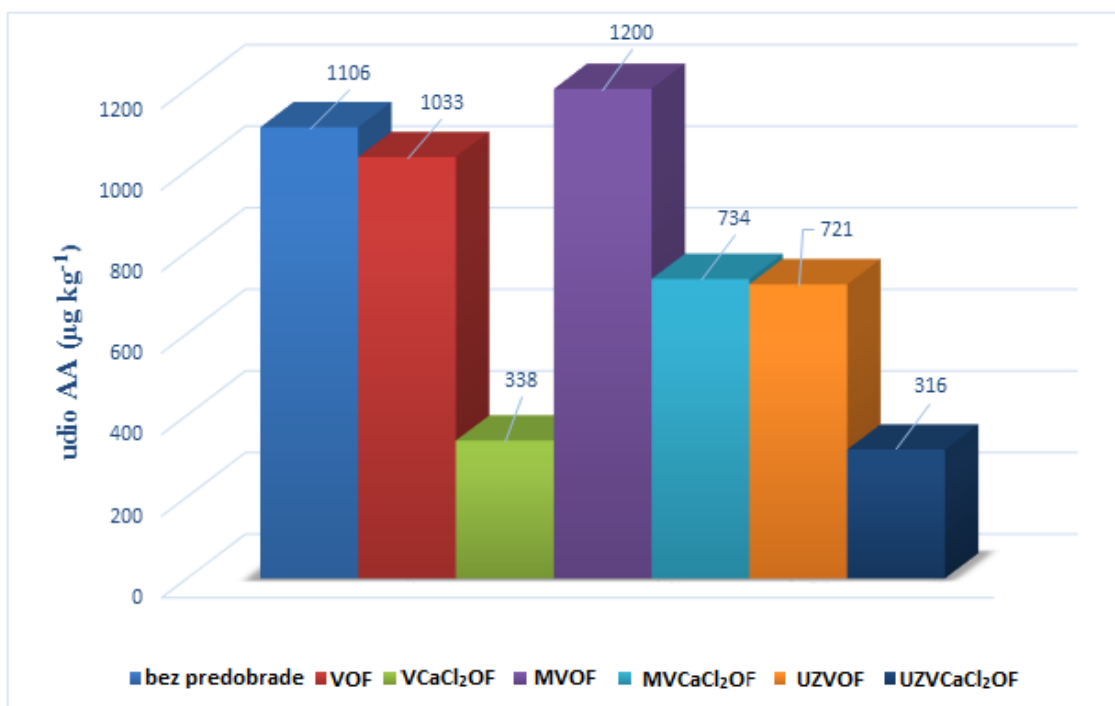
Slika 40. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Sante prženim u struji vrućeg zraka



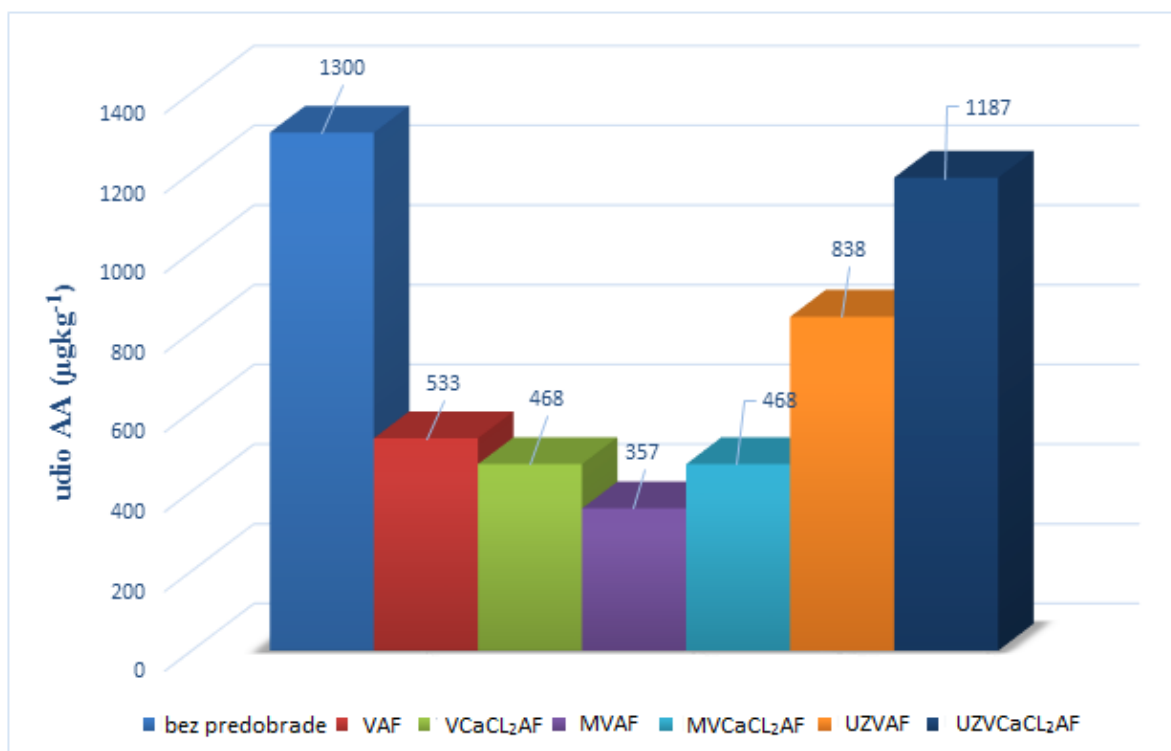
Slika 41. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Blue salad prženim u ulju



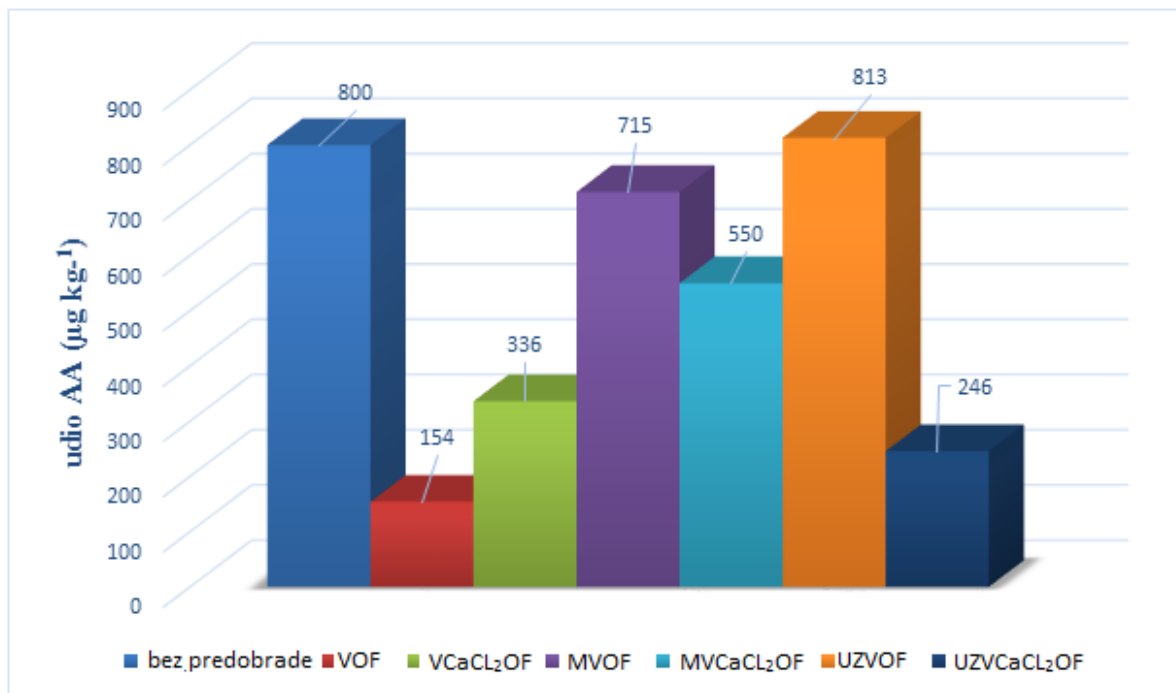
Slika 42. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Blue salad prženim u struji vrućeg zraka



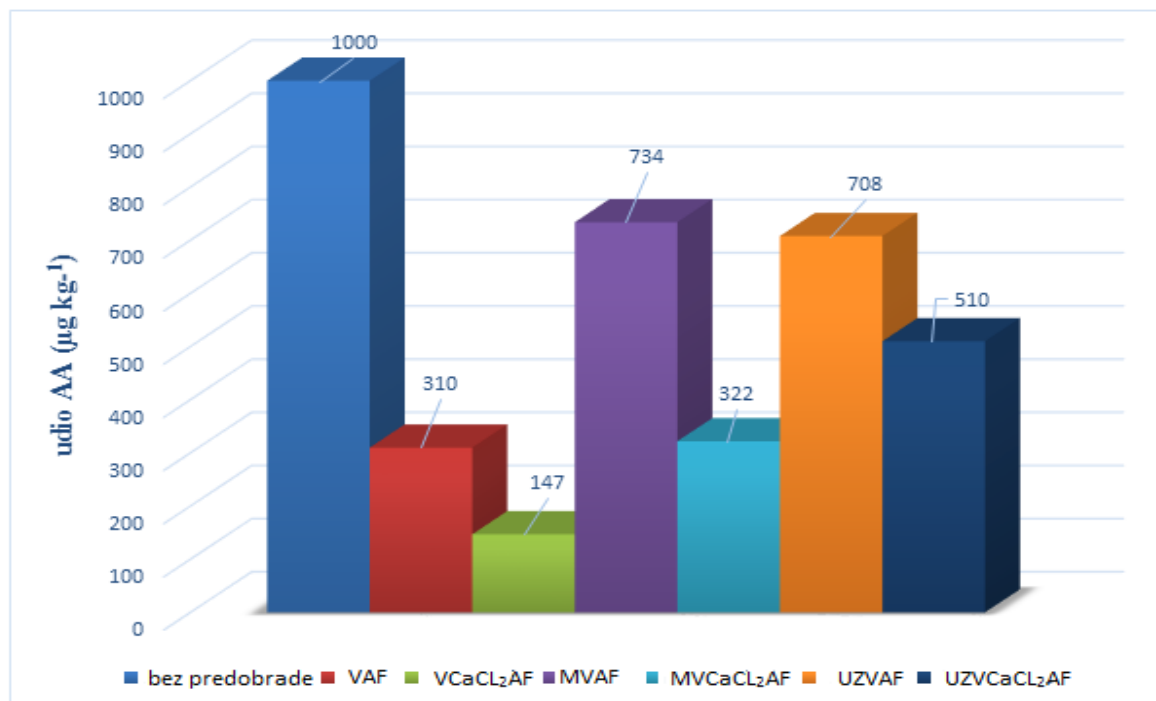
Slika 43. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Artemis prženim u ulju



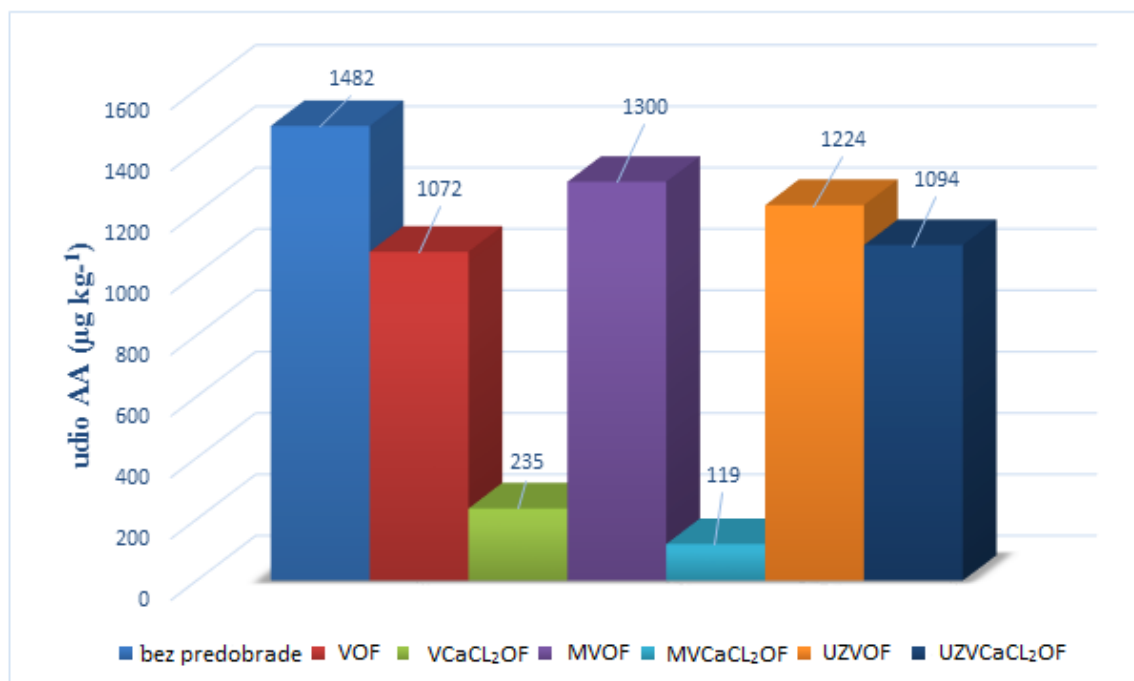
Slika 44. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Artemis prženim u struji vrućeg zraka



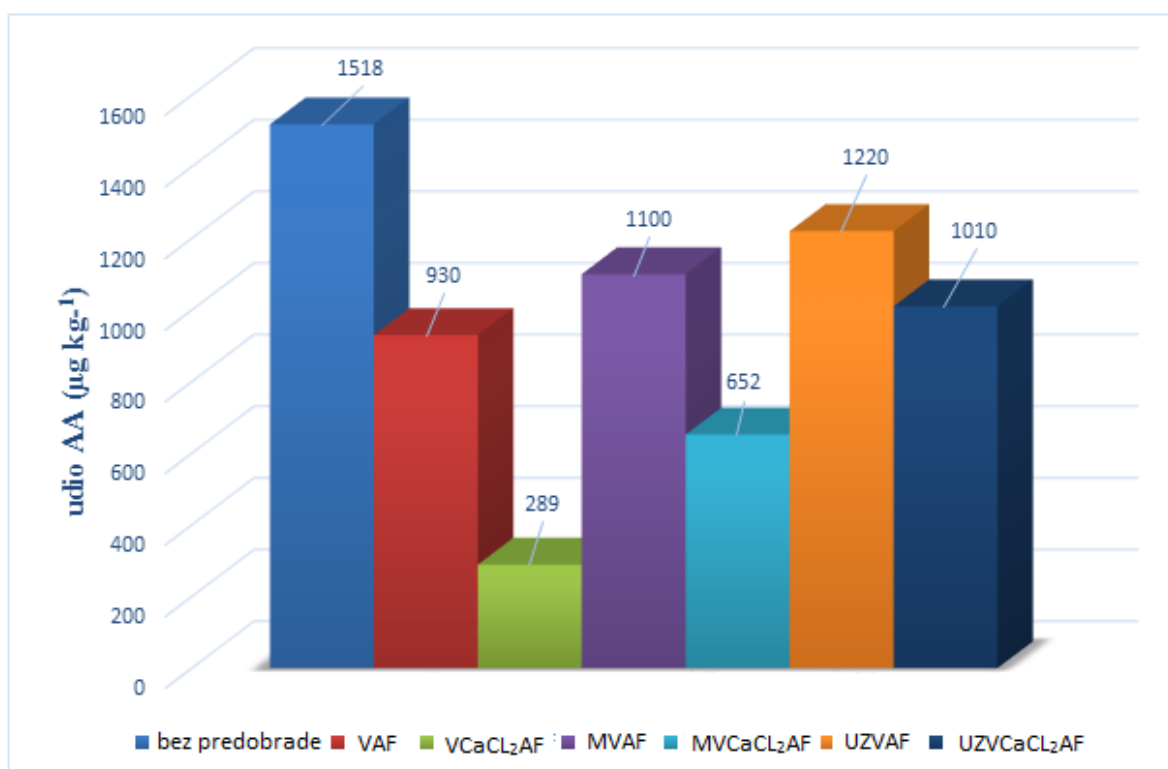
Slika 45. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Spunta prženim u ulju



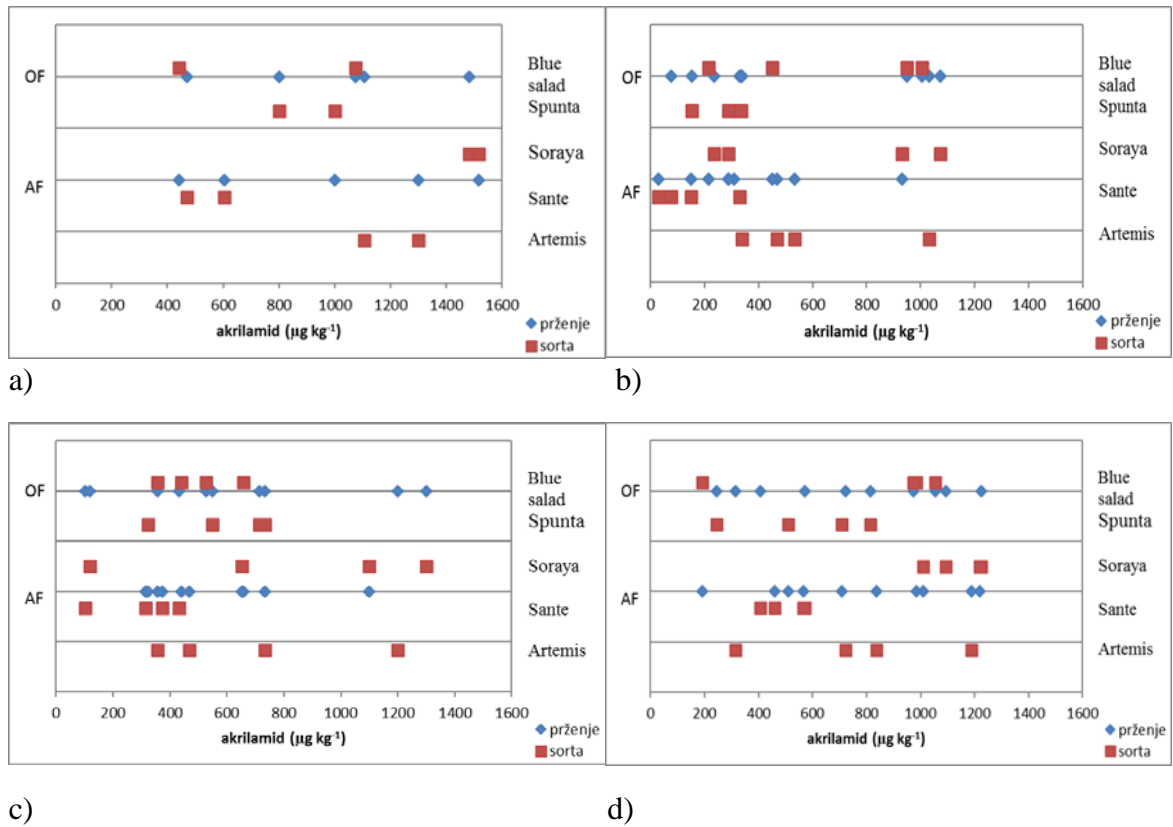
Slika 46. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Spunta prženim u struji vrućeg zraka



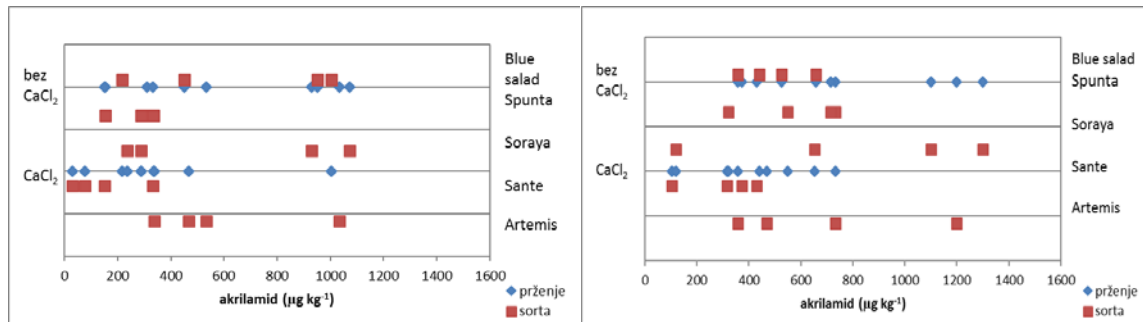
Slika 47. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Soraya prženim u ulju



Slika 48. Utjecaj različitih načina blanširanja na udio akrilamida u uzorcima sorte Soraya prženim u struji vrućeg zraka

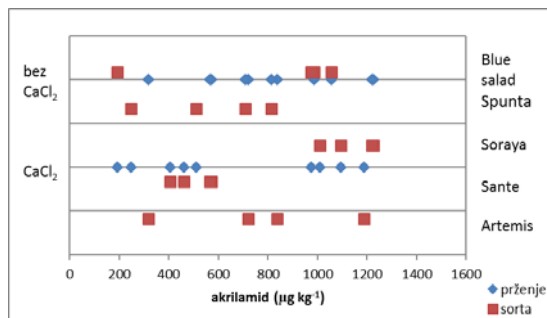


Slika 49. Udio akrilamida u krumpiru različitih sorti u ovisnosti o načinu blanširanja i prženja: (a) bez blanširanja; (b) blanširanje u vodi; (c) blanširanje mikrovalovima; (d) blanširanje ultrazvukom



a)

b)



c)

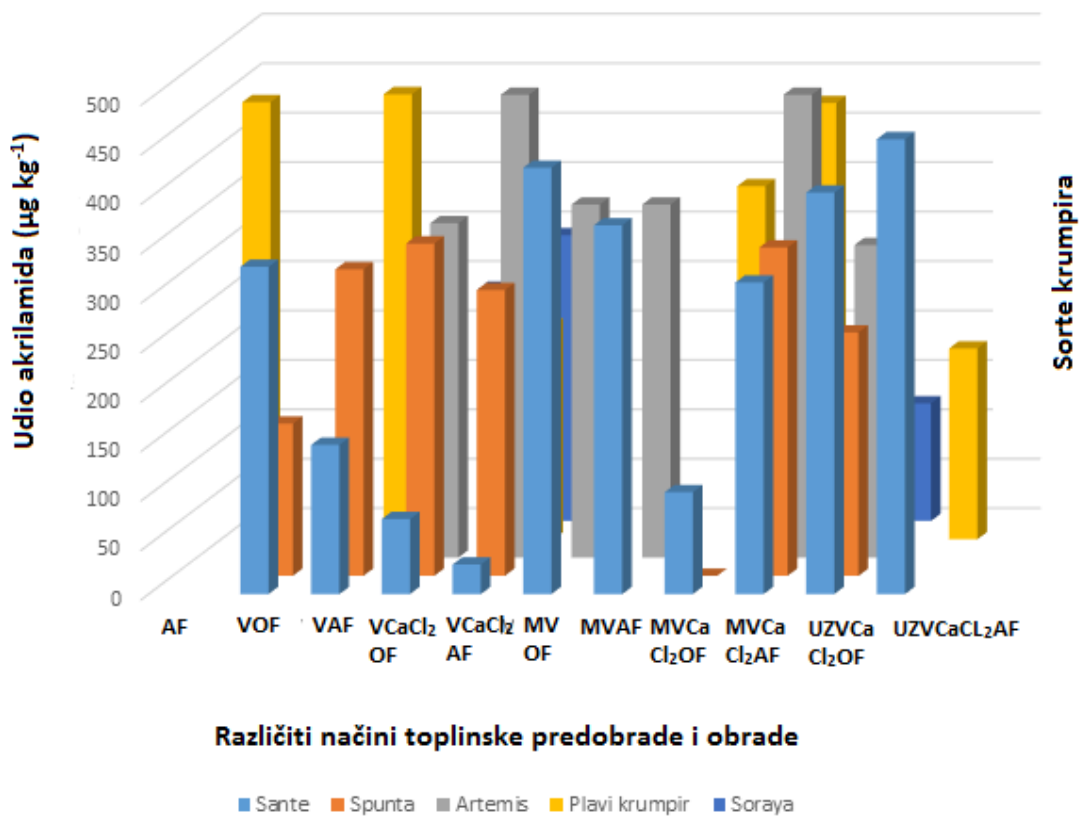
Slika 50. Udio akrilamida u krumpiru različitih sorti u ovisnosti o načinu blanširanja i dodatku kalcij klorida: a) blanširanje u vodi; b) blanširanje mikrovalovima; c) blanširanje ultrazvukom

#### 4.4. Smanjenje udjela akrilamida u uzorcima prženog krumpira

Tablica 24. Postignuto smanjenje udjela akrilamida (%) u različitim sortama krumpira u usporedbi s kontrolnim uzorkom prženim u dubokom ulju

Način toplinske predobrade i obrade	Sorta Artemis smanjenje udjela AA (%)	Sorta Blue salad smanjenje udjela AA (%)	Sorta Spunta smanjenje udjela AA (%)	Sorta Soraya smanjenje udjela AA (%)	Sorta Sante smanjenje udjela AA (%)
AF	-	59	-	-	-
VOF	21	12	81	28	30
VAF	52	58	61	39	68
VCaCl <sub>2</sub> OF	59	7	58	84	84
VCaCl <sub>2</sub> AF	55	80	64	82	94
MVOF	-	51	11	12	8,3
MVAF	68	39	8	26	21
MVCaCl <sub>2</sub> OF	34	67	31	92	78
MVCaCl <sub>2</sub> AF	58	59	35	57	33
UZVOF	35	2,0	58	18	-
UZVAF	24	8,5	11	18	-
UZVCaCl <sub>2</sub> OF	71	10	69	28	14
UZVCaCl <sub>2</sub> AF	-	82	36	32	2,2





Slika 51. Uzorci različitih sorti krumpira s postignutim smanjenjem udjela akrilamida ispod referentne vrijednosti

#### 4.5. Boja prženih krumpira

Tablica 25. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) i ukupna razlika boje ( $\Delta E$ ) u uzorcima krumpira sorte Artemis nakon primjene različitih tehnika toplinske predobrade i obrade

Sorta krumpira	Različite tehnike toplinske predobrade i obrade	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
ARTEMIS	OF	45,11	10,00	28,15	
	AF	38,60	7,09	24,70	7,92
	VOF	51,16	3,53	25,88	9,14
	VAF	53,07	-0,96	18,94	17,07
	VCaCl <sub>2</sub> OF	45,13	1,02	22,0	10,88
	VCaCl <sub>2</sub> AF	46,57	-2,42	15,82	17,56
	MVOF	53,01	2,72	26,29	10,9
	MVAF	60,73	-1,61	18,88	21,56
	MVCaCl <sub>2</sub> OF	50,66	1,00	24,51	11,18
	MVCaCl <sub>2</sub> AF	46,24	0,40	19,67	12,86
	UZVOF	35,94	3,59	16,60	16,08
	UZVAF	47,48	-0,90	14,96	17,28
	UZVCaCl <sub>2</sub> OF	45,52	2,18	21,09	10,55
	UZVCaCl <sub>2</sub> AF	49,58	-0,28	19,23	14,33

Tablica 26. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) i razlika ukupne boje ( $\Delta E$ ) u uzorcima krumpira sorte Spunta nakon primjene različitih tehnika toplinske predobrade i obrade

Sorta krumpira	Različite tehnike toplinske predobrade i obrade	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
SPUNTA	OF	62,19	2,51	23,03	
	AF	51,01	1,30	20,06	11,63
	VOF	54,00	-0,72	22,05	8,86
	VAF	58,71	-0,88	20,72	5,38
	VCaCl <sub>2</sub> OF	57,81	0,92	25,66	5,35
	VCaCl <sub>2</sub> AF	57,69	-1,95	21,58	6,5
	MVOF	55,95	1,81	26,36	7,11
	MVAF	50,08	-1,27	17,83	13,7
	MVCaCl <sub>2</sub> OF	58,56	1,04	24,04	4,05
	MVCaCl <sub>2</sub> AF	56,37	-1,56	17,36	9,09
	UZVOF	58,01	0,28	22,16	4,82
	UZVAF	56,65	-1,10	14,76	10,59
	UZVCaCl <sub>2</sub> OF	50,1	0,12	18,79	8,73
	UZVCaCl <sub>2</sub> AF	56,80	-0,62	16,91	13,03

Tablica 27. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) i razlika ukupne boje ( $\Delta E$ ) u uzorcima krumpira sorte Soraya nakon primjene različitih tehnika toplinske predobrade i obrade

Sorta krumpira	Različite tehnike toplinske predobrade i obrade	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
SORAYA	OF	54,40	2,54	23,68	
	AF	53,28	0,22	19,59	4,83
	VOF	55,22	1,96	26,66	3,16
	VAF	55,95	-0,69	21,40	4,25
	VCaCl <sub>2</sub> OF	45,14	0,53	22,20	9,58
	VCaCl <sub>2</sub> AF	46,76	-1,49	19,59	9,56
	MVOF	46,58	5,26	27,98	9,32
	MVAF	54,97	-0,30	21,60	3,56
	MVCaCl <sub>2</sub> OF	49,88	-1,28	22,25	6,09
	MVCaCl <sub>2</sub> AF	55,75	-0,68	24,50	3,59
	UZVOF	50,22	1,81	22,18	4,50
	UZVAF	46,44	0,14	17,17	10,56
	UZVCaCl <sub>2</sub> OF	48,22	3,48	25,06	12,2
	UZVCaCl <sub>2</sub> AF	46,76	-1,49	19,59	9,56

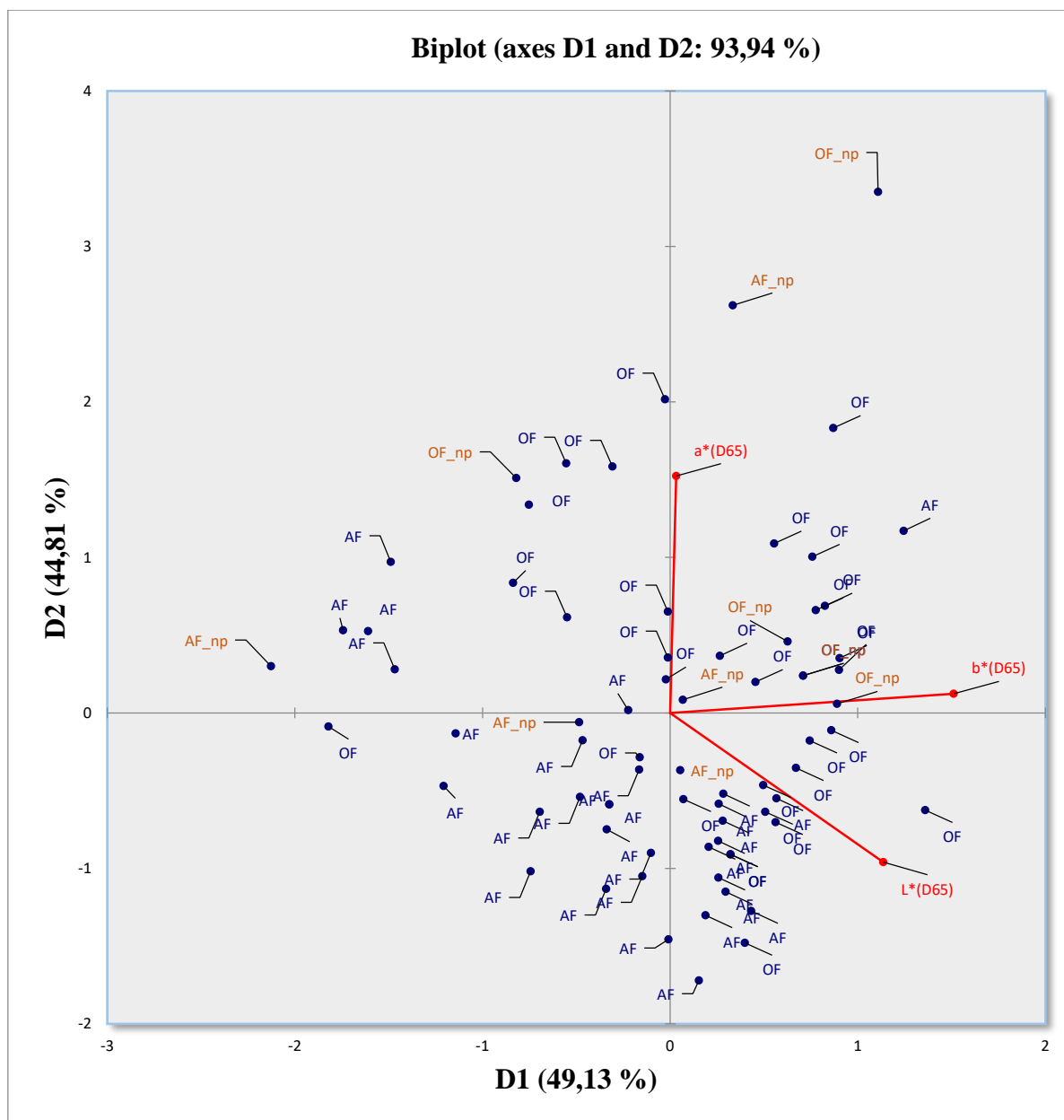
Tablica 28. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) i razlika ukupne boje ( $\Delta E$ ) u uzorcima krumpira sorte Sante nakon primjene različitih tehnika toplinske predobrade i obrade

Sorta krumpira	Različite tehnike toplinske predobrade i obrade	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
<b>SANTE</b>	OF	55,92	1,98	24,25	
	AF	50,08	0,03	18,1	8,70
	VOF	64,93	-0,06	28,43	10,14
	VAF	57,83	-2,58	23,37	5,02
	VCaCl <sub>2</sub> OF	57,93	-3,24	23,39	5,65
	VCaCl <sub>2</sub> AF	59,54	-3,34	20,14	7,63
	MVOF	56,30	-0,01	24,94	2,14
	MVAF	55,77	-1,22	21,02	4,54
	MVCaCl <sub>2</sub> OF	55,15	-1,36	25,16	3,54
	MVCaCl <sub>2</sub> AF	57,21	-1,67	21,22	4,92
	UZVOF	54,83	4,22	28,97	5,33
	UZVAF	59,58	0,01	21,74	4,85
	UZVCaCl <sub>2</sub> OF	52,77	2,63	25,96	3,68
	UZVCaCl <sub>2</sub> AF	57,11	-0,84	20,72	4,67

Tablica 29. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) i razlika boje ( $\Delta E$ ) u uzorcima krumpira sorte Blue salad nakon primjene različitih tehnika toplinske predobrade i obrade

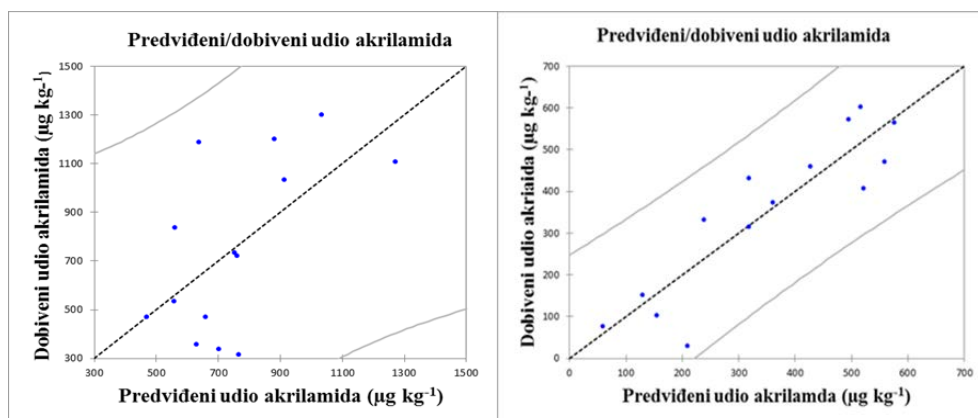
Sorta krumpira	Različite tehnike toplinske predobrade i obrade	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
<b>BLUE SALAD</b>	OF	37,39	4,66	14,55	
	AF	36,58	2,22	2,62	12,2
	VOF	45,46	2,89	14,98	8,27
	VAF	47,10	0,43	8,84	12,03
	VCaCl <sub>2</sub> OF	43,22	5,48	16,87	6,33
	VCaCl <sub>2</sub> AF	40,20	3,05	5,96	9,18
	MVOF	38,18	0,70	6,13	9,34
	MVAF	46,77	1,47	9,01	11,35
	MVCaCl <sub>2</sub> OF	42,91	3,56	12,63	5,95
	MVCaCl <sub>2</sub> AF	37,25	2,59	6,16	8,64
	UZVOF	37,24	4,53	17,53	2,99
	UZVAF	32,85	2,72	10,73	6,24
	UZVCaCl <sub>2</sub> OF	41,58	5,20	20,11	7,13
	UZVCaCl <sub>2</sub> AF	40,08	1,91	8,26	5,98

## 4.5.1. PCA analiza parametara boje



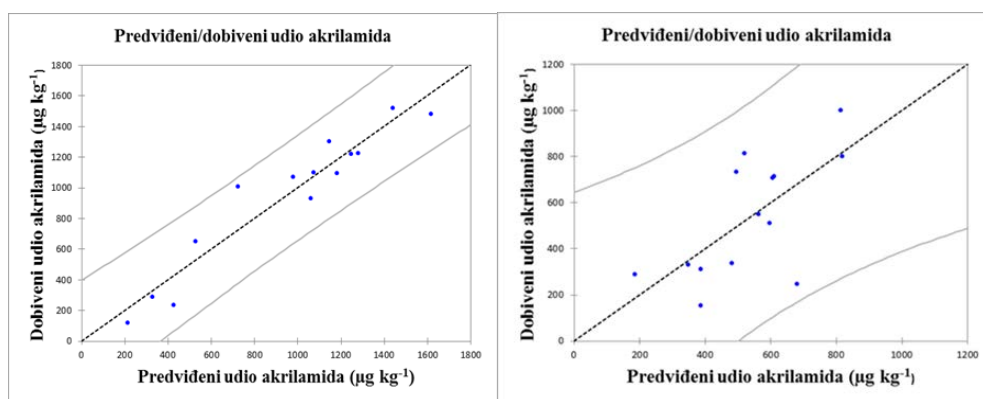
Slika 52. Analiza glavnih komponenti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  za sve sorte krumpira prženog u ulju i struji vrućeg zraka

## 4.5.2. Regresijska analiza



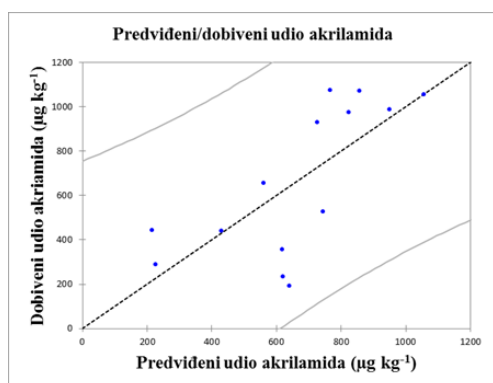
a)

b)



c)

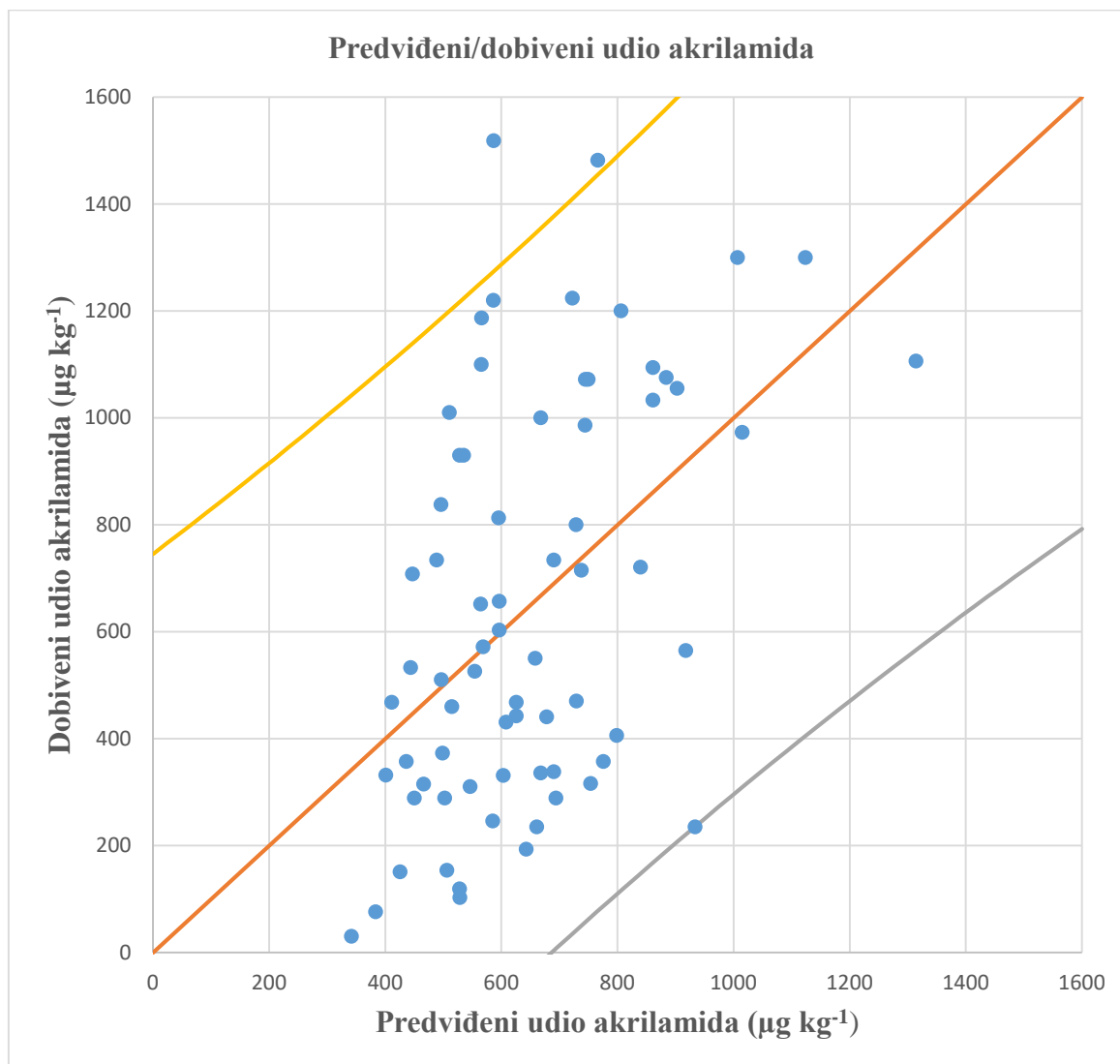
d)



e)

Slika 53. Regresijski modeli za predviđanje udjela akrilamida u različitim sortama krumpira:  
 a) Artemis; b) Sante; c) Soraya; d) Spunta i e) Blue salad





Slika 54. Skupni regresijski model za predviđanje udjela akrilamida u svim analiziranim sortama

Predikcijski modeli za izračun akrilamida na osnovu parametara boje za pojedinačne sorte:

**Artemis:**  $Y1 = 207,20069 + 6,65079 * L * (D65) + 59,41010 * a * (D65) + 6,07250 * b * (D65)$

**Sante:**  $Y1 = 909,24740 + 9,35047 * L * (D65) + 106,49137 * a * (D65) - 44,71044 * b * (D65)$

**Soraya:**  $Y1 = 192,60814 + 83,54182 * L * (D65) + 331,11981 * a * (D65) - 167,26035 * b * (D65)$

**Spunta:**  $Y1 = 1733 - 6,14075 * L * (D65) + 161,29346 * a * (D65) - 40,67171 * b * (D65)$

**Blue salad:**  $Y1 = 1638 - 33,92397 * L * (D65) - 184,92250 * a * (D65) + 86,61112 * b * (D65)$

I za sve sorte zajedno:

$Y1 = 600,25314 - 3,79989 * L * (D65) + 63,42855 * a * (D65) + 8,91235 * b * (D65)$

#### 4.6. Tekstura toplinski obrađenih proizvoda od krumpira

Tablica 30. Parametri teksture za prženi krumpir sorte Artemis

Blanširanje	AF			OF		
	$F_{\max}$ (N)	E (mm)	$W_{\max}$ (Nmm)	$F_{\max}$ (N)	E (mm)	$W_{\max}$ (Nmm)
-						
<b>Bez blanširanja</b>	0,77	6,05	2,92	0,56	2,64	1,54
<b>Blanširanje u vodi</b>	0,78	2,57	3,15	0,49	5,95	0,7
<b>Blanširanje u vodi uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	1,46	6,98	3,49	1,17	3,91	2,29
<b>Mikrovalno blanširanje</b>	1,10	4,42	1,95	0,57	2,95	0,84
<b>Mikrovalno blanširanje uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	1,27	7	4,26	0,78	4,26	1,27
<b>Ultrazvučno blanširanje</b>	0,99	5,32	1,98	0,8	2,65	1,29
<b>Ultrazvučno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub></b>	3,2	7	4,16	1,36	5,95	2,68

Tablica 31. Parametri teksture za prženi krumpir sorte Blue salad

Blanširanje	AF			OF		
	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)
-						
<b>Bez blanširanja</b>	4,83	5,59	13,19	1,24	2,55	1,56
<b>Blanširanje u vodi</b>	1,53	5,55	3,14	1,95	3,63	2,74
<b>Blanširanje u vodi uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	2,04	5,86	5,40	2,50	5,13	5,26
<b>Mikrovalno blanširanje</b>	1,81	6,00	3,52	1,58	2,81	2,29
<b>Mikrovalno blanširanje uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	2,65	3,16	4,43	2,00	2,84	2,70
<b>Ultrazvučno blanširanje</b>	0,87	4,75	2,31	0,94	5,63	2,58
<b>Ultrazvučno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub></b>	3,61	6,47	8,84	1,69	2,35	1,52

Tablica 32. Parametri teksture za prženi krumpir sorte Sante

Blanširanje	AF			OF		
	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)
-						
<b>Bez blanširanja</b>	1,16	2,51	1,61	0,65	3,97	1,18
<b>Blanširanje u vodi</b>	0,81	7,00	3,18	1,38	3,94	2,38
<b>Blanširanje u vodi uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	1,60	3,01	2,16	0,71	3,62	1,30
<b>Mikrovalno blanširanje</b>	1,98	6,98	6,85	1,75	3,89	3,08
<b>Mikrovalno blanširanje uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	2,77	5,50	6,24	1,28	3,77	2,65
<b>Ultrazvučno blanširanje</b>	1,14	2,82	1,49	1,99	6,82	6,15
<b>Ultrazvučno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub></b>	2,83	5,61	6,93	2,40	6,06	5,08

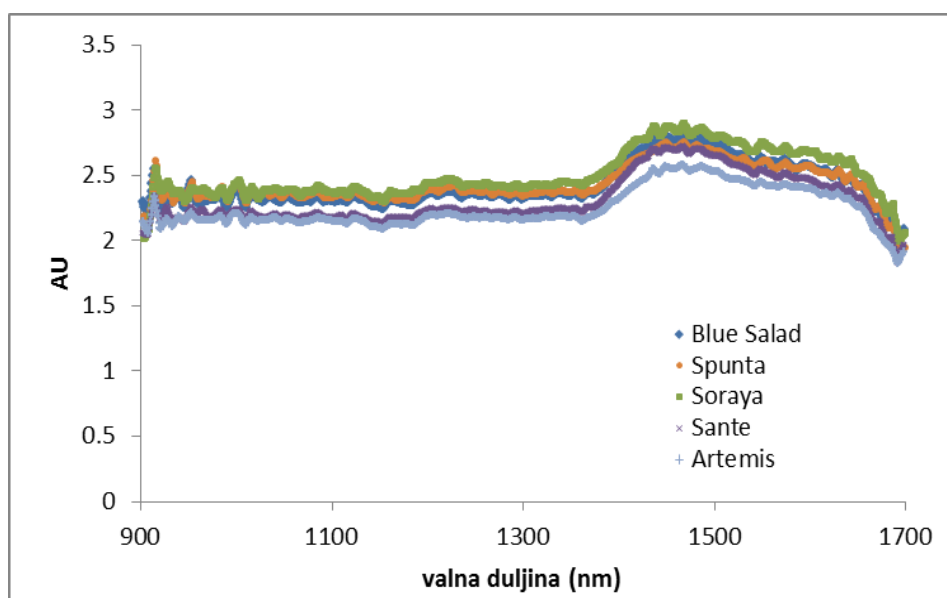
Tablica 33. Parametri teksture za prženi krumpir sorte Soraya

Blanširanje	AF			OF		
	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)
-						
<b>Bez blanširanja</b>	2,08	5,33	3,79	1,29	2,72	1,76
<b>Blanširanje u vodi</b>	1,50	3,93	2,69	0,73	4,61	2,11
<b>Blanširanje u vodi uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	1,49	5,75	4,16	1,02	4,62	2,60
<b>Mikrovalno blanširanje</b>	1,02	5,73	3,69	0,70	2,75	1,06
<b>Mikrovalno blanširanje uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	1,49	6,97	5,83	1,03	3,23	1,63
<b>Ultrazvučno blanširanje</b>	0,73	7,00	2,91	0,63	3,82	1,32
<b>Ultrazvučno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub></b>	2,32	5,25	6,72	2,00	6,99	5,31

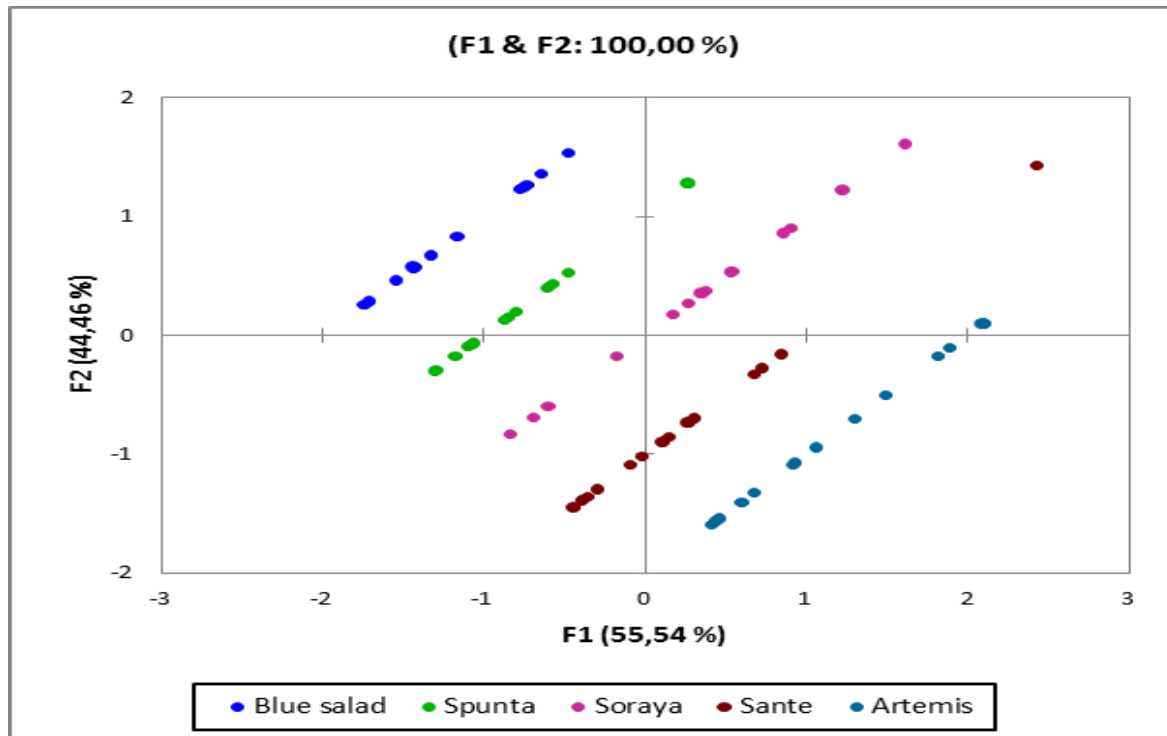
Tablica 34. Parametri teksture za prženi krumpir sorte Spunta

Blanširanje	AF			OF		
	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)	F <sub>max</sub> (N)	E (mm)	W <sub>max</sub> (Nmm)
-						
<b>Bez blanširanja</b>	2,13	5,61	4,93	1,25	4,08	2,24
<b>Blanširanje u vodi</b>	2,16	5,20	4,50	0,94	2,87	1,33
<b>Blanširanje u vodi uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	2,92	4,89	5,29	1,26	3,91	2,60
<b>Mikrovalno blanširanje</b>	1,37	7,00	4,66	1,12	2,78	1,41
<b>Mikrovalno blanširanje uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub></b>	1,93	7,00	3,26	1,32	6,46	4,42
<b>Ultrazvučno blanširanje</b>	1,93	7,00	5,75	0,93	6,99	4,09
<b>Ultrazvučno blanširanje uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub></b>	2,59	6,90	7,61	2,40	4,66	5,91

#### 4.7. Kemometrija kao dodatni alat u obradi NIR spektara



Slika 55. NIR spektri za pržene krumpire različitih sorti



Slika 56. Analiza glavnih komponenti za NIR spektre prženih krumpira različitih sorti

Tablica 35. Matrica LDA analize za prženi krumpir različitih sorti

stvarno \ procijenjeno	AA>500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	AA<500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	ukupno	Stopa točnosti %
AA>500	43	0	43	100,00%
AA<500	0	27	27	100,00%
Ukupno	48	153	201	100,00%



## 5. RASPRAVA

### 5.1 Prisutnost akrilamida u hrani na tržištu RH

Od kada je 2002. godine otkrivena prisutnost akrilamida u hrani (Tareke i sur., 2002), a obzirom na činjenicu da je prethodno potvrđena njegova neurotoksičnost kod ljudi (WHO, 2005) te kancerogenost kod glodavaca i štakora (Beland i sur., 2013), Europska Agencija za sigurnost hrane (EFSA) od 2007. godine prikuplja podatke od država članica EU o udjelu akrilamida u određenim kategorijama hrane za koje je poznato da sadrže visoke razine akrilamida i/ili doprinose unosu akrilamida putem prehrane. Od 2013. godine i Republika Hrvatska kao jedna od članica Europske Unije (EU) sudjeluje u monitoringu. Uzorci se analiziraju u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, a dobiveni rezultati se preko Hrvatske agencije za hranu (HAH) prikupljaju i šalju Europskoj agenciji za sigurnost hrane. Na temelju prikupljenih podataka za period od 2007-2011. godine Europska Komisija je postavila „Indikativne vrijednosti“ za udio akrilamida u različitim kategorijama hrane (2013/647/EU). Rezultati prikazani u Tablici 19, od kojih je veći dio napravljen u okviru monitoringa, njih 185, odnose se na period od 2016. do 2017. godine i ocjenjivani su prema tada važećoj Uredbi (2013/647/EU). Od ukupno 195 analiziranih uzoraka, najveći broj, njih 96, bilo je iz kategorije vafli, grickalice, krekeri i keks, od čega su analizirana 64 uzorka keksa, 8 uzoraka vafli, 7 krekeri i 17 uzoraka različitih grickalica. Najmanji broj uzoraka bio je iz kategorije proizvodi na bazi žitarica za djecu, njih 6, od čega su svi bili dječji keksi. U kategoriji kruh, peciva i hruskavi kruh, analizirana su ukupno 24 uzorka kruha, 4 hruskavog kruha i 2 uzorka peciva.

Najviši udjeli akrilamida dobiveni su analiziranjem uzoraka čipsa i pomfrita (Tablica 20), što je i očekivano s obzirom da krumpir sadrži visoke udjele prekursora akrilamida (Zhang i Zhang, 2007), a i temperature prženja (>120 °C) pogoduju razvoju Maillardovih reakcija i nastanku akrilamida (Matthäus i Hasse, 2014). Dobivene vrijednosti u skladu su s dostupnim literaturnim podacima prema kojima se vrijednosti akrilamida u krumpirovom čipsu i pomfritu mogu kretati od 59 do 5200 µg kg<sup>-1</sup> (Krishnakumar i Visvanathan, 2014).

U kategoriji kruh, peciva i hruskavi kruh najviši udio akrilamida koji iznosi  $464 \mu\text{g kg}^{-1}$  pronađen je u kruhu sa sjemenkama koji je dobiven od mješavine raženog i pšeničnog brašna. Recepti, odnosno odabir sirovine za izradu kruha igra veliku ulogu kod nastanka akrilamida (Mesias i Morales, 2016). Navedeni kruh je napravljen iz mješavine raženog brašna koje sadrži visoke udjele aminokiseline asparagin (Tablica 10) koja se smatra odgovornom za nastanak akrilamida u proizvodima od žitarica (Surdyk i sur., 2004; Levine i Smith, 2005). Sjemenke na površini kruha također su prema istraživanjima Ozolina i suradnika (2011) mogle značajno doprinijeti povećanju udjela akrilamida u konačnom proizvodu.

U kategoriji vafli, grickalice, krekeri i keksi najviši udio akrilamida pronađen je u keksima (Tablica 20), i u skladu je sa srednjim vrijednostima za udio akrilamida prema izvješćima EFSE za tu kategoriju (Tablica 11).

U kategoriji kava i zamjene za kavu, najviši udio akrilamida pronađen je uzorku zamjena za kavu na bazi cikorijske. Smatra se da je udio akrilamida u kavi i zamjenama za kavu povezan s udjelom asparagina u početnoj sirovini (Mesias i Morales, 2016). Dobivena vrijednost u skladu je sa srednjim vrijednostima za udio akrilamida prema izvješćima EFSE za tu kategoriju (Tablica 13.).

U kategoriji žitarice za doručak najviši udio akrilamida pronađen je u žitaricama za doručak na bazi kukuruza, i u skladu je sa srednjim vrijednostima za udio akrilamida prema izvješćima EFSE za tu kategoriju (Tablica 11).

U kategoriji proizvodi na bazi žitarica za djecu, najveći udio pronađen je u dječjim keksima za malu djecu, i u skladu je sa srednjim vrijednostima za udio akrilamida prema izvješćima EFSE za tu kategoriju (Tablica 11).

Od ukupno 195 analiziranih uzoraka najveći broj uzoraka u kojima je vrijednost akrilamida bila iznad vrijednosti propisanih Uredbom 2013/647/EU bio je iz kategorije pomfrit i čips (Tablica 20). U kategorijama kava i zamjene za kavu i proizvodi na bazi žitarica za djecu sve vrijednosti su bile ispod indikativnih vrijednosti.

Zabrinjavajuća je činjenica da od ukupnog unosa proizvoda od krumpira u Europi, čak između 60-80% tog unosa predstavlja konzumiranje pomfrita, a 20% čips i pečeni krumpir (Muttucumaru i sur., 2017). Prema izvješću Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA, 2015) proizvodi od prženih krumpira doprinose ukupnoj izloženosti akrilamidu putem prehrane čak

49% za odraslu populaciju, za djecu i adolescente 51%, kruh doprinosi 23%, kolači i krekeri 24%, a kava 34%.

Primjena postojećih mjera za ublažavanje udjela akrilamida, u kategorijama hrane proizvodi na bazi krumpira (Tablica 9), proizvodi na bazi žitarica (Tablica 11), kava i zamjene za kavu (Tablica 13), nije doprinijela smanjenju udjela akrilamida u navedenim kategorijama.

U travnju 2018. godine na snagu je stupila nova Uredba Europske komisije (EU) 2017/2158 o uspostavi mjera za ublažavanje efekata i nivoa referentnih vrijednosti radi smanjenja prisustva akrilamida u hrani. Referentne vrijednosti postavljene u novoj uredbi (Tablica 7) za pojedine kategorije hrane znatno su niže u odnosu na prethodne indikativne vrijednosti prikazane u Tablici 19. Uredba (EU) 2017/2158 zahtjeva primjenu obveznih mjera za smanjenje prisutnosti akrilamida, stoga su pronalazak i primjena odgovarajućih mjera od iznimne važnosti.

Budući da je najveći udio akrilamida u ispitivanim uzorcima pronađen u kategoriji pomfrit (20%), i obzirom na jako veliki postotak ljudi, posebno mladih i adolescenata koji konzumiraju takvu vrstu proizvoda, mjere za smanjenje nastanka akrilamida u ovom radu usmjerene su upravo na tu kategoriju proizvoda.

Osim primjenom UPLC-MS/MS metode uzorci u sklopu monitoringa analizirani su i primjenom NIR spektroskopije. Jedan od ciljeva ovoga rada bio je istražiti i primjenjivost NIR spektroskopije u svrhu određivanja udjela akrilamida u hrani. Snimljeni su NIR spektri uzoraka grupirani prema kategorijama proizvoda. Na Slici 38. prikazane su srednje vrijednosti NIR spektara za svaki uzorak nakon korištenja umekšavanja (eng. smoothing funkcije) u programu SPEC32. Umekšavanje je dovelo do gubitka dijela informacija, pa su stoga u daljnjim kemometrijskim analizama korišteni spektri valne duljine od 904 nm do 1699 nm.

Slika 38. pokazuje velike sličnosti u spektrima neovisno o grupiranju proizvoda prema osnovnoj sirovini. Također, obzirom da NIR spektri ne sadrže oštre već široke preklapajuće apsorpcijske vrpce, navedena preklapanja ukazuju na potrebu primjene analize glavnih komponenata kako bi se utvrdilo potencijalne sličnosti ili razlike.

U svrhu provedbe LDA analize i pokušaja izrade modela za predikciju pripadnosti svakog proizvoda određenoj kategoriji, uzorci su detaljnije razdvojeni prema vrsti proizvoda, odnosno pripadnosti kategoriji.

U Tablici 20. prikazana je primjenjivost NIR spektroskopije u određivanju udjela akrilamida u pojedinim kategorijama hrane, odnosno izrada kalibracijskog modela koji bi se mogao koristiti za predikciju udjela akrilamida u uzorcima na temelju spektralnih podataka. Prema dostupnim literaturnim podacima NIR spektri se često koriste za razvoj modela za predikciju udjela akrilamida u različitim kategorijama voća i povrća. Tako su Gajdoš Kljusurić i suradnici (2016), razvili NIR spektre za predikciju udjela fenola u bobičastom voću, Valinger i suradnici (2018) su razvili NIR spektre za predikciju bioaktivnih komponenti u listu masline.

LDA analiza je pokazala da postoje značajne razlike između spektara uzoraka, ovisne o kategoriji i vrsti proizvoda, na temelju kojih je moguće razdvojiti spektre. LDA analizom provedenom na NIR spektrima uzoraka iz različitih kategorija proizvoda uspješno su klasificirani gotovo svi uzorci s obzirom na vrstu proizvoda osim u kategoriji Vafli, grickalice, krekeri i keksi (1,04%). Kod kategorije vafli, grickalice, krekeri i keksi loša predikcija može se pojasniti različitim sirovinama koje se koriste za navedene grickalice (riža, pšenica, kukuruz i sl.) te različitim dodacima (začini, čokoladni preljevi).

Međutim pitanje je koliko NIR spektar ima veze s udjelom akrilamida u ispitivanim uzorcima. Iz tog razloga se ispitala mogućnost predikcije velikih vrijednosti akrilamida koje bi se dodatno slale na analizu ako bi se NIR-om ustanovilo kako je udio akrilamida viši od  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 21.

Na osnovu NIR spektara valnih duljina od 904-1699 nm uspješnost detekcije akrilamida za svih 8 kategorija hrane s udjelom akrilamida iznad  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  je 100%, dok za one s nižim vrijednostima stopa točnosti je 95,63%. Razlog tome je što za uzorke kojima je vrijednost akrilamida ispod  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  nema preciznijih podataka budući da je  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  granica kvantifikacije te u tom dijelu nastaje pogreška.

## 5.2. Udio prekursora akrilamida u različitim sortama krumpira

U sirovom krumpiru nalaze se prekursori važni za nastanak akrilamida (Krishnakumar i Visvanathan, 2014). 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 navedenih aminokiselina, asparagin ima veću tendenciju za interakciju sa šećerima u odnosu na ostale (Mottram i sur., 2002), pa je njen udio u ovom radu i određivan .

Reducirajući šećeri su jedan od ključnih reaktanata za nastanak akrilamida, stoga je kontrola reducirajućih šećera uz kontrolu procesnih parametara primarna mjera za smanjenje udjela akrilamida u proizvodima od krumpira (Halford i sur., 2012, Muttucumaru i sur., 2017) .

U radu su korištene različite sorte krumpira. Sorte su birane prema različitim namjenama za toplinsku obradu i prema očekivanim razlikama u udjelu prekursora akrilamida.

Prema deklaraciji proizvođača sorte krumpira Sante, Spunta, Blue salad i Artemis su namjenjene za prženje i pečenje, a sorta Soraya za kuhanje. Jedan od razloga biranja sorte Blue salad je i moguće pozitivno djelovanje na zdravlje ljudi. Razlog tome je potencijalno antioksidativno djelovanje sorte Blue salad, koja prema istraživanjima Nems'-a i suradnika (2015) sadrži značajne količine antocijana u gomoljima krumpira (38,7 mg/100g), čija aktivnost i tijekom blanširanja ostaje dosta visoka.

Prema dobivenim rezultatima u Tablici 22. vidljivo je da udio prekursora akrilamida ovisi o sorti krumpira što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Luning i Sanny, 2012, Yang i sur., 2016).

Udio šećera u ispitivanim sortama krumpira kretao se u rasponu od 4,7 do 11,2 g kg<sup>-1</sup>. Najniži udio šećera određen je u krumpiru sorte Sante, ukupno 4,7 g kg<sup>-1</sup>, od toga reducirajući šećeri 2,5 g kg<sup>-1</sup>. Najveći udio određen je u sorti Soraya, ukupno 11,2 g kg<sup>-1</sup>, od toga reducirajući šećeri 8,0 g kg<sup>-1</sup>. Udio šećera očekivano je najviši u krumpiru sorte Soraya namijenjenoj za kuhanje, a najniži u sorti Sante namijenjenoj za prženje, međutim udio šećera dosta je visok u svim sortama obzirom na preporuku da se za prženje koriste sorte krumpira s udjelom šećera < 3 g kg<sup>-1</sup> (FDE, 2013).

Određivan je i udio drugog prekursora, slobodne aminokiseline asparagin. U gomoljima krumpira asparagin je vodeća aminokiselina koja čini 33-59% ukupnih aminokiselina

(Lineback i sur., 2012). Udio asparagina u ispitivanim sortama krumpira kretao se u rasponu od 0,0404 do 0,0751 g kg<sup>-1</sup>. Najniži udio asparagina određen je u krumpiru sorte Artemis (0,0404 g kg<sup>-1</sup>), a najviši u sorti Spunta (0,0751 g kg<sup>-1</sup>) i Soraya (0,0727 g kg<sup>-1</sup>). Dobiveni rezultati upućuju na to da udio asparagina među sortama manje varira (izuzetak je sorta Artemis) u usporedbi sa udjelom reducirajućih šećera, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Amrein i sur., 2003, Luning i Sanny, 2012, Yang i sur., 2016), i za pojedine sorte (Blue salad) je u korelaciji s udjelom reducirajućih šećera.

Određeni udjeli asparagina u ovom radu niži su u usporedbi s rezultatima Friedmana (2015), koji pokazuju veće razlike među određenim udjelima asparagina. Ovisno o sorti krumpira ti udjeli su se kretali od 0,154 g kg<sup>-1</sup> do 7,6 g kg<sup>-1</sup>. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako udio asparagina također ovisi o sorti (Tablica 22.), što potvrđuje prethodna istraživanja o tome da količina prekursora varira među različitim sortama krumpira (Mestdgah i sur., 2005; Yang i sur. 2016), i njen udio u krumpiru se kreće od 0,2-4% suhe tvari (FDE, 2013).

Na količinu nastalog akrilamida utječe i udio suhe tvari (Mestdagh i sur., 2006, Luning i Sanny, 2012). Za prženje se koriste sorte s višim udjelom suhe tvari (20-23%), jer se u tom slučaju dobiju prženi krumpiri bolje teksture i s nižim udjelom apsorbiranog ulja (Pedreschi i sur., 2008). Prema dobivenim rezultatima prikazanim u Tablici 22. najveći udio suhe tvari izmjeren je u sorti Sante (24,52), a najmanji u plavom krumpiru (16,99). Dobiveni rezultati suhe tvari u korelaciji su sa količinom reducirajućih šećera za većinu sorti (Artemis, Spunta, Sante), što potvrđuje rezultate Yang-a i suradnika (2016) koji navode da sorte krumpira koje sadrže niži udio reducirajućih šećera imaju veći udio suhe tvari.

### 5.3. Utjecaj inovativnih procesnih tehnika na udio akrilamida u prženom krumpiru

Razvoj mjera usmjerenih na smanjenje nastanka akrilamida u hrani predstavlja veliki izazov. S jedne strane treba pronaći odgovarajuće mjere i smanjiti udio akrilamida u prehrambenom proizvodu, a s druge strane zadržati poželjna senzorska svojstva prženog proizvoda (Stadler i Struder, 2016).

U ovom radu dva glavna pristupa primijenjena su kako bi se smanjio udio akrilamida u prženim proizvodima od krumpira. Prvi se odnosi na promjene u uvjetima toplinske predobrade i obrade a drugi se odnosi na primjenu aditiva prije prženja. Prženjem krumpira nastaje proizvod jedinstvenih senzorskih značajki koje takav proizvod čine poželjnim za konzumiranje, i kao takvo je jako zastupljeno kako u domaćinstvu tako i u industriji. Nastanak i eliminacija akrilamida su pod utjecajem temperature i vremena, odnosno udio akrilamida raste s porastom temperature prženja i vremena trajanja procesa (Matthäus i Hase, 2014). Poznato je kako akrilamid nastaje pri temperaturama iznad 120 °C i u uvjetima niske vlažnosti (Biedermann i sur., 2002; Friedman, 2003; Mottram i sur., 2002). Prženjem se razvija boja, tekstura i okus uzrokovani Maillardovim reakcijom i još više primijenjenom temperaturom i vremenom prženja, stoga je pronalazak odgovarajuće temperature i vremena prženja pri kojima bi količina nastalog akrilamida bila što niža, a pri kojima bi se zadržala poželjna senzorska svojstva proizvoda od iznimne važnosti.

U ovom radu, uzorci različitih sorti krumpira prženi su na dva načina. Uzorci krumpira prženi su u dubokom ulju (palmino ulje) pri temperaturi prženja od 180 °C i kratkom vremenu prženja (5 min), i u struji vrućeg zraka, 21 min, pri 180 °C. Prema literaturnim podacima temperatura prženja ne smije biti niža od 140 °C jer se tada povećava apsorpcija masnoća tijekom prženja (Foot i sur., 2007), a kada temperatura prženja prelazi 160 °C dolazi dijelom do eliminacije akrilamida (Stadler i sur., 2002; Wedzicha i sur., 2005), i njegova rezidualna količina ovisi o temperaturi i vremenu prženja. U radu je primijenjeno kratko vrijeme prženja budući da većina akrilamida nastaje na kraju procesa prženja kada površina namirnice postaje izrazito suha, zbog visoke temperature i smanjenog udjela vlage (Matthäus i Hase, 2014). Jednostavnost samog postupka prženja, i ekonomska isplativost doveli su do velike potrošnje prženih proizvoda. Kako bi se proizveli zdraviji prženi proizvodi poželjnih senzorskih svojstava pristupilo se pronalasku alternativnih metoda prženja. Jedna od alternativnih metoda bi svakako bilo i

prženje u struji vrućeg zraka za koje se smatra da doprinosi smanjenju udjela akrilamida (Sansano i sur., 2015). Sporiji razvoj temperature proizvoda kod primjene prženja u struji vrućeg zraka rezultira manjim gubitkom vlage u konačnom proizvodu u odnosu na uzorke pržene u ulju, a smanjuje se i udio masti u prženom proizvodu zbog želatinizacije škroba (Andres i sur., 2012).

U vodiču Food Drink Europe (FDE, 2013), koji je nastao suradnjom znanstvenika i prehrambene industrije navedene su i određene mjere usmjerene na smanjenje udjela akrilamida u prženim proizvodima od krumpira. Neke od tih mjera su biranje sorti s nižim udjelom šećera i predobrada kod proizvodnje pomfrita. Predobrada kod proizvodnje pomfrita uglavnom uključuje blanširanje sirovih štapića krumpira pri određenoj temperaturi i vremenu (FDE, 2013). Blanširanjem se uklanjaju prekursori akrilamida poput reducirajućih šećera, što za posljedicu ima smanjenje udjela akrilamida (Krishnakumar i Visvanathan, 2014). Također, dolazi i do inaktivacije enzima, te se na taj način postiže jednolična boja gotovog proizvoda (Richter Reis, 2017). Odabir optimalnih uvjeta blanširanja je jako važan, budući da uvjeti blanširanja mogu utjecati na kvalitetu prženog proizvoda. Prema istraživanjima Mestadagh i suradnika (2008) primjena blagih do visokih temperatura blanširanja (50 °C do 90 °C) kod krumpira, trebala bi dovesti do smanjenja udjela akrilamida, a primjena visokih temperatura blanširanja i kraćeg vremena trebala bi utjecati na dobivanje proizvoda boljih senzorskih svojstava (Agblor i Scanlon, 2000). U ovom radu uzorci krumpira su blanširani na više načina. Jedan od primjenjenih načina bio je blanširanje u vrućoj vodi pri 80 °C kroz 5 minuta. Blanširanje vrućom vodom uz blanširanje vrućim zrakom su najčešće primjenjivani postupci u proizvodnji pomfrita. U ovom radu ispitana je i mogućnost primjene inovativnih postupaka blanširanja, mikrovalnog blanširanja (pri 80 °C, 5 min) i ultrazvučnog blanširanja (pri 75 °C, 4 min) u proizvodnji prženog krumpira. U svrhu smanjenja nastanka akrilamida u proizvodima od krumpira u vodu za blanširanje mogu se dodavati različiti aditivi, aminokiseline ili soli metala. U ovom radu ispitan je utjecaj dodatka  $\text{CaCl}_2$  (0,3 %) na smanjenje nastanka akrilamida u gore navedenim načinima blanširanja, kao i njegov utjecaj na senzorska svojstva prženih krumpira.

U svim ispitivanim sortama osim udjela prekursora akrilamida u sirovim gomoljima (Tablica 22) određivan je i udio akrilamida u prženom krumpiru nakon primjene inovativnih procesnih tehnika (Tablica 23).



*Sorta Sante* je sorta krumpira namijenjena za prženje. U uzorku prženom u dubokom ulju određen je udio akrilamida od  $470 \mu\text{g kg}^{-1}$ , što je najniži određeni udio akrilamida u odnosu na ostale ispitivane sorte (Tablica 23). Razlog tome može biti najniži udio šećera, kao i najviši udio suhe tvari određen u sorti Sante (Tablica 22). Prema istraživanjima Muttucumaru i suradnika (2017) reducirajući šećeri su glavni prekursori nastanka akrilamida kod krumpira (Muttucumaru i sur, 2017). U sorti Sante određen je udio reducirajućih šećera u količini od  $2,5 \text{ g kg}^{-1}$ , što je najniža vrijednost u usporedbi s ostalim ispitivanim sortama. Osim udjela šećera, važnu ulogu u količini nastalog akrilamida igra i suha tvar. Prema istraživanjima Blank i suradnika (2005) i Mestagh i suradnika (2006), što je udio suhe tvari u sirovinu viši, udio akrilamida u konačnom proizvodu je niži. Udio suhe tvari određen u sorti Sante bio je najviši među ispitivanim sortama i iznosio je  $24,52 \text{ g kg}^{-1}$ .

Primjena inovativnih procesnih tehnika pokazala se uspješnom u smanjenju udjela akrilamida sorte Sante u većini primjenjenih postupaka (Tablica 24). Većina primjenjenih postupaka rezultirala je smanjenjem udjela akrilamida ispod referentne vrijednosti, s tim da su niži udjeli akrilamida određeni u uzorcima prženim u struji vrućeg zraka uz prethodnu predobradu. Najniži udio akrilamida određen je u uzorku krumpira blanširanom u vrućoj vodi uz dodatak  $0,3\% \text{ CaCl}_2$  i prženom u struji vrućeg zraka ( $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), čime je postignuto smanjenje udjela akrilamida od  $94\%$  u odnosu na kontrolni uzorak. Dodatak  $0,3\% \text{ CaCl}_2$  dodatno je smanjio udio akrilamida kod većine primjenjenih postupaka. Jedan od razloga tome može biti reakcija iona  $\text{Ca}^{2+}$  s asparaginom, odnosno ioni  $\text{Ca}^{2+}$  djelomično ili potpuno eliminaraju nastanak Schiffove baze nastale između karbonilne i  $\alpha$ -amino grupe asparagina, što za posljedicu ima smanjenje udjela akrilamida (Gökmen i Şenyuva, 2007., Friedman, 2015). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima prikazanim u radu Friedmana (2015), gdje je dodatak  $\text{CaCl}_2$  doveo do smanjenja udjela akrilamida za  $90\%$ .

Iako prženje u struji vrućeg zraka bez prethodnog blanširanja nije dovelo do smanjenja udjela akrilamida kod uzoraka sorte Sante, blanširanje sirovih kriški krumpira uranjanjem u vruću vodu ili primjenom mikrovalova, te naknadno prženje u struji vrućeg zraka pokazalo se uspješnim u smanjenju udjela akrilamida. Postignuta smanjenja udjela akrilamida kretala su se od  $21\%$  za uzorak blanširan primjenom mikrovalova i pržen u struji vrućeg zraka do  $68\%$  za uzorak blanširan u vrućoj vodi i pržen u struji vrućeg zraka. Veće smanjenje udjela akrilamida kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi u odnosu na iste blanširane primjenom mikrovalova, uz iste primjenjene uvjete prženja, prema istraživanjima Tuta i suradnika (2011) može se objasniti

većim gubitkom vlage kod uzoraka blanširanih mikrovalovima (Tuta i sur., 2011) što je utjecalo na brži nastanak akrilamida u konačnom proizvodu.

Ultrazvučni načina blanširanja uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  rezultirao je smanjenjem udjela akrilamida ali znatno manjim u usporedbi s ostalim primjenjenim postupcima. Smanjenje udjela akrilamida kretalo se od 2,2% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u struji vrućeg zraka do 14% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u ulju.

Obzirom da je sorta Sante sorta s najvišim udjelom suhe tvari, primjena klasičnog postupka blanširanja, kod kojeg dolazi do manjeg gubitka vlage u odnosu na mikrovalno i ultrazvučno blanširanje pokazala se učinkovitijim postupak smanjenja nastanka akrilamida pri primjenjenim istim uvjetima toplinske obrade, posebno kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka.

*Sorta Soraya* je sorta krumpira namjenjena za kuhanje, i u njoj je očekivano udio šećera visok (Tablica 23). Prema istraživanjima Halford-a i suradnika (2012) nastajanje akrilamida u prženom krumpiru ovisi o količini reducirajućih šećera ukoliko krumpir sadrži veće količine istih. Udjeli akrilamida određeni u uzorcima sorte Soraya bili su viši u odnosu na udjele akrilamida određene u ostalim ispitivanim sortama. Primjena inovativnih postupaka toplinske obrade rezultirala je značajnim smanjenjem udjela akrilamida u svim analiziranim uzorcima sorte Soraya, iako su ti udjeli u konačnici za većinu primjenjenih postupaka bili iznad referentne vrijednosti. Najniži udio akrilamida određen je u uzorku krumpira blanširanom primjenom mikrovalova uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženom u dubokom ulju ( $119 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a značajna smanjenja udjela akrilamida dobivena su i kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi.

U uzorcima sorte Soraya blanširanim u vrućoj vodi uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$ , bez obzira na način prženja došlo je do značajnog smanjenja udjela akrilamida, i to za više od 80% (Tablica 24.).

Kod uzoraka sorte Soraya evidentan je utjecaj dodatka 0,3%  $\text{CaCl}_2$  na smanjenje udjela akrilamida u uzorcima prženih krumpira, bez obzira na primjenjeni način blanširanja i prženja. Dobiveni rezultati potvrđuje istraživanja Gökmen-a i Şenyuve (2007) i Friedman-a (2015) o reakciji ioni  $\text{Ca}^{2+}$  s asparaginom, što za posljedicu ima sprječavanje nastanka Schiffove baze, ključnog intermedijara u nastanku akrilamida. Smanjenje udjela akrilamida u uzorcima blanširanim uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  kretalo se od 28% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka i pržene u dubokom ulju pa sve do 92% za uzorke blanširane primjenom mikrovalova i pržene u dubokom ulju (Tablica 24). Dobivene vrijednosti bile su ispod

referentne vrijednosti od  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ , što je značajno smanjenje obzirom na početni udio akrilamida u kontrolnom uzorku.

**Sorta Spunta** je sorta krumpira namijenjena za prženje. Udio akrilamida određen u uzorku prženom u dubokom ulju iznosio je  $800 \mu\text{g kg}^{-1}$ , što je nakon uzoraka sorte Sante najniži udio akrilamida određen u kontrolnim uzorcima (Tablica 23). Razlog tome može biti udio šećera, koji je u uzorcima krumpira sorte Spunta viši u odnosu na udio šećera u uzorcima sorte Sante, ali niži u odnosu na ostale ispitivane sorte. Udio suhe tvari u sorti Spunta prema istraživanjima Pedreschi-a i suradnika (2008) nalazi se u optimalnom rasponu, ali je niži je u odnosu na sortu Sante.

Inovativne tehnike predobrade uzoraka sorte Spunta rezultirale su smanjenjem udjela akrilamida kod većine primjenjenih postupaka bez obzira na način prženja, s tim da su veća smanjenja postignuta prženjem uzoraka u dubokom ulju (Tablica 24). Najniži udio akrilamida određen je u uzorku krumpira blanširanom u vrućoj vodi uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženom u struji vrućeg zraka ( $147 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), čime je postignuto smanjenje udjela akrilamida od 82% u odnosu na kontrolni uzorak. Značajna smanjenja udjela akrilamida postignuta su i primjenom ultrazvučnog načina blanširanja uz naknadno prženje u ulju. Dobivena smanjenja udjela u tom slučaju su se kretala od 58% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka i pržene u ulju, do 69% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u ulju.

Mikrovalni način blanširanja također je rezultirao smanjenjem udjela akrilamida, što je posebno izraženo kod blanširanja uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$ .

**Blue salad** je sorta za koju se smatra da djeluje pozitivno na zdravlje ljudi (Nemsí i sur., 2015). U svim analiziranim uzorcima sorte Blue salad došlo je do smanjenja udjela akrilamida. Postignuta smanjenja su posebno izražena kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka. Za razliku od sorti Soraya, Spunta i Sante s višim udjelom suhe tvari, kod uzoraka sorte Blue salad, primjena prženja u struji vrućeg zraka bez prethodnog blanširanja rezultirala je smanjenjem udjela akrilamida u odnosu na kontrolni uzorak. Razlog smanjenja udjela akrilamida kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka može biti niži udio suhe tvari u sorti Blue salad u odnosu na druge ispitivane sorte (Tablica 22). Prženjem u struji vrućeg zraka povećava se dotok vode iz središta prema površini i dolazi do sporijeg razvoja topline proizvoda. Prema istraživanjima Giovanelli-a i suradnika (2017) učinkovitost prženja u struji vrućeg zraka upravo je i povezana sa većom relativnom vlažnosti proizvoda u usporedbi sa uzorcima prženim u ulju. Dobiveni

rezultati u skladu su s rezultatima Sansano i suradnika i Teruel-a i suradnika (2015), koji su niže udjele akrilamida dobili kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bez prethodne predobrade.

Iako je najniži udio akrilamida određen u uzorku krumpira blanširanom primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženom u struji vrućeg zraka ( $193 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), značajna smanjenja udjela postignuta su i primjenom blanširanja u vrućoj vodi i mikrovalnog blanširanja.

Postignuta smanjenja udjela akrilamida kretala su se od 39% za uzorke blanširane primjenom mikrovalova i pržene u struji vrućeg zraka do 80% za uzorke blanširane u vrućoj vodi uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u struji vrućeg zraka (Tablica 24).

Prženje u struji vrućeg zraka kao što je prethodno opisano povoljno djeluje na smanjenje udjela akrilamida u uzorcima sorte Blue salad, a dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  dodatno smanjuje udio nastalog akrilamida. Razlog zbog kojeg je primjena mikrovalnog i ultrazvučnog načina blanširanja u uzorcima sorte Blue salad značajno doprinijela smanjenju udjela akrilamida je veći udio vode u početnoj sirovini. Iako takvi načini blanširanja doprinose bržem isušivanju sirovine (Amaral i sur., 2016; Giovanelli i sur., 2017), veliki udio vode u početnoj sirovini usporio je proces isušivanja i uz iste primijenjene uvjete prženja i nastanak akrilamida.

*Sorta Artemis* je slično kao i sorta Blue salad sorta s niskim udjelom suhe tvari u odnosu na ostale ispitivane sorte i s najnižim udjelom asparagina (Tablica 22). Kod većine uzoraka sorte Artemis primjena inovativnih tehnika predobrade rezultirala je smanjenjem udjela akrilamida, što je posebno izraženo kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka.

Postignuta smanjenja udjela akrilamida u uzorcima sorte Artemis kretala su se od 21% za uzorke blanširane u vrućoj vodi i pržene u ulju do 71% za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i pržene u dubokom ulju (Tablica 24). Primjena  $\text{CaCl}_2$  je kod većine uzoraka sorte Artemis, bez obzira na tehniku blanširanja i načine toplinske obrade rezultirala smanjenjem udjela akrilamida u usporedbi s kontrolnim uzorkom.

Iako je najniži udio akrilamida određen u uzorku krumpira blanširanom primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženom u ulju ( $316 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), značajna smanjenja udjela akrilamida, ispod referentne granice, postignuta su i kod primjene mikrovalnog načina blanširanja. Smanjenje udjela akrilamida od 68% postignuto je primjenom mikrovalnog načina blanširanja uz naknadno prženje uzoraka u struji vrućeg zraka.

Zbog većeg udjela vlage u početnoj sirovini, primjena mikrovalnog i ultrazvučnog načina blanširanja uz iste primjenjene uvjete prženja, povoljno djeluje na smanjenje udjela akrilamida u uzorcima sorte Artemis.

Statistička obrada podataka (Slika 49.) pokazala je kako su različiti načini blanširanja (blanširanje u vodi, blanširanje mikrovalovima te ultrazvučno blanširanje) utjecali na udio akrilamida (x-os) pri različitim načinima prženja (lijeva y-os) i u različitim sortama krumpira (desna y-os). Najniže vrijednosti su postignute pri blanširanju u vodi, zatim pri blanširanju mikrovalovima i ultrazvukom (Slika 49.). Iz navedenog prikaza vidljivo je i kako se udio akrilamida mijenja i prema načinu prženja. Niže vrijednosti akrilamida postignute su pri prženju u struji vrućeg zraka. Očekivano je kako će i odabir sorte krumpira uvelike utjecati na udio akrilamida. Rezultati pokazuju da su krumpiri sorte Sante i Spunta neovisno o načinu blanširanja i načinu prženja imali najniže udjele akrilamida. Kod primjene mikrovalnog načina blanširanja krumpiri sorte Blue salad imali su niže udjele akrilamida od krumpira sorte Spunta. Blanširanje u vodi značajno je smanjilo vrijednosti akrilamida u svim prženim krumpirima jer su sve vrijednosti niže od  $1300 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Iz Slika 50 (a do c) jasno je vidljivo kako je blanširanje krumpira sa dodatkom 0,3%  $\text{CaCl}_2$  prije prženja utjecalo na smanjenje udjela akrilamida u prženim krumpirima, što je posebno izraženo kod mikrovalnog načina blanširanja.

Obzirom na dobivene rezultate krumpiri sorte Sante, kao i krumpir sorte Spunta pokazali su se znatno prikladnijim za prženje, neovisno o načinu obrade.

#### 5.4. Smanjenje udjela akrilamida u uzorcima prženog krumpira

Iz postignutih smanjenja udjela akrilamida prikazanih u Tablici 24. vidljivo je da je primjena različitih načina toplinske predobrade i obrade uzoraka rezultirala značajnim smanjenjima udjela akrilamida u odnosu na kontrolni uzorak, ovisno o sorti krumpira.

Usporedbom ispitivanih sorti, na temelju dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 24. vidljivo je kako su najveća smanjenja udjela akrilamida postignuta primjenom blanširanja u vrućoj vodi dobivena kod sorti Sante, Spunta i Soraya (>80%). Značajna smanjenja udjela akrilamida za navedene sorte postignuta su primjenom blanširanja mikrovalovima, a najmanja, iako za sorte Spunta i Soraya značajna smanjenja udjela postignuta su i primjenom ultrazvučnog načina blanširanja.

Najveća smanjenja udjela akrilamida postignuta primjenom mikrovalnog načina blanširanja dobivena su kod sorti Blue salad, Soraya i Artemis (>60%), ali ne i značajno drugačija od smanjenja dobivenih blanširanjem u vodi.

Najveća smanjenja udjela akrilamida postignuta primjenom ultrazvučnog načina blanširanja dobivena su kod sorti Spunta, Artemis i Blue salad (>50%).

Primjenjena različitih načina toplinske predobrade i obrade uzoraka krumpira kod 46% analiziranih uzoraka rezultira je smanjenjem udjela akrilamida ispod referentne vrijednosti od  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Slika 51.). Ako se iz izračuna izuzme sorta Soraya koja je namjenjena za kuhanje, postotak dobivenih smanjenja udjela akrilamida iznosi 52%.

## 5.5. Boja prženih krumpira

Boja proizvoda je jedan od kriterija prema kojem potrošači procjenjuju kvalitetu proizvoda i prema tome ima veliki utjecaj na prihvatljivost proizvoda od strane potrošača. Prženi krumpiri su zlatno žute boje koja nastaje kao rezultat Maillardovih reakcija (Medeiros Vinci i sur., 2012). Obrada hrane često uzrokuje degradaciju boje, stoga se u industriji prerade krumpira za očuvanje boje gotovo obavezno primjenjuje postupak blanširanja. Najčešće se primjenjuje blanširanje vrućom vodom. Blanširanje doprinosi jednoličnoj boji konačnog proizvoda, poboljšava senzorska svojstva proizvoda i doprinosi nastanku proizvoda s manjim udjelom ulja (Felipe Richter Reis, 2017). Osim toga blanširanjem se uklanjaju i prekursori poput reducirajućih šećera prije prženja što u konačnici doprinosi smanjenju udjela akrilamida (Krishnakumar i Visvanathan, 2014). Primjena kemijskih tretmana u kombinaciji sa blanširanjem je poželjna, posebno ako su usmjereni na smanjenje unosa ulja prženih proizvoda (Rimac Brnčić i sur., 2004). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su kako tehnologija prženja, početna koncentracija reducirajućih šećera i njihova interakcija snažno utječu na razvoj parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  (Sansano i sur., 2015, Giovanelli i sur., 2017). Vrijednost parametra boje  $L^*$  govori o svjetloći uzorka. Mjerenje parametara boje  $a^*$  koristi se kako bi se odredila optimalna točka prženja. Općenito gledano što su vrijednosti parametra boje  $a^*$  veće, veći je udio narančastih tonova, kao posljedica enzimatskog tamnjenja. Vrijednosti parametra  $a^*$  između 0 do (-5), i vrijednosti parametra  $b^*$  veće od 10, smatraju se optimalnim za prženi krumpir (Heredia i sur., 2014).

### *Sorta Artemis*

Vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  izmjerene u uzorku krumpira sorte Artemis prženog u ulju bile su slijedeće 45,11; 10,00 i 28,15 (Tablica 26). Većina primjenjenih postupaka rezultirala je povećanjem svjetloće prženih uzoraka, kao i smanjenjem vrijednosti parametara boje  $a^*$  i  $b^*$ . Uzorci sorte Artemis prženi u struji vrućeg zraka bez obzira na prethodne načine blanširanja bili su svjetliji u odnosu na iste uzorke pržene u ulju. Vrijednosti parametara boje  $a^*$  bile su niže u odnosu na iste uzorke pržene u ulju i kretale su se od -0,28 do -2,42. Vrijednosti parametra boje  $b^*$  također su bile niže u odnosu na iste uzorke pržene u ulju, i kretale su se od 14,96 do 24,7. Dobiveni rezultati slažu se s rezultatima Sansano i suradnika (2015), koji su također za uzorke pržene u struji vrućeg zraka dobili niže vrijednosti parametara boje  $a^*$  i  $b^*$ , iako se te vrijednosti prema istraživanjima Heredia i suradnika (2014) nalaze u optimalnom rasponu za prženi krumpir. Dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  doveo je do dodatnog porasta svjetloće uzoraka, a vrijednosti parametara boje  $a^*$  i  $b^*$  upućuju na to da su uzorci bili žuti s manjim udjelom crvene boje, odnosno imali su poželjan izgled. Najmanja razlika u boji dobivena je prženjem uzorka u struji vrućeg zraka ( $\Delta E=7,92$ ). Slične vrijednosti dobivene su primjenom različitih načina blanširanja uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$ . Iako su veće razlike u boji u usporedbi s kontrolnim uzorkom nastale primjenom prženja u struji vrućeg zraka, vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  u uzorcima prženim u struji vrućeg zraka uz prethodne načine predobrade ocjenjivane prema CIELAB sustavu boja prihvatljivije su u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnom uzorku.

### *Sorta Spunta*

Vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  izmjerene u uzorku krumpira sorte Spunta prženog u ulju bile su slijedeće 62,19; 2,51 i 23,03 (Tablica 27). Prženjem uzoraka u struji vrućeg zraka i ulju bez obzira na način blanširanja došlo je do smanjenja vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , s tim da su uzorci prženi u struji vrućeg zraka u većini slučajeva bili manje svijetli u usporedbi s istim uzorcima prženim u ulju. Iako je došlo do smanjenja svjetloće uzoraka, dobivene vrijednosti parametara boje  $a^*$  i  $b^*$  upućuju na to da je većina uzoraka prženih u struji vrućeg zraka imala manji udio crvene boje i zadovoljavajući udio žute boje, za razliku od istih prženih u ulju. Smanjenje svjetloće bilo je manje izraženo kod primjene inovativnih načina blanširanja u odnosu na klasični način blanširanja u vodi, što je posebno izraženo uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$ .



Najmanja razlika u boji dobivena je primjenom mikrovalnog blanširanja uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> i prženje u ulju ( $\Delta E=4,05$ ). Slične vrijednosti dobivene su primjenom ultrazvučnog blanširanja i prženja u ulju ( $\Delta E=4,82$ ), blanširanja u vodi uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> i prženje u ulju ( $\Delta E=5,35$ ) i blanširanja u vodi uz prženje u struji vrućeg zraka ( $\Delta E=5,38$ ). Iako su veće razlike u boji u usporedbi s kontrolnim uzorkom nastale primjenom prženja u struji vrućeg zraka, vrijednosti parametara boje L\*, a\* i b\* u uzorcima prženim u struji vrućeg zraka uz prethodne načine predobrade ocjenjivane prema CIELAB sustavu boja prihvatljivije su u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnom uzorku.

### *Sorta Sante*

Vrijednosti parametara boje L\*, a\* i b\* izmjerene u uzorku krumpira sorte Sante prženom u ulju bile su slijedeće 55;92; 1,98 i 24,25 (Tablica 29). Blanširanjem uzoraka bez obzira na način prženja, većina uzoraka postala je svjetlija u odnosu na kontrolni uzorak. Povećanje svjetloće uzoraka posebno je izraženo kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi i primjenom mikrovalova, kao i kod uzoraka blanširanih uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>.

Vrijednosti parametara boje a\* i b\* za većinu primjenjenih postupaka predobrade bile su više kod uzoraka prženih u ulju u odnosu na iste pržene u struji vrućeg zraka, s tim da su se u oba slučaja nalazile u optimalnom rasponu prema istraživanjima Heredia i suradnika (2014). Kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka došlo je do smanjenja udjela crvene boje u svim uzorcima, a vrijednosti parametara boje b\*, koje govore o udjelu žute boje bile su jako slične kontrolnom uzorku (Tablica 29).

Najmanja razlika u boji dobivena je primjenom mikrovalnog blanširanja uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> i prženje u ulju ( $\Delta E=2,14$ ), a slične vrijednosti dobivene su primjenom mikrovalnog blanširanja i prženja u struji vrućeg zraka ( $\Delta E=3,54$ ) i ultrazvučnog blanširanja i prženja u ulju ( $\Delta E=3,68$ ).

Vrijednosti parametara boje L\*, a\* i b\* u uzorcima prženim u struji vrućeg zraka ili ulju uz prethodne načine predobrade ocjenjivane prema CIELAB sustavu boja prihvatljivije su u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnom uzorku.

### ***Sorta Soraya***

Vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  izmjerene u uzorku krumpira sorte Soraya prženog u ulju bile su slijedeće 54,40; 2,54 i 23,68 (Tablica 28). Kod većine uzoraka prženih u ulju i struji vrućeg zraka, došlo je do smanjenja vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ . Smanjenje svjetloće je više izraženo kod uzoraka prženih u ulju, dok je većina uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bila svjetlija u odnosu na iste pržene u ulju. Vrijednosti parametara boje  $a^*$  i  $b^*$  za uzorke pržene u struji vrućeg zraka bile su u optimalnom rasponu prema rezultatima Heredia i suradnika (201). Dodatak 0,3 %  $\text{CaCl}_2$  rezultirao je povećanjem svjetloće jedino kod uzoraka blanširanih primjenom mikrovalova.

Iako je najmanja razlika u boji dobivena primjenom klasičnog načina blanširanja i prženja u ulju ( $\Delta E=3,16$ ), ukupno gledano za sortu Soraya do manjih razlika u boji došlo je kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka. Dobivene razlike u boji kod primjene mikrovalnog blanširanja i prženja u struji vrućeg zraka ( $\Delta E=3,56$ ) i mikrovalnog blanširanja uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženje u struji vrućeg zraka ( $\Delta E=3,69$ ), bile su zapravo vrlo slične najnižoj dobivenoj razlici.

Vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  u uzorcima prženim u struji vrućeg zraka uz prethodne načine predobrade ocjenjivane prema CIELAB sustavu boja prihvatljivije su u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnom uzorku, osim uzoraka blanširanih primjenom ultrazvuka.

### ***Blue salad***

Vrijednosti parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  izmjerene u uzorcima sorte Blue Salad prženim u ulju bile su slijedeće 37,39; 4,66 i 14,55 (Tablica 30). Blanširanjem uzorka bez obzira na način prženja, došlo je do porasta svjetloće uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak (izuzetak ultrazvučni način blanširanja bez dodatka 0,3%  $\text{CaCl}_2$ ). Smanjenje vrijednosti parametra boje  $a^*$ , do kojeg je došlo kod većine uzoraka je poželjno, obzirom na početnu vrijednost u kontrolnom uzorku (4,66). Kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka smanjenje vrijednosti parametra boje  $a^*$  je više izraženo, što znači da je prženje u struji vrućeg zraka rezultiralo nastankom proizvoda s manjim udjelom crvene boje. Vrijednosti parametra boje  $b^*$ , također su kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bile niže u odnosu na iste pržene u ulju, ali dobivene vrijednosti upućuju na smanjenje udjela žute boje i porast udjela zelene boje. Prema istraživanjima Heredia i suradnika (2014) vrijednosti parametra boje  $b^*$  niže od 10 nisu poželjne za dobivanje prženog krumpira optimalnih svojstava.

Najmanja razlika u boji kod uzoraka sorte Blue salad dobivena je primjenom ultrazvučnog blanširanja i prženja u ulju ( $\Delta E=2,99$ ). Nešto veća odstupanja dobivena su primjenom mikrovalnog blanširanja uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženje u ulju ( $\Delta E=5,95$ ) i primjenom ultrazvučnog blanširanja uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženje u struji vrućeg zraka ( $\Delta E=5,98$ ). Obzirom na početne vrijednosti parametara boje u kontrolnom uzorku, posebno  $L^*$  vrijednost i  $a^*$  vrijednost, dobivene razlike u boji su zapravo poželjne, iako niti jedan način predobrade i toplinske obrade uzoraka nije rezultirao nastankom uzorka s poželjnim vrijednostima parametrima boje.

Na osnovu dobivenih podataka, napravljena je i PCA analiza parametara boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  (Slika 52). Parametri boje opisuju 93.94% svih varijacija u promatranom skupu podataka. Iz prikaza na Slici 52. vidljivo je kako su uzorci prženi u struji vrućeg zraka koncentrirani oko trećeg kvadranta, dok su uzorci prženi u ulju raspršeni u sva četiri kvadranta. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako je prženje u struji vrućeg zraka bolji postupak obrade, koji rezultira nastankom ujednačenijih vrijednosti parametara boje.

Kako bi se ispitala potencijalna povezanost parametara boje prženog krumpira i udjela akrilamida u njemu, provedena je regresijska analiza.

Slikama 53 i 54. prikazani su pojedinačni i skupni modeli za predviđanje udjela akrilamida. Prikazani modeli su napravljeni na temelju dobivenih udjela akrilamida i parametara boje, u prženim sortama svih krumpira (*i*), neovisno o načinu toplinske obrade. Raspršenje oko pravaca će biti manje ukoliko je model bolje predvidio udio akrilamida na osnovu izmjerenih parametara boje. Na primjeru modela prikazanog za pojedinačne sorte (Slika 53.) vidljivo je da je kod sorti Sante, Soraya i Spunta postignuto najbolje predviđanje udjela akrilamida pomoću primjenjenog modela, ali i kod ostalih sorti to predviđanje je zadovoljavajuće. Ono što je ključno kod modela iz realnog sustava – biti unutar intervala pouzdanosti, označenog na Slici 53. unutar dvije sive linije, odnosno na Slici 54. unutar sive i žute linije. Za očekivati je oko 5-10 % odstupanja, a to odstupanje su outlier-i tj. točke koje su izvan intervala pouzdanosti. U modelu prikazanom na Slici 54. su 2 točke outlier, što je očekivani i zadovoljavajući broj mjerenja koja odstupaju. Sve navedeno pokazuje kako postoji povezanost između mjerenih parametara boje i udjela akrilamida u prženom krumpiru.

Ovaj model omogućava izmjeriti parametre boje, što je jednostavna metoda te pomoću modela predvidjeti koji udio akrilamida se očekuje.

## 5.6. Teksturalna svojstva toplinski obrađenih proizvoda od krumpira

### *Sorta Artemis*

Iz dobivenih rezultata za parametre teksture sorte Artemis (Tablica 30), može se zaključiti kako je većina primjenjnih postupaka blanširanja rezultirala povećanjem čvrstoće, elastičnosti i primjenjenog rada u odnosu na kontrolni uzorak. Povećanje parametara teksture posebno je izraženo kod mikrovalnog i ultrazvučnog načina blanširanja i kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka. Vrijednosti parametara čvrstoće za sortu Artemis kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka kretale su se u rasponu od 0,77 N za uzorke pržene u struji vrućeg zraka bez prethodne predobrade do 3,2 N za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>. Elastičnost uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bila je u rasponu od 2,57 mm za uzorke blanširane u vrućoj vodi do 7,0 mm uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>, a sukladno tome povećao se i primjenjeni rad.

Dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> kod primjene različitih načina blanširanja, bez obzira na način prženja, rezultirao je dodatnim porastom čvrstoće i elastičnosti uzoraka. Najveći porast je primjećen kod primjene ultrazvučnog načina blanširanja uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>.

Uzorci najbliži kontrolnom uzorku bili su uzorci blanširani primjenom ultrazvuka i prženi u ulju. Slične vrijednosti parametra teksture dobivene su i kod uzoraka blanširanih primjenom mikrovalova sa i bez dodatka 0,3% CaCl<sub>2</sub> i prženih u ulju, kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi i prženih u struji vrućeg zraka i kod uzoraka blanširanih primjenom mikrovalova i prženih u struji vrućeg zraka.

### *Sorta Blue salad*

Iz dobivenih rezultata za parametre teksture sorte Blue salad (Tablica 31), može se zaključiti kako je većina primjenjenih postupaka blanširanja rezultirala porastom čvrstoće, elastičnosti i primjenjenog rada u odnosu na kontrolni uzorak. Povećanje parametara teksture posebno je izraženo kod mikrovalnog blanširanja i blanširanja u vrućoj vodi, kao i kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka. Vrijednosti parametara čvrstoće za uzorke sorte Blue salad kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka kretale su se u rasponu od 0,87 N za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka do 4,83 N za uzorke pržene u struji vrućeg zraka bez prethodne predobrade. Elastičnost uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bila je u rasponu od 3,16 mm za uzorke

blanširane primjenom mikrovalova uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  do 4,83 mm za uzorke pržene u struji vrućeg zraka bez prethodne predobrade, a sukladno tome i primijenjeni rad bio je najveći za uzorke pržene u struji vrućeg zraka bez prethodne predobrade i iznosio je 13,19 Nmm.

Dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  kod primjene različitih načina blanširanja, bez obzira na način prženja, rezultirao je dodatnim porastom čvrstoće i elastičnosti kod većine ispitivanih uzoraka. Najveći porast je primjećen kod primjene ultrazvučnog načina blanširanja i prženja u struji vrućeg zraka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$ .

Uzorci najbližiji kontrolnom uzorku bili su uzorci blanširani primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženi u ulju. Slične vrijednosti parametra teksture dobivene su i kod uzoraka blanširanih primjenom mikrovalova sa i bez dodatka 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženih u ulju, te kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi i prženih u ulju.

### *Sorta Sante*

Iz dobivenih rezultata za parametre teksture sorte Sante (Tablica 32), može se zaključiti kako je većina primjenjenih postupaka blanširanja rezultirala porastom čvrstoće, elastičnosti i primjenjenog rada u odnosu na kontrolni uzorak. Porast parametara teksture posebno je izražen kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka. Vrijednosti parametara čvrstoće za sortu Sante kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka kretale su se u rasponu od 0,81 N za uzorke blanširane u vrućoj vodi do 2,83 N za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$ . Elastičnost uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bila je u rasponu od 2,51 mm za uzorke pržene u struji vrućeg zraka bez prethodne predobrade do 6,98 mm za uzorke blanširane primjenom mikrovalova, a sukladno tome povećao se i primjenjeni rad.

Dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  rezultirao je porastom čvrstoće i elastičnosti kod većine uzoraka prženih u struji vrućeg zraka, u odnosu na iste pržene u ulju kao i u odnosu na kontrolni uzorak. Kod uzoraka prženih u dubokom ulju dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  rezultirao je smanjenjem čvrstoće u odnosu na uzorke bez dodatka 0,3%  $\text{CaCl}_2$ , osim kod primjene ultrazvučnog načina blanširanja.

Uzorci najbližiji kontrolnom uzorku bili su uzorci blanširani u vrućoj vodi uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženi u ulju. Slične vrijednosti parametra teksture dobivene su i kod uzoraka blanširanih primjenom ultrazvuka i prženi u struji vrućeg zraka, kod uzoraka blanširanih primjenom mikrovalova uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženih u ulju i kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi uz dodatak 0,3%  $\text{CaCl}_2$  i prženih u struji vrućeg zraka.

### *Sorta Soraya*

Iz dobivenih rezultata za parametre teksture sorte Soraya (Tablica 33), može se zaključiti kako je većina uzoraka prženih u struji vrućeg zraka čvršća, elastičnija, i potrebno je upotrijebiti veći rad da dođe do njihove deformacije u odnosu na iste uzorke pržene u ulju, kao i u odnosu na kontrolni uzorak. Vrijednosti parametara čvrstoće za sortu Soraya kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka kretale su se u rasponu od 0,73 N za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka do 2,32 N za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>. Elastičnost uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bila je u rasponu od 3,93 mm za uzorke blanširane u vrućoj vodi do 6,97 mm za uzorke blanširane primjenom mikrovalova uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>, a sukladno tome povećao se i primjenjeni rad.

Kod uzoraka prženih u ulju uz prethodne različite načine blanširanja došlo je do pada čvrstoće i porasta elastičnosti u odnosu na kontrolni uzorak.

Dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> rezultirao je porastom čvrstoće, elastičnosti i primjenjenog rada bez obzira na način prženja uzoraka, a najviše kod uzoraka blanširanih ultrazvukom.

Najsličniji kontrolnom uzorku bili su uzorci blanširani mikrovalovima uz dodataka 0,3% CaCl<sub>2</sub> i prženi u ulju. Slične vrijednosti parametra teksture dobivene su i kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi i prženih u struji vrućeg zraka i kod uzoraka blanširanih u vrućoj vodi uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> i prženih u ulju.

### *Sorta Spunta*

Iz dobivenih rezultata za parametre teksture sorte Spunta (Tablica 34), može se zaključiti kako je većina primjenjenih postupaka blanširanja rezultirala porastom čvrstoće, elastičnosti i primjenjenog rada u odnosu na kontrolni uzorak. Porast parametara teksture posebno je izražen kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka. Vrijednosti čvrstoće za sortu Spunta kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka kretale su se u rasponu od 0,73 N za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka do 2,32 N za uzorke blanširane primjenom ultrazvuka uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>. Elastičnost uzoraka prženih u struji vrućeg zraka bila je u rasponu od 3,93 mm za blanširane u vodi do 6,97 mm za uzorke blanširane primjenom mikrovalova uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub>, a sukladno tome povećao se i primjenjeni rad.

Kod uzoraka prženih u ulju uz prethodne različite načine blanširanja bez dodatka 0,3% CaCl<sub>2</sub> došlo je smanjenja parametara teksture u odnosu na kontrolni uzorak.

Dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> bez obzira na primijenjeni način blanširanja rezultirao je porastom čvrstoće kod svih uzoraka, a najviše kod primjene ultrazvučnog načina blanširanja. Elastičnost uzoraka se povećala kod uzoraka prženih u ulju, a kod uzoraka prženih u struji vrućeg zraka je kod većine ostala ista u odnosu na iste bez dodatka 0,3% CaCl<sub>2</sub>. Primijenjeni rad se kod većine primijenjenih postupaka povećao.

Najsličniji kontrolnom uzorku bili su uzorci blanširani u vrućoj vodi uz dodatak 0,3% CaCl<sub>2</sub> i prženi u ulju, zatim uzorci blanširani primjenom mikrovalova i prženi u ulju i uzorci blanširani u vrućoj vodi i prženi u ulju.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da sorta krumpira značajno utječe na parametre teksture. Također je vidljiv i utjecaj prženja u struji vrućeg zraka, kao i utjecaj ultrazvučnog načina blanširanja na povećanje vrijednosti parametara teksture. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima Amarala i suradnika (2016) i Giovanelli-a i suradnika (2017) koji su također dobili čvršće uzorke primjenom ultrazvuka i prženjem u struji vrućeg zraka, ali u ovisnosti o ispitivanoj sorti krumpira.

## 5.7. Rezultati kemometrijske obrade NIR spektara

Snimanjem NIR spektara različito prženih krumpira (5 sorti, 2 načina prženja i 4 načina blanširanja) dobivena je matrica od 281 retka i 802 stupca. Cilj je bio utvrditi mogućnost kvalitativnog prepoznavanja sorte od koje je pripremljen prženi krumpir. Raspodjela prženih krumpira prema sorti krumpira ukazuje kako je „podatak“ o sorti skriven u NIR spektru pri valnoj duljini od 904-1699 nm. Taj dio spektra svakako može razlikovati makronutritivni sastav hrane. Slika 55. pokazuje velike sličnosti u NIR spektrima neovisno o kasnijem grupiranju proizvoda prema sličnosti/različitosti. Također navedena preklapanja NIR spektara ukazuju na potrebu primjene analize glavnih komponenata (PCA) kako bi se utvrdilo potencijalne sličnosti ili razlike.

Primjena PCA analize (Slika 56.) ukazuje na dominaciju sorte kao varijable u promatranoj matrici podataka, te je navedeni rezultat potvrdio kako je snimanjem NIR spektra moguće utvrditi koje je sorte krumpir koji je pržen. Gotovo svi NIR spektri prženih krumpira pripremljenih od sorte krumpira Blue Salad pozicionirani su u 4-tom kvadrantu, dok su prženi krumpiri sorte Artemis pozicionirani u drugom kvadrantu. Grupiranje u istom kvadrantu ukazuje na sličnost grupiranih uzoraka. Snimanje prženog krumpira nama nepoznate sorte analizirao bi se primjenom PCA analize i ovisno o svojoj poziciji unutar koordinatnog sustava grafa bilo bi jasno koje je sorte krumpir. Ako bi se uzorak pozicionirao u četvrti kvadrant značilo bi da je prženi krumpir sorte Blue Salad.

Koliko je čvrsta veza između NIR spektra i sorte krumpira pokazuje ukupan udio varijacija koji je obuhvaćen u promatranom skupu podataka sa prve dvije glavne komponente, a to je 100 % ( $PC1+PC2=100\%$ ), što je potvrda uspješnosti klasifikacije prženog krumpira ovisno o njegovoj sorti, na osnovu NIR spektara.

Na osnovu NIR spektara valnih duljina od 904-1699 nm uspješnost detekcije akrilamida za krumpire svih sorti, blanširanih i prženih na različite načine s udjelom akrilamida iznad  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  je 100% , ali i za one ispod referentne vrijednosti od  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  postignuta je stopa točnosti od 100% (Tablica 36). Ovaj model je kvalitativan jer pokazuje ima li uzorak manji ili veći udio akrilamida od referentne vrijednosti.

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je snimanje NIR spektara nekog novog uzorka prženog krumpira jedna od primjenjivih metoda, koja može poslužiti za



procjenjivanje je li vrijednost akrilamida ispod ili iznad referentne vrijednosti. To bi smanjilo broj analiza sadržaja akrilamida s ciljem utvrđivanja kvantitativnih vrijednosti samo za one uzorke koji su pokazali vrijednosti udjela akrilamida veće od referentne vrijednosti od  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## 6. ZAKLJUČCI

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

- Na temelju rezultata praćenja razina akrilamida u hrani provedenog na području RH u razdoblju od 2016-2017. godine utvrđeno je da je najveći broj uzoraka s udjelom akrilamida iznad propisanih vrijednosti bio iz kategorije: proizvodi od krumpira.
- Obradom NIR spektara uzoraka koji su obuhvaćeni praćenjem razina akrilamida u hrani provedenog na području RH u razdoblju od 2016-2017. godine utvrđeno je da je primjenom NIR spektroskopije moguće uspješno klasificirati uzorke iz različitih kategorija prehrambenih proizvoda s obzirom na udio akrilamida.
- Obradom NIR spektara prženih krumpira utvrđeno je da je primjenom NIR spektroskopije moguće uspješno klasificirati sortu krumpira.
- Udio prekursora akrilamida u početnoj sirovini i udio akrilamida u konačnom proizvodu ovise o sorti krumpira.
- Najmanji udio akrilamida određen je u krumpiru sorte Sante, a najveći u krumpiru sorte Soraya.
- Primjenom inovativnih postupaka toplinske obrade postignuto je smanjenjem udjela akrilamida u prženom krumpiru.
- Kod 46% analiziranih uzoraka prženog krumpira udio akrilamida određen UPLC-MS/MS metodom bio je ispod referentne vrijednosti.
- Najveće smanjenje udjela akrilamida u prženom krumpiru postignuto je blanširanjem u vrućoj vodi uz dodatak 0,3 % CaCl<sub>2</sub> i prženjem u struji vrućeg zraka.
- Niži udjeli akrilamida postignuti su prženjem krumpira u struji vrućeg zraka kada je prethodno blanširan.
- Prženjem u struji vrućeg zraka dobiveni su uzorci ujednačenije boje, veće čvrstoće i elastičnosti.
- Krumpir sorte Sante je najprikladniji za prženje budući da sadrži najniži udio akrilamida, a zadržava poželjna senzorska svojstva.
- NIR spektroskopija se može uspješno koristiti kao orijentacijska metoda za različite prehrambene proizvode u svrhu utvrđivanja prelazi li razina akrilamida referentnu vrijednost.

- Izradom regresijskog modela, na temelju vrijednosti dobivenih parametara boje dobiven je uspješan model za predviđanje udjela akrilamida u prženim krumpirima različitih sorti.

---

## 7. LITERATURA

- Abdalla, A. E., Mei M Ali, O., Wan Aini Wan, I., Schmitz, O.I., AboulEnein, H.Y. (2014) Acrylamide Analysis in Food by Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 44:2, 107-141.
- Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviewes: Computational Statistics*. 2, 433-459.
- Abu-Ghannam, N., Crowley, H. (2006) The effect of low temperature blanching on the texture of whole processed new potatoes. *Journal of Food Engineering*. 74, 335–344.
- Açar, Ö. Ç, Gökmen, V. (2009) Investigation of acrylamide formation on bakery products using a crust-like model. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53,1521–1525.
- Adedipe, OE., Johanningsmeier, SD., Truong, VD.,Yencho, GC. (2016) Development and Validation of a Near-Infrared Spectroscopy Method for the Prediction of Acrylamide Content in French-Fried Potato. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 64, 1850-60.
- Agblor, A., Scanlon, MG. (2000) Processing conditions influencing the physical properties of Frenchfried potatoes. *American Journal of Potato Research*. 43, 163–177.
- Albishri, HM., El-Hady, DA. (2014) Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples. *Talanta: a Journal of Analytical Chemistry*. 118, 129–136.
- Alexandre, EMC., Santos-Pedro, DM., Brandão, TRS., Silva, CLM. (2011) Study on thermosonication and ultraviolet radiation processes as an alternative to blanching for some fruits and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*. 4, 1012–1019.
- Alves, RC., Soares, C., Casal, S., Fernandes, JO., Oliveira, BPP. (2010) Acrylamide in espresso coffee: influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemistry*. 119, 929–934.
- Amaral, R.D.A., Benedetti, C.B., Pujola, M., Achaerandio, I., Bachelì, M.L.B. (2016) A First Approach of Using Ultrasound as an Alternative for Blanching in Vacuum-Packaged Potato Strips. *Food and Biopreocess Technology*. 1-8.

- 
- Amrein, T. M. (2005) Systematic studies on process optimization to minimize Acrylamide contents in food. PhD thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
  - Amrein, T. M., Schönbacher, B., Escher, F., Amadò, R. (2004) Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4282–4288.
  - Amrein, T.M., Andres, L., Escher, F., Amado, R. (2007) Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food Additives and Contaminants*. 24, 13-25.
  - Amrein, T.M., Lukac, H., Andres, L., Perren, R., Escher, F., Amado, R. (2005) Acrylamide in Roasted Almonds and Hazelnuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7819-7825.
  - Andrzejewski, D., Roach, JAC., Gay, ML., Musser, SM. (2004) Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1996–2002.
  - Anese, M. (2016) Acrylamide in Coffee and Coffee Substitutes. U: Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects, 1. Izd., Gökmen, V., ur., Academic Press, str. 181-195.
  - Anese, M., Manzocco, L., Calligaris, S., Nicoli, M.C. (2013) Industrially Applicable Strategies for Mitigating Acrylamide, Furan, and 5Hydroxymethylfurfural in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 10209-10214.
  - Anese, M., Peloux, L.,Quarta, B.,Calligaris,S. (2011) Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. *Food Research International*. 44, 2837-2842.
  - Arias-Mendez, A., Warning, A., Datta, A. K., Balsa-Canto, E. (2013 ) Quality and safety driven optimal operation of deep-fat frying of potato chips. *Journal of Food Engineering*. 119, 125-134.
  - Arvanitoyannis, I. S., Dionisopoulou, N. (2014) Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54(6), 708–733.
  - ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2012) Toxicological profile of acrylamide. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp236.pdf>>Pristupljeno: 10.01.2018.

- 
- 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.
  - Bagdonaite, K., Derler, K., Murkovic, M. (2008) Determination of Acrylamide during Roasting of Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 6081-6086.
  - Bandarra, S., Fernandes, AS., Magro, I., Guerreiro, PS., Pingarilho, M., Churchwell, MI., Gil, OM., Batinic-Haberle, I., Goncalves, S., Rueff, J., Miranda, JP., Marques, MM., Beland, FA., Castro, M., Gaspar, JF., Oliveira, NG. (2013) Mechanistic insights into the cytotoxicity and genotoxicity induced by glycidamide in human mammary cells. *Mutagenesis*, 28, 721–729.
  - Baum, M., Bohm, N., Görlitz, J., Lantz, I., Merz, KH., Ternité, R., Eisenbrand, G. (2008) Fate of <sup>14</sup>C acrylamide in ground coffee during storage. *Molecular Nutrition and Food Research*. 52, 600–8.
  - Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S.W., Sun, W.F. (2005) Determination of Acrylamide in Various Food Matrices. U: Chemistry and Safety of Acrylamide in Food. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, ur., Friedman, M., Mottram, D. Springer, Boston, MA. Str.97-107.
  - Becalski, A., Lau, B. P.-Y., Lewis, D., Seaman, S. W. (2003) Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51, 802-808.
  - Beland, FA., Mellick, PW., Olson, GR., Mendoza, MC., Marques, MM., Doerge, DR. (2013) Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F(1) mice and F344/N rats from a 2-year drinking water exposure. *Food and Chemical Toxicology*. 51, 149–159.
  - Bergmark, E. (1997) Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*. 10, 78-84.
  - Bernaś, E., Jaworska, G. (2014) Effect of microwave blanching on the quality of frozen *Agaricus bisporus*. *Food Science and Technology International*. 0, 1-11.
  - Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Egli, P., Mandli, H. (2002b) Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 93, 638–652.
  - Biedermann, M., Grundbock, F., Fiselier, K., Biedermann, S., Burgi, C., Grob, K. (2010) Acrylamide monitoring in Switzerland, 2007-2009: results and conclusions.

---

*Food Additives and Contaminants*. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 27(10), 1352–62.

- Blank, I. (2005) Current status of acrylamide research in food: measurement, safety assessment, and formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1043, 30–40.
- Blanco, M., Villarroya, I. (2002) NIR Spectroscopy: a rapid response analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*. 21, 240-250.
- Brathen, E., Kita, A., Knutsen, SH., Wicklund, T. (2005) Addition of glycine reduces the content of acrylamide in cereal and potato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 3259–3264.
- Brathen, E., Knutsen, S. H. (2005) Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model system, flat breads and bread. *Food Chemistry*. 92, 693–700.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog inteziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 4, 32-37.
- Camire, ME., Kubow, S., Donnelly, DJ. (2009) Potatoes and human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49, 823–840.
- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V., Fogliano, V. (2009) Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *International Food Research Journal*. 42, 1295–1302.
- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, L., Ait-Ameur, L., Fogliano, V. (2009) Characterization of the Maillard reaction in bread crisps. *European Food Research and Technology*. 228, 311-319.
- Carrieri, G., De Bonis, M. V., Pacella, C., Pucciarelli, A., Ruocco, G. (2009) Modeling and validation of local acrylamide formation in a model food during frying. *Journal of Food Engineering*. 95, 90-98.
- Ciesarová, Z. (2016) Impact of L-Asparaginase on Acrylamide content in Fried Potato and Bakery Products. U: *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, 1. izd., Gökmen, V., ur., Academic Press. Inc. str. 1–17.
- Ciesarova, Z., Kiss, E., Boegl, P. (2006) Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. *Journal of Food and Nutrition Research*. 45, 141–146.

- 
- Chen, C.R., Abdelrahim, K., Beckerich, I. (2010) Sensitivity analysis of continuous ohmic heating process for multiphase foods, *Journal of Food Engineering*. 98, 257-265.
  - Claus, A., Carle, R., Schieber, A. (2008) Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*. 47, 118-133.
  - 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. *Journal of Cereal Science*. 47, 546–54.
  - Claus, A., Schreiter, P., Weber, A., Graeff, S., Hermann, W., Claupein, W., Schieber, A., Carle, R. (2006b) Influence of agronomic factors and extraction rate on the acrylamide contents in yeast-leavened breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 8968-8976.
  - Claus, A., Weisz, GM., Schieber, A., Carle, R. (2006) Pyrolytic acrylamide formation from purified wheat gluten and gluten-supplemented wheat bread rolls. *Molecular Nutrition and Food Research*. 50, 87–93.
  - Crews, C. (2016) Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometry to Determine Acrylamide in Foods. U: Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects, 1. Izd., Gökmen, V., ur., Academic Press, 463-479.
  - Cruz, RMS., Vieira, MC., Silva, CLM. (2007) Modelling kinetics of watercress (*Nasturtium officinale*) colour changes due to heat and thermosonication treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8, 244–252.
  - Curtis, T., Halford, N.G. (2016) Reducing the acrylamide-forming potential of wheat. *Food and Energy Security*. 5, 153-164.
  - Day, L., Xu, M., Øiseth ,SK., Mawson, R. (2012) Improved mechanical properties of retorted carrots by ultrasonic pre-treatments. *Ultrasonic Sonochemistry*. 19, 427–434.
  - De Meulenaer, B., De Wilde, T., Mestdagh, F., Govaert, Y., Ooghe, W., Fraselle, S., Demeulemeester, K., Calus, A., Degroot, J. M., Verhé, R. (2008) Comparison of potato varieties between seasons and their potential for acrylamide formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88, 313–318.
  - De Wilde, T., De Meulenaer, B., Mestdagh, F., Govaert, Y., Vandeburie, S., Ooghe, W., faselle, S., Demeulemeester, K., Van Petoghem, C., Calus, A., Degroot, J.M., Verhè, R. (2005) Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6550–6557.



- 
- Doerge, DR, Twaddle, NC, Boettcher, MI, McDaniel, LP, Angerer, J. (2007) Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fischer 344 rats and B6C3F(1) mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicology Letters*. 169, 4–42.
  - Duda-Chodak, A., Wajda, T., Tarko, T., Sroka, P., Satora, P. (2016) A review of interactions between acrylamide, microorganisms and food components. *Food and Function*. 7, 1282-1295.
  - Dybing, E., Farmer, P.B., Andersen, M., Fennel, T.R., Lalljie, S.P., Muller, D.J., Olin, S., Petersen, B.J., Schlatter, J., Scholz, G., Scimeca, J.A., Slimani, N., Törnqvist, M., Tuijelaars, S., Verger, P. (2005) Human exposure and internal dose assessment of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology*. 43 (3), 365–410.
  - EC (European commission), 2013/647/EU. Preporuka komisije od 8 Studenog 2013 o ispitivanju razine akrilamida u hrani. <<http://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2013/647/oj>> Pristupljeno 15.06.2017.
  - EEZ/315/93-Uredba vijeća o utvrđivanju postupaka zajednice za kontrolu kontaminanata u hrani. <<https://publications.europa.eu/hr/publication-detail/-/publication/8cf5fe52-fddb-4791-8431-b32e54cc7111/language-hr>>Pristupljeno 06.02.2018.
  - EFSA (European Food Safety Authority) (2012a) Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal* 2012;10, 2938.
  - EFSA (European Food Safety Authority) (2015) Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal* 2015; 13, 4104.
  - Elbashir, AA., Omar, MMA., Ibrahim, WAW., Schmitz, OJ., Aboul-Enein, HY. (2014) Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 44, 107–141.
  - Elbashir, AA., Omar, MMA., Ibrahim, WAW., Schmitz, OJ., Aboul-Enein, HY. (2014) Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 44, 107–141.
  - Elmore, J.S., Koutsidis, G., Dodson, A.T., Mottram, D.S., Wedzicha, B.L. (2005) The effect of cooking on acrylamide and its precursors in potato, wheat and rye. *Advances in experimental medicine and biology*. 561, 255-269.

- (EU) 2017/2158 Uredba komisije od 20. studenog 2017. o uspostavi mjera za ublažavanje efekata i nivoa referentnih vrijednosti radi smanjenja prisustva akrilamida u hrani.
- Erikson, S. (2005) Acrylamide in food products: Identificaton, formation and analytical methodology. PhD thesis, Stockhlom University, Sweden.
- Esteve Agelet, L., Hurburgh Jr., C., R. (2010) A Tutorial onNear Infrared Spectroscopy and Its Calibration. *Critical Reviews in Analitical Chemistry*. 40, 246-260.
- Exon, J.H. (2006) A review of the toxicology of acrylamide. *Journal of Toxicology and Enviromental Health*. 9(5), 397-412.
- Farah, A. (2012) Coffee Constituents. U: Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention,1. Izd., Chu, Y.-F., ur., Wiley-Blackwell, Oxford. Str. 21-58.
- Fennell, TR., Friedman, MA. (2005) Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 56, 109-116.
- Fiselier, K., Grob, K. (2005) Legal limit for reducing sugarsin prefabricates targeting 50 l g/kg acrylamide in French fries. *European Food Research and Technology*. 220, 451–458.
- Fiselier, K., Hartmann, A., Fiscalini, A., Grob, K. (2005) Higher acrylamide contents in French friesprepared from “fresh” prefabricates. *European Food Research and Technology*. 221, 376–381.
- Food Drink Europe (2013) Acrylamide Toolbox 2013. <http://www.fooddrinkeurope.eu/S=0/publication/fooddrinkeurope-updatesindustry-wide-acrylamide-toolbox/> Pristupljeno 06.02.2018.
- Foot, R. J., Haase, N. U., Grob, K., Gondé, P. (2007) Acrylamide in fried and roasted potato products: A review on progress in mitigation. *Food Additives and Contaminants*, 24, 37–46.
- Fredriksson, H., Tallving, J., Rosén, J., Åman, P. (2004) Fermentation Reduces Free Asparagine in Dough and Acrylamide Content in Bread. *Cereal Chemistry*, 81, 650-653.
- Freisling, H., Moskal, A., Ferrari, P., Nicočas, G., Knaze, V., Clavel-Chapelon, F. (2013) Dietary intake of adults in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition differs greatly according to geographical region. *European Journal of Nutrition*. 52, 1369-1380.

- 
- Friedman, M. (2003) Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 4504–4526.
  - Friedman, M. (2015) Acrylamide: inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. *Food and Function*. 6, 1752-72.
  - Friedman, M., Levin, C. E. (2008) Review of Methods for the Reduction of Dietary Content and Toxicity of Acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 6113–6140.
  - Fuhr, U., Boettcher, M., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P., Jakob, V., Harlfinger, S., Klaassen, T., Berkessel, A., Angerer, J., Sörgel, F., Schömig, E. (2006) Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 15 (2), 266-71.
  - Giovanelli, G., Torri, L., Sinelli, N., Buratti, S. (2017) Comparative study of physico-chemical and sensory characteristics of French fries prepared from frozen potatoes using different cooking system. *European Food Research And Technology*. 243, 1619-1631.
  - Gökmen V. (2016) Introduction: Potential Safety Risks Associated with Thermal Processing of Foods. U: Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects, 1. izd., Gökmen V., ur., str.21-26.
  - 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 Chemistry*. 104(3), 1136–1142.
  - Gökmen, V., Palazoğlu, T. K., Şenyuva, H. Z. (2006) Relation between the acrylamide formation and time–temperature history of surface and core regions of French fries. *Journal of Food Engineering*. 77, 972-976.
  - Gökmen, V., Senyuva, HZ., Acar, J., Sarioğlu, K. (2005) Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1088, 193-9.
  - Gökmen, V., Morales, F. J., Atac, B., Serpen, A., Arribas-Lorenzo, G. (2009) Multiple-Stage Extraction Strategy for the Determination of Acrylamide in Foods. *Journal of Food Composition and Analyses*. 22, 142–147.

- 
- Granby, K., Juul Nielsen, N., Hedegaard, R.V., Christensen, T., Kann, M., Skibsted, L.H. (2009) Acrylamide-asparagine relationship in baked/toasted wheat and rye bread. *Food Additives and Contaminants*. 25, 921-929.
  - Granby, K., Nielsen, N.J., Hedegaard, R.V., Christensen, T., Kann, M., Skibsted, L.H. (2008) Acrylamide-asparagine relationship in baked/toasted wheat and rye breads. *Food Additives and Contaminants*. 25, 921-9.
  - Granda, C., Moreira, R. G. (2005) Kinetics of acrylamide formation during traditional and vacuum frying of potato chips. *Journal of Food Process Engineering*. 28, 478–493.
  - Granvogl, M., Schieberle, P. (2006) Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 5933–38.
  - Granvogl, M., Jezussek, M., Koehler, P., Schieberle P. (2004) Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes – A minor but potent precursor in acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4751–4757.
  - Hagmar, L., Törnqvist, M., Nordander, C., Rosén, I., Bruze, M., Kautiainen, A., Magnusson, A.L., Malmberg, B., Aprea, P., Granath, F., Axmon, A. (2001) Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health*. 27, 219–226.
  - Halford, N.G., Muttucumar, N., Powers, S.J., Gillatt, P.N., Hartley, L., Elmore, J.S. (2012) Concentrations of free amino acids and sugars in nine potato varieties: effect of storage and relationship with acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (48), 12044-12055.
  - Hamlet, C.G., Sadd, P.A., Liang, L. (2008) Correlations between the Amounts of Free Asparagine and Saccharides Present in Commercial Cereal Flours in the United Kingdom and the Generation of Acrylamide during Cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 6145-6153.
  - Hays, S.M., Aylward, L.L. (2008) Biomonitoring Equivalents (BE) dossier for acrylamide (AA). *Regulatory toxicology and Pharmacology*. 51, 57-67.
  - Hedegaard, R.V., Frandsen, H., Skibsted, L.H. (2008) Kinetics of formation of acrylamide and Schiff base intermediates from asparagine and glucose. *Journal of Food Chemistry*. 108, 917-925.

- 
- Heredia, A., Castelló, M.L., Argüelles, A., Andrés, A. (2014) Evolution of mechanical and optical properties of French fries obtained by hot air-frying. *Food Science and Technology*. 57, 755-760.
  - Hendriksen, H.V., Kornbrust, B.A., Østergaard, P.R., Stringer, M.A. (2009) Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 4168–4176.
  - Hosseini, H., Ghorbani, M., Meshginfar, N., Mahoonak, A.S. (2016) A Review on Frying: Procedure, Fat, Deterioration Progress and Health Hazards. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 93, 445-466.
  - Huang, H., Yu, H., Xu, H., Ying, Y. (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*. 87, 303-313.
  - International Agency for Research on Cancer (IARC) (1994) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. *IARC* 60: 389–433.
  - Jägerstad, M., Skog, K. (2005) Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research*. 574 (1-2), 156-172.
  - JECFA (2011) Evaluation of Certain Contaminants in Food. Seventy-Second Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 959. str 9–20. World Health Organ., Geneva, Switzerland.
  - JECFA (2006) Evaluation of certain food contaminants. 64th report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report Series, No. 930, str. 8–26. World Health Organ., Geneva, Switzerland.
  - Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kemija u Industriji*. 62, 71-80.
  - Jezussek, M., Schieberle, P. (2003) A new LC/MS-method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 7866-77.
  - Jung, M. Y., Choi, D. S., Ju, J. W. (2003) A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked com chips and in French fries. *Journal of Food Science*. 68, 1287-1290.

- 
- Keramat, A., LeBail, A., Prost, C., Soltanizadeh, N. (2011) Acrylamide in foods: chemistry and analysis. A review. *Food and Bioprocess Technology*. 4, 340-363.
  - Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., Jafari, M. (2011) Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food and Bioprocess Technology*. 4, 530-543.
  - Kim, S.H., Hwang, J.H., Lee, K.G. (2011) Analysis of acrylamide using gas chromatography-nitrogen phosphorus detector (GC-NPD). *Food Science and Biotechnology*. 20, 835-839.
  - Knutsen, S. H., Dimitrijevic, S., Molteberg, E. L., Segtnan, V. H., Kaaber, L., Wicklund, T. (2009). The influence of variety, agronomical factors and storage on the potential in potatoes grown in Norway. *Food Science and Technology*. 42 (82), 550-556.
  - Kocadağlı, T., Gökmen, V. (2016) Metabolism of Acrylamide in Humans and Biomarkers of Exposure to Acrylamide. U: Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects, 1. izd., Gökmen V., ur., str. 109–128.
  - Konings, E.J.M., Ashby, P., Hamlet, C.G., Thomson, G.A. K. (2007) Acrylamide in cereal and cereal products: A review on progree in level reduction. *Food Additives and Contaminants*. 24, 47-59.
  - Krishnakumar, T., Visvanathan, R. (2014) Acrylamide in Food Products: A Review. *Food Processing and Technology*. 5, 1-9.
  - Kroh, L.W. (1994) Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*. 51, 373–379.
  - Kumar, D., Singh, B. P., Kumar, P. (2004) An overview of the factors affecting sugar content of potatoes. *Annals of Applied Biology*. 145, 247–256.
  - Kunkulberga, D., Gedrovica, I., Ozolina, V., Ciprovica, I., Sterna, V. (2014) Acrylamide Reduction Option in Rye Bread. Foodbalt
  - Lantz, I., Ternité, R., Wilkens, J., Hoenicke, K., Guenther, H., Van der Stegen, G. (2006) Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. *Molecular Nutrition and Food Research*. 50, 1039–1046.
  - Levine, R. A., Smith, R. E. (2005) Sources of variability of acrylamide levels in a cracker model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4410–4416.
  - Lindenmeier, M., Hofman, T. (2010) Influence of baking contions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-L-lysine in bakery products. *Journal of Food Engineering*. 99, 239-249.

- Lineback, D.R., Coughlin, J.R., Stadler, R.H. (2012) AA in Foods: A Review of the Science and Future Consideration. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3, 15-35.
- Lineback, D.R., Coughlin, J.R., Stadler, R.H. (2012) Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Consideration. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3, 15-35.
- Lingnert, H., Grivas, S., Jägerstad, M., Skog, K., Törnqvist, M., Åman, P. (2002) Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Scandinavian Journal of Nutrition*. 46:4, 159-172.
- Lipworth, L., Sonderman, J.S., Tarone, R.E., McLaughlin, J.K. (2012) Review of epidemiologic studies of dietary acrylamide intake and the risk of cancer. *European Journal of Cancer Prevention*. 21, 375–386.
- Lipworth, L., Sonderman, J.S., Tarone, R.E., McLaughlin, J.K. (2013) Acrylamide: a human cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention*. 22, 193–194.
- LoPachin, RM. (2005) Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 561, 21-37.
- LoPachin, RM. (2004) The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 25, 617-630.
- Marra, F., Zhang, L., Lyng, J. G. (2008) Radio frequency treatment of foods: Review of recent advances. *Journal of Food Engineering*. 91, 497–508.
- Mariotti, M., Cortés, P., Fromberg, A., Bysted, A., Pedreschi, F., Granby, K. (2015) Heat toxicant contaminant mitigation in potatochips. *Food Science and Technology*. 60, 860–866.
- Mastovska, K., Lehotay, SJ. (2006) Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 7001-8.
- Matthäus, B., Haase, N. U. (2014) Acrylamide – Still a matter of concern for fried potato food? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 675–687.
- Matthäus, B., Haase, N. U., Vosmann, K. (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 106, 793–801.

- 
- Medeiros Vinci, R., Mestdagh, F., De Meulenaer, B. (2012) Acrylamide formation in fried potato products—Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*. 133, 1138-1154.
  - Mesias, M., Morales, F. J (2016) Acrylamide in Bakery Products. U: Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects, 1. izd., Gökmen V., ur., str. 131–157.
  - Mesías, M., Morales, FJ. (2016) Acrylamide in coffee: Estimation of exposure from vending machines. *Journal of Food Composition and Analyses*. 48, 8-12.
  - Mestdagh, F. J., de Meulenaer, B., van Poucke, C., Detavernier, C., Cromphout, C., van Pe-teghem, C. (2005) Influence of oil type on the amounts of acrylamide generated in a model system and in french fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6170-6174.
  - Mestdagh, F., De Meulenaer, B., Cucu, T., Van Peteghen, C (2006) Role of water upon the formation of acrylamide in a potato model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (24),9092-9098.
  - Mestdagh, F., De Wilde, T., Castelein, P., Németh, O., Van Peteghem, C., De Meulenaer, B. (2008) Impact of the reducing sugars on the relationship between acrylamide and Maillard browning in French fries. *European Food Research and Technology*. 227, 69–76.
  - Mestdagh, F., De Wilde, T., Delporte, K., Van Peteghem, c., De Meuleanaer, B. (2008a) Impact of chemical pre-treatments on the acrylamide formation and sensorial quality of potato crisps. *Food Chemistry*. 106, 914–922.
  - Mestdagh, F., De Wilde, T., Fraselle, S., Govaert, Y., Ooghe, W., Degroodt, J.M., Verhr, R., Van Peteghem, C., De Meulenaer, B. (2008b) Optimization of the blanching process to reduce acrylamide in fried potatoes. *Food Science and Technology*. 41, 1648-1654.
  - Mestdagh, F., Maertens, J., Cucu, T., Delporte, A., Van Peteghem, B., De Meulenaer, B. (2008c) Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chemistry*. 107, 26–31.
  - Metrohm (2013) NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes, Metrohm Ltd., Herisau.
  - Michalak, J., Gujska, E., Kunciewicz, A. (2013) RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 32, 68–73.



- 
- Mojska, H., Gielecinska, I., Szponar, L., Oltarzewski, M. (2010) Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2090-2096.
  - Mojska, H., Gielecińska, I. (2013) Studies of acrylamide level in coffee and coffee substitutes: influence of raw material and manufacturing conditions. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 164, 173-81.
  - Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., Dodson, A. T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature.Research Journal*. 419, 448–449.
  - Mottram, D.S., Low, M.Y., Elmore, J.S. (2006) The Maillard reaction and its role in the formation of acrylamide and other potentially hazardous compounds in foods. U: *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*, 1. izd., Skog, K., Alexander, J. ur., Poglavlje1, str. 3–19. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England).
  - Mucci, L.A., Adami, H.O., Wolk, A. (2006) Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *International Journal of Cancer*. 118, 169–173.
  - Mustatea, G., Popa. M.E., Mioara, N. (2015) A case study on mitigation strategies of acrylamide in bakery products.
  - Muttucumaru, N., Halford, NG., Elmore, JS., Dodson, AT., Parry, M., Shewry, PR., Mottram, DS. (2006) Formation of high levels of acrylamide during the processing of flour derived from sulfate-deprived wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 8951-8955.
  - Muttucumaru, N., Powers, S.J., Elmore, J.S., Dodson, A., Briddon, A., Mottram, D. S., Halford, N.G. (2017) Acrylamide-forming potential of potatoes grown at different locations, and the ratio of free asparagine to reducing sugars at which free asparagine becomes a limiting factor for acrylamide formation. *Food Chemistry*. 220, 76-86.
  - Myagchenkov, V.A., Kurenkov, V.F. (1991) Applications of Acrylamide Polymers and Copolymers: A Review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 30,109-135.
  - Nems´, A., Pęksa, A., Kucharska, A.Z., Sokoł-Łętowska, A., Kita, A., Drożdż, W., Hamouz, K. (2015) Anthocyanin and antioxidant activity of snacks with coloured potato. *Food Chemistry*. 172, 175-182.

- 
- Normandin, L., Bouchard, M., Ayotte, P., Blanchet, C., Becalski, A., Bonvalot, Y., Phaneuf, D., Lapointe, C., Gagné, M., Courteau, M. (2013) Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food and Chemical Toxicology*. 57 , 75–83.
  - Oracz, J., Nebesny, E., Żyżelewicz, D. (2011) New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*. 86:23–34.
  - Ötles, S., Ötles, S. (2004) Acrylamide in food-formation of acrylamide and its damages to health. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*.
  - Ou, S., Lin, Q., Zhang, Y., Huang, C., Sun, X., Fu, L. (2008) Reduction of acrylamide formation by selected agents in fried potato crisps on industrial scale. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9, 116–121.
  - Ozaki, Y., McClure, W.F., Christy, A.A. 2007. *Near-infrared spectroscopy in food science and technology*, John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
  - Ozolina, V., Kunkulberga, D., Cieslakk, B., Obiedzindkib, M. (2011) Furan derivatives dynamic in rye bread processing. *Procedia Food Science*. 1,1158 – 1164.
  - Parzefall, W. (2008) Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 1360-4.
  - Pasquini, C. (2003) Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14, 198-219.
  - Pedreschi, F., Granby, K., Risum, J. (2010) Acrylamide mitigation in potato chips by using NaCl. *Food Bioprocess Technology*. 3, 917–921.
  - Pedreschi, F., Kaack, K., Granby, K., Troncoso, E. (2007) Acrylamide reduction under different pre-treatments in French fries. *Journal of Food Engineering*. 79, 1287–1294.
  - Pedreschi, F., León, J., Mery, D., Moyano, P. (2006) Development of a computer vision system to measure the color of potato chips. *Food Research International*. 39(10): 1092–1098.
  - Pedreschi, F., Mariotti, S., Granby, K., Risum, J. (2011) Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *Food Science and Technology*. 44, 1473–1476.
  - Pedreschi, F., Travisany, X., Reyes, C., Troncoso, E., Pedreschi, R. (2009) Kinetics of extraction of reducing sugar during blanching of potato slices. *Journal of Food Engineering*. 91, 443–447.

- 
- Pedreschi, F., León, J., Mery, D., Moyano, P. (2006) Development of a computer vision system to measure the color of potato chips. *Food Research International*. 39(10), 1092–1098.
  - Pedreschi, F., María, S. M., Kit, G. (2014) Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assesment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 15, 9-12.
  - Pelucchi, C., Galeone, C., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., Bosetti, C., Giacosa, A., La Vecchia, C. (2006) Dietary acrylamide and human cancer. *International Journal of Cancer*. 118, 467–471.
  - Pelucchi, C., La Vecchia, C., Bosetti, C., Boyle, P., Boffetta, P. (2011) Exposure to acrylamide and human cancer: a review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Annals of Oncology*. 22, 1487.
  - Petersen, BJ., Tran, N. (2005) Exposure to acrylamide: placing exposure in context. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 561, 63-76.
  - Petersson, E. V., Rosen, J., Turner, C., Danielsson, R., Hellenäs, K.E. (2006) Critical Factors and Pitfalls Affecting the Extraction of Acrylamide from Foods: An Optimisation Study. *Analitica Chimica Acta*. 557, 287–295.
  - Pravidnik o žitaricama i proizvodima od žitarica (NN 81/16)
  - Przygodzka, M., Piskula, M. P., Kukurová, K., Ciesarová, Z., Bednarikova, A., Zieliński, H. (2015) Factors influencing acrylamide formation in rye, wheat and spelt breads. *Journal of Cereal Science*. 65, 96-102.
  - Pugajeva, I., Zumbure, L., Melngaile, A., Bartkevics, V. (2014) Determination of acrylamide levels in selected foods in Latvia and assessment of the population intake. Proceedings of the 9th Baltic Conference on Food Science and Technology (pp. 116-116). Food for consumer Well-Being: Jelgava, Latvia.
  - Ranjan, S., Dasgupta, N., Walia, N., Chand, T., Ramalingam, C. (2016) Microwave blanching: an emerging trend in food engineering and its effects on Capsicum annum L. *Journal of Food Process Engineering*. 40, 1-8.
  - Reis, FR., Masson, ML., Waszczynskyj, N. (2008) Influence of a blanching pretreatment on color, oil uptake and water activity of potato sticks, and its optimization. *Journal of Food Process Engineering*. 31, 833–852.

- 
- Richter Reis, F. (2017) Effect of Blanching on Food Physical, Chemical, and Sensory Quality U: New Perspectives on Food Blanching, Richter Reis, F ur., Springer, str. 7-48.
  - Richter Reis, F. (2017) Novel blanching techniques U: New Perspectives on Food Blanching, Richter Reis, F ur., Springer, str. 137-154.
  - Rimac-Brnčić, S., Lelas, V., Rade, D., Šimundić, B. (2004) Decreasing of oil absorption in potato strips during deep fat frying. *Journal of Food Engineering*. 64, 237–241.
  - Rufián-Henares, JA., Morales, FJ: (2006) Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC–MS method based on a stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*. 97, 555–562.
  - Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., Törnqvist, M. (2005) Factors that influence the acrylamide content of heated foods. *Advances in Experimental Medical and Biology*. 561, 317-328.
  - Sadd, P. A., Hamlet, C. G., Liang, L. (2008) Effectiveness of Methods for Reducing Acrylamide in Bakery Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 6154–6161.
  - Sansano, M., Juan-Borrás, M., Escriche, I., Andrés, A., Heredia, A. (2015) Effect of pretreatments and air-frying, a novel technology, on acrylamide generation in fried potatoes. *Journal of Food Science*. 80, 1120-8.
  - Schieberle, P., Köhler, P., Granvogl, M. (2005) New aspects on the formation and analyses of acrylamide. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 561, 191-203.
  - Schieberle, P., Köhler, P., Granvogl, M. (2005) New aspect on the formation and analyses of acrylamide U: Chemistry and safety of Acrylamide in food, izd. Friedman, M., Mottram, D.S. Ur. Springer, New York, 205-222.
  - Şenyuva, H. Z., Gokmen, V. (2006) Interference-Free Determination of Acrylamide in Potato and Cereal-Based Foods by a Laboratory Validated Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Method. *Food Chemistry*. 97, 539–545.
  - Şenyuva, H.Z., Gökmen, V. (2005). Survey of acrylamide in Turkish foods by an in-house validated LC-MS method. *Food Additives and Contaminants*. 22, 204-209.
  - Severini, C., Baiano, A., De Pilli, T., Carbone, BF., Derossi, A. (2005) Combined treatments of blanching and dehydration: study on potato cubes. *Journal of Food Engineering*. 68, 289–296.

- 
- Severini, C., Giuliani, R., De Filippis, A. (2016) Influence of different blanching methods on colour, ascorbic acid and phenolics content of broccoli. *Journal of Food Science Technology*. 53(1)501-10.
  - Shepherd, L. V. T., Bradshaw, J. E., Dale, M. F. B., McNicol, J. W., Pont, S. D. A., Mottram, D. S., Davies, H.V. (2010) Variation in acrylamide producing potential in potato: segregation of the trait in a breeding population. *Food Chemistry*, 123(3), 568-573.
  - Shi, Q., Jackowski, G. (1998) One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. U: Gel electrophoresis of proteins: A practical approach, 3. izd., Hames B.D., ur., IRL Press/Oxford University Press, NewYork, str. 1–52.
  - Shojaee-Aliabadi, S., Nikoopour, H., Kobarfard, F., Parsapour, M., Moslehishad, M., Hassanabadi, H., Dahaghin, E. (2013). Acrylamide reduction in potato chips by selection of potato variety grown in Iran and processing conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93, 2556-2561.
  - Smith PG (2011) Introduction to food process engineering, 2nd edn. Springer, Heidelberg.
  - Smith, C.J., Perfetti, T.A., Rumble, M.A., Rodgman, A., Doolittle, D.J. (2000) "Iarc group 2A carcinogen" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology*. 38, 481-608.
  - Soares, C.M.D. (2015) Assessment of the dietary intake of acrylamide in Portugal. Development and evaluation of strategies for reduction of acrylamide formation in thermally processed foods. PhD thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
  - Stadler, R. H (2006) The Formation of Acrylamide in cereal products and coffee U: Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods, 1. izd., Skog, K., Alexander, J. ur., Poglavlje 2, str. 23–40 (Woodhead Publishing Limited, Cambridge England).
  - Stott-Miller, M., Neuhouser, M. L., Stanford, J. L. (2013) Consumption of deep-fried foods and risk of prostate cancer. *The Prostate*. 73, 960–969.
  - Sumner, SCJ., Williams, CC., Snyder, RW., Krol, WL., Asgharian, B., Fennell, TR. (2003) Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents

following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicology Science*. 75, 260–70.

- Surdyk, N., Rosén, J., Andersson, R., Åman, P. (2004) Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (7), 2047–2051.
- Swedish National Food Administration (SNFA) (2002) Acrylamide in heated-processed foods.<: <http://www.slv.se>.> Pristupljeno 20.04.2017.
- Šarkanj, B., Kipčić, D., Rački-Vasić, Đ., Delaš, .F., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapac, T. (2010.) *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Osijek, Hrvatska agencija za hranu (HAH), str.115-119.
- Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., studer, A., Stadler, R.H., Gonde, P., Van Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Muller, D., Tallmadge, D., O'Brien, J., Thomson, S., Silvani, D., Whitmore, T. (2004) A review of acrylamide: An industry perspective of research, analyses, formation, and control. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*. 44, 323-347.
- Tareke, E. (2003) Identification and origin of potential background carcinogens: Endogenous isoprene and oxiranes, dietary acrylamide. PhD Thesis. Department of Environmental Chemistry. Stockholm University.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 4998-5006.
- Teruell, MR., Gordon, M., Linares, MB., Garrido, MD., Ahromrit, A., Niranjana, K. (2015) a comparative study of the characteristic of French fries produced by deep and air frying. *Journal of Food Science and Technology*. 80 (820), 349-358.
- Tuta, S., Palazoğlu, K. (2017) Effect of baking and frying methods on quality characteristic of potato chips. University of Mersin, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Mersin, Turkey.
- Valinger, D., Kušen, M., Jurinjak Tušek, A., Panić, M., Jurina, T., Benković, M., Radojčić Redovniković, I., Gajdoš Kljusurić, J. (2018) Development of Near Infrared Spectroscopy models for the quantitative prediction of olive leaves bioactive compounds content *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 32(4); 535-543.

- 
- Vinci, RM., Mestdagh, F., De Meulenaer, B. (2012) Acrylamide formation in fried potato products—present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*. 133, 1138–1154.
  - Vinci, RM., Mestdagh, F., Van Poucke, C., Kerkaert, B., De Muer, N., Denon, Q., Van Peteghem, C., De Meulenaer, B. (2011) Implementation of acrylamide mitigation strategies on Industrial production of French fries: Challenges and Pitfalls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (3), 898-906.
  - Virk-Baker, M.K., Nagy, T.R., Barnes, S., Groopman, J. (2014) Dietary Acrylamide and Human Cancer: A Systematic Review of Literature. *Nutrition and Cancer*. 66(5), 774–790.
  - Wang L (2008) Energy efficiency and management in food processing facilities. CRC Press, Boca Raton.
  - Wedzicha, B.L., Mottram, D.S., Elmore, J.S., Koutsidis, G., Dodson, A.T. (2005) Kinetic models as a route to control acrylamide formation in food. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 561, 235-253.
  - Wilson, K., Rimm E., Thompson, K., Mucci, L. (2006) Dietary acrylamide and cancer risk in humans: A review. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 1, 19–27.
  - Xiao, D.C. (2008) Food drying Fundamentals, U: Drying technologies in food processing, Xiao, D.C., Mujumdar, A.S., (ured), Blackwell Publishing, Singapore, 1-55.
  - Xin, Y., Zhang, M., Xu, B., Adhikari, B., sun, J. (2015) Research trends in selected blanching pretreatments and quick freezing technologies as applied in fruits and vegetables: a review. *International Journal of Refrigeration*. 57, 11–25.
  - Xu, Y., Cui, B., Ran, R., (2014) Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*. 69, 1-12.
  - 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 and Chemical Toxicology*. 69, 1-12.
  - Yang, Y., Achaerandio, I., Pujola, M. (2016) Influence of the frying process and potato cultivar on acrylamide formation in French fries. *Food Control*. 62, 216-223.

- 
- Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M., & Shibamoto, T. (2003) Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 3999–4003.
  - Yasuhisa, A., Takamune, Y., Yoshiki, T., Hideaki Y. (2014) A New Enzymatic Method of Acrylamide Production. *Agricultural and Biological Chemistry*. 46 (5), 1183-1189.
  - Yaylayan, V. A., Wnorowski, A., Locas, C. P.(2003) Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 1753-1757.
  - Yaylayan, V.A. (2009) Acrylamide formation and its impact on the mechanism of the early Maillard reaction. *Journal of Food and Nutrition Research*. 48 (1), 1-7.
  - Yolmeh, M., Najafzadeh, M. (2014) Optimisation and modelling green bean's ultrasound blanching. *International Journal of Food Science and Technology*. 49, 2678–2684.
  - Zhang, H., Zhang, H., Cheng, L., Wang, L., Qian H. (2015) Influence of deep-frying using various commercial oils on acrylamide formation in French fries. *Food Additives and Contamination. Part A*, 32 (7), 1083-1088.
  - Zhang, Y., Zhang, G., Zhang, Y. (2005) Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*. 1075, 1–21.
  - Zhang, Y., Zhang, Y. (2007) Formation and Reduction of Acrylamide in Maillard Reaction: A Review Based on Current State of Knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47 (5), 521-542.
  - Zhang, Y., Kahl, D.H.W., Bizimungu, B., Lu, Z.X. (2018) Effects of blanching treatments on acrylamide, asparagine, reducing sugars and colours in potato chips. *Journal of food Science and Technology*. 1-14.
  - Zhejiang Xinyong Biochemical Co., Ltd., <<http://www.acrylamide.cn>> Pristupljeno 17. svibnja 2017.
  - Zyzak, D. V., Sanders R. A., Stojanovik, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P., Villagran, M. D. (2003) Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(16), 4782–4787.