

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидата Беке Сарић

Тема:

1. Одређивање садржаја слободног аспарагина и шећера у зрну житарица као прекурсора акриламида у термички третираним производима

1. Научна област: Хемија

Ужа научна област: Аналитичка хемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања предвиђен овом докторском дисертацијом је развој и оптимизација аналитичког поступка за одређивање профила шећера и садржаја слободних аминокиселина у зрну житарица, посебно аспарагина као прекурсора у формирању акриламида у термички третираним производима. Према расположивим литературним подацима, један од агрономских приступа за смањење акумулације слободног аспарагина у зрну житарица је идентификација фактора животне средине, укључујући примену агро-техничких мера, који утичу на потенцијал житарица за формирање акриламида. Из тог разлога, истраживања ће бити усмерена и на испитивање утицаја различитих доза азотног и сумпорног ђубрива на садржај пре свега слободног аспарагина и редукујућих шећера у зрну житарица и последично на садржај акриламида и 5-хидроксиметилфурфурала (ХМФ) у кексу припремљеном од интегралног брашна испитиваних генотипова житарица. Смањење потенцијала житарица за формирање акриламида применом агрономских мера могло би значајно смањити ризик потрошача/конзумента од акриламида имајући у виду да су прехранбени производи од житарица, поред прженог кромпира и кафе, намирнице са највишим нивоом акриламида.

Планирано је да испитивања обухвате:

1. Развој методе високоефикасне течне хроматографије за брзо и поуздано одређивање слободних аминокиселина, посебно аспарагина у зрну житарица. У циљу оптимизације параметара методе, односно повећања ефикасности раздвајања појединачних аминокиселина, планирана је оптимизација хроматографских услова кроз оптимизацију процеса дериватизације, варирања градијента, односно састава мобилне фазе као и дужине трајања анализе. Планирано је да се поступак екстракције и услови хроматографије оптимизују за различите врсте житарица (кукуруз, хлебна и дурум пшеница, раж, овас, јечам, спелта, тритикале).
2. Одређивање садржаја слободних аминокиселина у зрну житарица, првенствено аспарагина, као и редукујућих шећера HPLC методом као прекурсора акриламида и ХМФ-а у термички третираним производима.
3. Поставку пољских огледа под контролисаним агротехничким условима на којима ће

бити примењени третмани ђубрења азотом и сумпором. Огледи ће бити постављени током две вегенационе сезоне у циљу утврђивања утицаја фактора спољне средине на садржај поменутих фитохемикалија. За истраживања су одабрана по два генотипа пшенице (ЗП Сара и ЗП Белија), ражи (БЛР/8-15 и Саво) и спелте (Остро и Нирвана), селекционисаних у Институту за кукуруз „Земун Поље“. Истраживање ће се спровести на огледном пољу које се састоји од 30 парцела, при чему се испитују различите комбинације третмана, укључујући нулту контролну (парцеле без третмана ђубрења), позитивну контролу (третмане са 100 кг/ха азота), као и третмане са додатком сумпора у различитим концентрацијама (10, 20 и 40 кг/ха).

4. Физичко-хемијске анализе зрна/интегралног брашна (пепео, протеини, скроб, уља, целулоза, укупни полифеноли, фенолне киселине, антиоксидативни капацитет, садржај дисулфидних веза и сулфхидрилних група, минералне супстанце, вискозитет скробне пасте).
5. Припрему кекса од интегралног брашна одабраних генотипова са различитим потенцијалом за формирање акриламида. При лабораторијским условима печењима биће оптимизована температура и време печења.
6. Хемијске анализе кекса (акриламид, ХМФ).
7. Сензорска анализа кекса
8. Хеометријске технике којима ће бити обрађени добијени резултати у циљу идентификације оптималних услова и третмана за смањење садржаја прекурсора за формирање акриламида.

3. Основне хипотезе

Основне хипотезе које ће истраживањима у оквиру ове докторске дисертације бити проверене су следеће:

1. Оптимизација аналитичког поступка одређивања слободних аминокиселина и шећера (побољшање аналитичких перформанси) - опсег концентрација, границе детекције и квантификације, линеарност;
2. Развој ефикасне (брзе и поуздане) методе за рутинску контролу садржаја прекурсора акриламида;
3. Утицај спољних фактора на садржај слободног аспарагина и редукујућих шећера у зрну житарица;
4. Контрола агротехничких услова у циљу добијања узорака са различитим садржајем аспарагина и редукујућих шећера као прекурсора акриламида; разматрање утицаја агротехничких мера и спољашњих услова на садржај фитохемикалија;
5. Примењене мере за смањење садржаја слободног аспарагина неће значајније утицати на хемијска својства зрна, као и на агрономска својства;
6. Потенцијал зрна за формирање акриламида смањен применом агротехничких мера (сумпорног ђубрива) имплицираће смањен садржај акриламида у термички третираним производима од житарица (кексу);
7. Садржај акриламида и ХМФ у термички третираним производима од житарица, поред садржаја слободног аспарагина и редукујућих шећера у зрну, зависи и од услова термичке обраде;

8. Добијени резултати обрађени хеометријским техникама могу допринети развоју агрономске стратегије за смањење потенцијала житарица за формирање акриламида;

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Акриламид је органско једињење растворљиво у води и неким органским растварачима, које представља термички индуковани контаминант хране. Интернационална агенција за истраживање канцера класификовала је акриламид као једињење које је вероватно канцерогено за људе, а истраживања показују да може бити генотоксичан и неуротоксичан. Тренутно акриламид представља један од основних проблема са којим се прехранбена индустрија широм света суочава. Производи од житарица су намирнице са веома високим садржајем акриламида. Према томе, изложеност акриламиду због велике потрошње ових производа ствара јасну претњу јавном здрављу и условљава потребу за смањењем акриламида у производима од житарица. Допринос производа од житарица уносу акриламида варира од земље до земље и зависи од прехранбених преференција. Према подацима, пекарски производи могу чинити од 20% до 60% укупног просечног уноса акриламида.

Акриламид у храни настаје током термичке обраде као производ Мајлардове реакције између аминокиселина слободног аспарагина и карбонилних група редукујућих шећера. Иако је ова реакција веома сложена, чини се да је реакција Strecker типа, која укључује слободни аспарагин, главни пут за формирање акриламида. Не занемарујући реактивност шећера, резултати су показали да је слободни аспарагин ограничавајући фактор за формирање акриламида у термички третираним производима од житарица. Сам аспарагин се може термички конвертовати у акриламид кроз реакције декарбоксилације и деаминације, али је принос акриламида из аспарагина много већи када је присутан карбонилни извор. Због тога је од великог интереса праћење прекурсора акриламида (првенствено слободног аспарагина) у сировим састојцима хране, као и одабир сировина са малим потенцијалом за стварање акриламида. Већина метода које се користе за анализу слободног аспарагина у биолошком материјалу су компликоване, дуготрајне и скупе, захтевају наменске и скупе уређаје као што су анализатори аминокиселина или специјални детектори. Штавише, код већине метода, поступак припреме узорка је временски и материјално веома захтеван. Оптимизација услова екстракције, уклањање протеина и других компоненти матрикса компликују овај процес. Затим се примењује поступак дериватизације. Неки деривати су мање стабилни од других, тако да је потребно време да се оптимизују услови дериватизације. Међутим, произвођачима хране су потребне једноставније и брже методе за анализу сировина. Из тог разлога циљ ових истраживања је развити и оптимизовати брзу, лаку и поуздану методу високофикасне течне хроматографије за одређивање садржаја слободног аспарагина у зрну житарица (кукуруза, пшенице, ражи, оваса, јечма, спелте). Један од циљева је и примена контролисаних агротехничких услова са ефектом на смањење акумулације слободног аспарагина у зрну житарица, као и идентификација фактора животне средине који утичу на потенцијал житарица за формирања акриламида. Циљ је такође утврдити да ли се смањење садржаја слободног аспарагина, услед примена контролисаних агротехничких мера, одражава на смањење садржаја акриламида у кексу од испитиваних житарица, у којој мери и под којим условима термичке прераде. Поред тога циљ је да се испита садржај ХМФ-а, као такође једног од термички индукованих контаминаната, у кексу на бази испитиваних житарица, као и сензорска својства производа како би се утврдили услови за производњу нутритивно и сензорски прихватљивог здравствено безбедног производа.

Планирана истраживања би требало да резултују проналажењем оптималног односа

азота и сумпора за спречавање великог повећања слободног аспарагина у зрну житарица и допринесу развоју агрономске стратегије за смањење потенцијала житарица за формирање акриламида. Поред тога, истраживања би требала да допринесу идентификацији генотипа са редукујућим садржајем слободног аспарагина, као и идентификацији услова термичке прераде који индукују прихватљив ниво акриламида (300 ng/g) и помогну прехранбеној индустрији у успостављању оптималних услова за производњу здравствено безбедних производа.

5. Методе истраживања

1. Високофикасна течна хроматографија: аминокиселине, фенолне киселине, ХМФ, редукујући шећери.
2. Сектрофотометријске анализе: укупни феноли, антиоксидативни потенцијал, дисулфидне везе, сулфхидрилне групе.
3. Масена спектрометрија са индуктивно спрегнутом плазмом (ICP-MS): минералне супстанце
4. Класичне физичко-хемијске методе анализе: Kjeldahl метода: укупни протеини
5. Soxhlet екстракција: уље
6. Полариметријска анализа: скроб по Еверсу (Ewers)
7. Амилографске анализе: вискозитет – ААСС методом (2000) на Brabender-у.
8. Течна хроматографија са масеном спектрометријом (LC-MS): акриламид
9. Хеметријске методе: анализа варијансе, анализа главних компонената кластерска анализа.

6. Литература

1. Oddy, J., Addy, J., Mead, A., Hall, C., Mackay, C., Ashfield, T., Halford, N. G. (2023). Reducing dietary acrylamide exposure from wheat products through crop management and imaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(7), 3403-3413.
2. Postles, J., Curtis, T. Y., Powers, S. J., Elmore, J. S., Mottram, D. S., Halford, N. G. (2016). Changes in free amino acid concentration in rye grain in response to nitrogen and sulfur availability, and expression analysis of genes involved in asparagine metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 7, 917.
3. Oddy, J., Alarcón-Reverte, R., Wilkinson, M., Ravet, K., Raffan, S., Minter, A., Pearce, S. (2021). Reduced free asparagine in wheat grain resulting from a natural deletion of TaASN-B2: investigating and exploiting diversity in the asparagine synthetase gene family to improve wheat quality. *BMC plant biology*, 21, 1-17.
4. Kocadağlı, T., Žilić, S., Taş, N. G., Vančetović, J., Dodig, D., Gökmen, V. (2016). Formation of α -dicarbonyl compounds in cookies made from wheat, hull-less barley and colored corn and its relation with phenolic compounds, free amino acids and sugars. *European Food Research and Technology*, 242, 51-60.
5. Žilić, S., Mogol, B. A., Akilloğlu, G., Serpen, A., Babić, M., Gökmen, V. (2013). Effects of infrared heating on phenolic compounds and Maillard reaction products in maize flour.

Journal of Cereal Science, 58(1), 1-7.

6. Raffan, S., Halford, N. G. (2019). Acrylamide in food: Progress in and prospects for genetic and agronomic solutions. *Annals of Applied Biology*, 175(3), 259-281.
7. Curtis, T. Y., Muttucumararu, N., Shewry, P. R., Parry, M. A., Powers, S. J., Elmore, J. S., Halford, N. G. (2009). Effects of genotype and environment on free amino acid levels in wheat grain: implications for acrylamide formation during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 1013-1021.
8. Žilić, S., Nikolić, V., Mogol, B. A., Hamzalioglu, A., Tas, N. G., Kocadağlı, T., Gokmen, V. (2022). Acrylamide in corn-based thermally processed foods: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(14), 4165-4181.
9. Žilić, S., Dodig, D., Basić, Z., Vančetović, J., Titan, P., Đurić, N., Tolimir, N. (2017). Free asparagine and sugars profile of cereal species: the potential of cereals for acrylamide formation in foods. *Food additives & contaminants: part A*, 34(5), 705-713.
10. Kaur, N., & Halford, N. G. (2023). Reducing the risk of acrylamide and other processing contaminant formation in wheat products. *Foods*, 12(17), 3264.
11. Soofizada, Q., Pescatore, A., Guerrini, L., Fabbri, C., Mancini, M., Orlandini, S., Napoli, M. (2022). Effects of nitrogen plus sulfur fertilization and seeding density on yield, rheological parameters, and asparagine content in old varieties of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 12(2), 351.
12. Szafrńska, A., Podolska, G., Świder, O., Kotyrba, D., Aleksandrowicz, E., Podolska-Charlery, A., Roszko, M. (2024). Factors Influencing the Accumulation of Free Asparagine in Wheat Grain and the Acrylamide Formation in Bread. *Agriculture*, 14(2), 207.
13. Žilić, S., Aktağ, I. G., Dodig, D., Filipović, M., Gökmen, V. (2020). Acrylamide formation in biscuits made of different wholegrain flours depending on their free asparagine content and baking conditions. *Food research international*, 132, 109109.
14. Žilić, S., Aktağ, I. G., Dodig, D., Gökmen, V. (2021). Investigations on the formation of Maillard reaction products in sweet cookies made of different cereals. *Food Research International*, 144, 110352.