



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“– БИТОЛА  
ТЕХНОЛОШКО-ТЕХНИЧКИ ФАКУЛТЕТ – ВЕЛЕС



**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**„ИСТРАЖУВАЊЕ НА СИНЕРГЕТСКИТЕ ЕФЕКТИ ОД РЕФОРМУЛИРАЊЕ НА  
РЕЦЕПТУРАТА СО БРАШНО ОД ТИКВА И ПРИЛАГОДУВАЊЕ НА  
ТЕХНОЛОШКИОТ ПРОЦЕС ЗА РЕДУКЦИЈА НА АКРИЛАМИД ВО  
ПРОИЗВОДСТВОТО НА ЛЕБ“**

**МЕНТОР:**

**Ред. проф. д-р Даниела Николовска Неделкоска**

**ИЗРАБОТИЛ:**

**м-р Дурим Алија**

**ВЕЛЕС, 2026**

## **ЧЛЕНОВИ НА КОМИСИЈА:**

**Ред. проф. д-р Даниела Николовска Неделкоска, ментор**  
Технолошко-технички факултет – Велес, Универзитет  
„Св. Климент Охридски“ – Битола

---

**Ред. проф. д-р Викторија Стаматовска, член**  
Технолошко-технички факултет – Велес  
Универзитет „Св. Климент Охридски“ – Битола

---

**Вонр. проф. д-р Везирка Јанкулоска, член**  
Технолошко-технички факултет – Велес  
Универзитет „Св. Климент Охридски“ – Битола

---

**Ред. проф. д-р Јоанна Харасим, член**  
Факултет за производствено инженерство,  
Оддел за биотехнологија и анализа на храна,  
Универзитет за економија и бизнис во Вроцлав, Полска

---

**Вонр. проф. д-р Гафур Цабири, член**  
Факултет за прехранбена технологија и исхрана  
Универзитет во Тетово

---

## ИЗЈАВА ЗА ОРИГИНАЛНОСТ НА ТРУДОТ

Јас, м-р Дурим Алија, кандидат за одбрана на докторската дисертација со наслов **„ИСТРАЖУВАЊЕ НА СИНЕРГЕТСКИТЕ ЕФЕКТИ ОД РЕФОРМУЛИРАЊЕ НА РЕЦЕПТУРАТА СО БРАШНО ОД ТИКВА И ПРИЛАГОДУВАЊЕ НА ТЕХНОЛОШКИОТ ПРОЦЕС ЗА РЕДУКЦИЈА НА АКРИЛАМИД ВО ПРОИЗВОДСТВОТО НА ЛЕБ“**, под целосна морална, материјална и друга законска одговорност, изјавувам дека дисертацијата е мој самостоен и оригинален труд. При нејзината изработка ги почитував сите важечки законски прописи од областа на заштитата на интелектуалната сопственост и не сум користел трудови на други автори без соодветно и јасно наведување на изворите согласно со пропишаните методолошки стандарди. Сите консултирани извори уредно и целосно се наведени во Користената литература, а се составен дел на трудот. Со ова потврдувам дека дисертацијата не претставува плагијат, ниту, во целина или делумно, претходно е пријавувана или одбранета како академски труд на која и да било институција.

Велес, 2026

Кандидат: м-р Дурим Алија

## ИЗЈАВА ЗА ЛЕКТОРИРАЊЕ НА ДОКТОРСКИОТ ТРУД

Јас, м-р Дурим Алија, студент на трет циклус студии на студиската програма „Иновативни технологии за храна и нутриционизам“, со број на досие 13, изјавувам дека докторскиот труд со наслов **„ИСТРАЖУВАЊЕ НА СИНЕРГЕТСКИТЕ ЕФЕКТИ ОД РЕФОРМУЛИРАЊЕ НА РЕЦЕПТУРАТА СО БРАШНО ОД ТИКВА И ПРИЛАГОДУВАЊЕ НА ТЕХНОЛОШКИОТ ПРОЦЕС ЗА РЕДУКЦИЈА НА АКРИЛАМИД ВО ПРОИЗВОДСТВОТО НА ЛЕБ“** е лектуриран од лекторката Благојка Здравковска-Адамова.

Постапката за лектурирање е спроведена согласно со академските стандарди и соодветно е документирана во моето студентско досие.

## ТРУДОВИ ОБЈАВЕНИ ОД ОБЛАСТА НА ДОКТОРАТОТ

1. Alija, D., Olędzki, R., Nikolovska Nedelkoska, D., Wojciechowicz-Budzisz, A., Xhabiri, G., Pejcz, E., Alija, E., & Harasym, J. (2025). The Addition of Pumpkin Flour Impacts the Functional and Bioactive Properties of Soft Wheat Composite Flour Blends. *Foods*, 14(2), 243. <https://doi.org/10.3390/foods14020243>
2. Alija, D., Olędzki, R., Nikolovska Nedelkoska, D., Wojciechowicz-Budzisz, A., Pejcz, E., Jankuloska, V., Xhabiri, G., & Harasym, J. (2025). Prolonged Proofing Modulates the Acrylamide Content, Nutritional and Functional Characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Plomo) and Soft Wheat Composite Bread. *Foods*, 14(3), 437. <https://doi.org/10.3390/foods14030437>
3. Alija, D., Olędzki, R., Nikolovska Nedelkoska, D., Pejcz, E., Wojciechowicz-Budzisz, A., Stamatovska, V., & Harasym, J. (2025). *Cucurbita maxima* Plomo Peel as a Valuable Ingredient for Bread-Making. *Foods*, 14(4), 597. <https://doi.org/10.3390/foods14040597>
4. Alija, D., Nikolovska Nedelkoska, D., Olędzki, R., & Harasym, J. (2025, June 26). Consumer insights on the presence of acrylamide in baked products: Perception, awareness and behaviour. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, Nr 40 (2024). <https://doi.org/10.15611/nit.2024.40.01>
5. Alija, D., Xhabiri, G., Baah, R. O., Ziberi, E., Stojanovska, T., Miftari, H., & Luma, R. (2024). The effect of adding different additives on acrylamide content and antioxidant activity of innovative functional cereal products. *IJFTN International Journal of Food Technology and Nutrition*, 7(13-14), 26–34. <https://doi.org/10.62792/ut.jftn.v7.i13-14.p2685>

## **БЛАГОДАРНОСТ**

*Со најдлабока почит и искрена благодарност ја упатувам својата признателност до мојот ментор, редовен проф. д-р Даниела Николовска Неделкоска, за нејзиното стручно водство, експертските совети, трпението и за континуираната поддршка во текот на целиот процес на изработката на оваа докторска дисертација.*

*Особена благодарност изразувам до членовите на Комисијата за оценување, ред. проф. д-р Јоанна Харасим и до нејзиниот тим од Одделот за биотехнологија и анализа на храна, Адаптивен акцелератор за системи за храна – Истражувачки центар, при Универзитетот за економија и бизнис во Вроцлав, Република Полска, за нивната поддршка и за тоа што овозможија изведување на дел од анализите во Полска, и до ред. проф. д-р Викторија Стаматовска, вонреден проф. д-р Везирка Јанкулоска и вонреден проф. д-р Гафур Цабири, за нивните конструктивни сугестии, професионални совети и за времето посветено на ревизија и на унапредување на квалитетот на оваа докторска дисертација..*

*Искрено им благодарам на моите колеги и пријатели за нивната поддршка, соработка и за охрабрувањето во текот на академското патување.*

*Најдлабока и најискрена благодарност до моето семејство – моите родители – за нивната безусловна љубов, трпението, моралната и емоционалната поддршка. Нивната вера во мене ми даде сила и мотивација да го завршам овој докторат.*

## СОДРЖИНА :

1.1 МЕКО ПЧЕНИЧНО БРАШНО (SWF) .....	24
1.1.1 Текстура на зрното и однесување при мелење .....	25
1.1.2 Технологија на производство на леб: како се однесува SWF во тесто .....	25
1.1.3 Нутритивниот профил на мекото пченично брашно (SWF) .....	26
1.2 ТИКВА ( <i>Cucurbita</i> ): ТАКСОНОМИЈА, ЕКОНОМСКА И НУТРИТИВНА ВАЖНОСТ .....	27
1.2.1 Употреба на брашно од тиква во производство на леб: нутритивни, технолошки-функционални и одржливи аспекти .....	29
1.3 АКРИЛАМИД ВО ЖИТНИ ПРОИЗВОДИ .....	30
1.3.1 Структура и својства на акриламидот .....	31
1.4 ФАКТОРИ ШТО ВЛИЈААТ ВРЗ ФОРМИРАЊЕТО АКРИЛАМИД ВО ПЕКАРСКИТЕ ПРОИЗВОДИ .....	35
1.4.1 Температура и време на печење .....	35
1.4.2 Времетраење на ферментација .....	36
1.4.3 Состав на суровините .....	37
1.4.4 pH-вредност .....	38
1.4.5 Влажност и активност на водата ( $a_w$ ) .....	39
1.5 ПРАВНА РЕГУЛАТИВА ЗА ПРИСУСТВОТО НА АКРИЛАМИД ВО ХРАНА ...	40
1.6 ТЕХНОЛОШКИ СТРАТЕГИИ И МЕТОДИ ЗА НАМАЛУВАЊЕ НА СОДРЖИНАТА НА АКРИЛАМИД ВО ПЕКАРСКИТЕ ПРОИЗВОДИ .....	43
1.7 ПРЕДИЗВИЦИ И ПРИСТАПИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВО НА КОМПОЗИТЕН (ПЧЕНИЦА-ТИКВА) ЛЕБ ЗА РЕДУЦИРАЊЕ НА НИВОТО НА АКРИЛАМИД .....	47
1.7.1 Технолошки приспособувања за намалување на акриламидот .....	47
1.7.2 Оптимизација рецептура–процес: синергија и компромиси .....	48
1.8 МЕТАБОЛИЗМОТ НА АКРИЛАМИД ВО ЧОВЕЧКОТО ТЕЛО .....	49
1.8.1 Токсиколошки ефекти на акриламид врз човечкото тело и ризици претставени со неговото консумирање .....	51
1.8.2 Механизам на невротоксичност предизвикана од акриламид – аксонална дегенерација .....	52
1.8.3 Апоптоза и автофагија .....	53
1.8.4 Оксидативен стрес .....	56

1.8.5 Епидемиолошки студии на акриламид во човековата исхрана и ризикот од рак .....	56
3.1 АНАЛИЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА СУРОВИНИТЕ .....	65
3.1.1 Суровини.....	65
3.1.2 Подготовка на мешавини од брашно.....	65
3.1.3 Физичко-хемиските карактеристики на брашното .....	66
3.1.3.1 Хемиски состав на брашно .....	66
3.1.3.2 Гранулометриски карактеристики на брашното од пченица и на брашното од тиква.....	67
3.1.4 Технолошко-функционални својства на контролното и на композитните брашна.....	68
3.1.4.1 Капацитет за задржување вода (Water Holding Capacity – WHC).....	68
3.1.4.2 Својствата на желатинирање; Индекс на апсорпција на вода (WAI), индекс на растворливост во вода (WSI) и моќ на набабрување (SP).....	69
3.1.4.3 Капацитет за апсорпција на вода (WAC), на масло (OAC) и хидрофилно/липофилен индекс (HLI) .....	71
3.1.5 Определување на реолошки карактеристики .....	72
3.1.5.1 Карактеристики на брашното за формирање паста – RVA (Rapid Visco Analyzer).....	72
3.1.5.2 Текстура на гел .....	73
3.1.5.3 Вискоеластични карактеристики .....	74
3.1.6 Параметри на боја .....	75
3.1.7 Подготовка на екстракти и анализа на антиоксидативниот профил и на содржината на редуцирачки шеќери во брашната .....	75
3.1.7.1 Определување на вкупната содржина на полифенолни соединенија .....	76
3.1.7.2 Определување на антиоксидативниот потенцијал на брашната.....	77
3.1.7.2.1 Метод DPPH .....	77
3.1.7.2.2 Метод ABTS .....	77
3.1.7.2.3 Метод FRAP.....	78
3.1.7.3 Определување на содржината на редуцирачки шеќери .....	78
3.2 ПОДГОТОВКА, АНАЛИЗА И ЕВАЛУАЦИЈА НА ПРИМЕРОЦИТЕ ЛЕБ.....	80
3.2.1 Подготовка на леб .....	80
3.2.2 Квалитативни карактеристики на лебовите.....	82

3.2.2.1 Загуба на маса при печење и специфичен волумен .....	82
3.2.3 Физичко-хемиска карактеризација на лебовите .....	83
3.2.3.1 Активност на водата ( $a_w$ ) .....	83
3.2.3.2 Анализа на боја (кора и внатрешен дел) .....	84
3.2.4 Определување на текстуралниот профил на лебот (Texture Profile Analysis – ТРА).....	85
3.2.5 Определување на порозноста на лебот .....	86
3.2.6 Подготовка на екстракти и определување антиоксидативни, оксидоредуктивни активности, вкупни фенолни соединенија и редуцирачки шеќери во лебовите.....	87
3.2.7 Анализа на акриламид .....	88
3.2.8 Сензорна анализа .....	89
4.1 АНАЛИЗА НА БРАШНАТА ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА ПРИМЕРОЦИТЕ ЛЕБ ..	91
4.1.1 Гранулометриски карактеристики на брашното (пченично и од тиква).....	92
4.1.2 Технолошко-функционалните својства на брашната – Капацитет за апсорпција и за задржување вода и масло (WAC, WHC, OAC); Индекс на апсорпција и растворливост во вода (WAI, WSI); Моќ на набабрување (SP); Хидрофилно/липофилен индекс (HLI) .....	93
4.1.3 Вискозност на брашната (пченично и од тиква) и на мешавините .....	97
4.1.4 Текстура на гел .....	100
4.1.5 Вискоеластични карактеристики на гелот .....	102
4.1.6 Параметри на боја .....	105
4.1.7 Антиоксидативни карактеристики и содржина на редуцирачки шеќери во примероците .....	106
4.2 АНАЛИЗА НА ПРИМЕРОЦИТЕ ЛЕБ .....	111
4.2.1 Волумен и површина на примероците леб .....	111
4.2.2 Специфичен волумен на примероците леб.....	114
4.2.3 Загуба при печење на примероците леб.....	116
4.2.4 Активност на вода ( $a_w$ ) и порозност на примероците леб.....	120
4.2.5 Текстурен профил на примероците леб .....	122
4.2.6 Профил на бојата кај примероците леб.....	125
4.2.7 Индекси на потемнување (BI) и на белина (WI) на примероците леб .....	128
4.2.8 Содржина на редуцирачки шеќери во примероците леб.....	131

4.2.9 Вкупна содржина на полифеноли и антиоксидативен потенцијал на внатрешниот дел и на корката на примероците леб .....	133
4.2.10 Содржина на акриламид во внатрешниот дел и во кората на примероците леб .....	142
4.2.11 Сензорна анализа .....	146
4.2.12 Анализа PCA (Principal Component Analysis) .....	149

## СПИСОК НА ТАБЕЛИ:

Табела 1: Основен физичко-хемиски состав на меко пченично брашно (на 100 g) .....	24
Табела 2: Основен физичко-хемиски состав на <i>Cucurbita maxima</i> .....	27
Табела 3: Содржина на акриламид во различни прехранбени производи ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), врз основа на податоците од EFSA (2011, 2015), Michalak et al. (2013, 2016) и JECFA (2020) .....	33
Табела 4: Референтни вредности за акриламид во пекарски производи поставени од Европската комисија за 2007 година – 2021 периоди (EU, 2013; EU, 2017; Sarion et al., 2021) .....	41
Табела 5: Нивоата на референтни вредности за присуство на акриламид во храната (оригинално преземено, Сл. весник на РСМ бр. 39/2019) .....	42
Табела 6: Регулаторни и технолошки мерки за намалување акриламид во пекарски производи: резиме на докази од литературата .....	44
Табела 7: Хемиски состав на меко пченично брашно (SWF) и на брашно од тиква (PF) (на 100 g).....	91
Табела 8: Гранулометриска анализа на пченичното брашно и на брашното од тиква ....	92
Табела 9: Технолошко-функционалните својства на мешавините од брашно од тиква и од пченично брашно .....	94
Табела 10: Вискозност на брашната (пченично, од тиква и мешавини).....	97
Табела 11: Текстура на геловите добиени од RVA.....	100
Табела 12: Реолошки својства на брашното од тиква, мека пченица и од нивните мешавини .....	102
Табела 13: Параметри на боја кај брашната и кај нивните мешавини .....	105
Табела 14: Содржината на редуцирачките шеќери изразена како еквивалент .....	107
на гликоза во мешавини од брашно од тиква и од мека пченица .....	107
Табела 15: Вкупна содржина на полифеноли и антиоксидативен потенцијал на примероците брашно .....	108
Табела 16: Волумен и површина на лебот добиен при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, определени веднаш по печењето и по 7 дена складирање .....	112
Табела 17: Специфичен волумен на леб добиен при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, определени веднаш по печењето и по 7 дена складирање .....	114
Табела 18: Водна активност и порозност на лебот при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, веднаш по печењето и по 7 дена.....	120
Табела 19: Текстурен профил на лебовите при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, веднаш по печењето и по 7 дена. ....	123
Табела 20: Сензорни карактеристики на примероците леб .....	146

## СПИСОК НА СЛИКИ:

Слика бр. 1: Преглед на акриламидот, неговата токсичност и законските прописи во пекарската индустрија .....	31
(приспособено од Sarion et al., 2021).....	31
Слика бр. 2: Формирање и структура на акриламид .....	32
(приспособено од Michalak et al., 2020) .....	33
Слика бр. 3: Конверзија на акриламид во глицидамид преку цитохром P-450 CYP2E1 .....	50
(приспособено од Narahar et al., 2021).....	50
Слика бр. 4: Метаболичкиот пат на акриламидот.....	51
(приспособено од Zhao et al., 2022) .....	51
Слика бр. 5: Потенцијалниот механизам на акриламид – индуцирана апоптоза и автофагија (приспособено од Zhao et al., 2022).....	55
Слика бр. 6: Подготовка на суровината („брашно“ од тиква).....	66
Слика бр. 7: Апарат за определување гранулометриски состав на брашното LPzE-2e MultiserW Morek.....	67
Слика бр. 8: Приказ од постапките при определување на технолошко-функционалните својства (WHS, WAI, WSI, SP, WAC, OAC и HLI) на брашното (од пченица и од тиква) .....	69
Слика бр. 9: Шематски приказ на процесот на производство .....	80
Слика бр. 10: Изглед на ферментираниите примероци и на финалните производи .....	81
Слика бр. 11: Изглед на напречен пресек на примероците леб .....	147

## СПИСОК НА ГРАФИКОНИ:

Графикон бр. 1: Методи за намалување на акриламид во пекарските производи (приспособено од Sarion et al., 2021).....	43
Графикон бр. 2: Профили на вискозитет на брашната од мека пченица и тиква (SWF и PF) и на мешавините од брашна од SWF и PF (5-20 % брашно од тиква) .....	99
Графикон бр. 3: Профилите на скенирање на фреквенција и на амплитуда на мешавините од брашно од тиква/мека пченица. ....	103
Графикон бр. 4: Просечна загуба при печење на примероците леб .....	116
Графикон бр. 5: Загуба при печење на лебот .....	118
Графикон бр. 6: Параметри на бојата ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $C^*$ , $h^\circ$ ) на корката на лебот.....	126
Графикон бр. 7: Параметри на бојата ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $C^*$ , $h^\circ$ ) на внатрешниот дел на лебот .....	127
Графикон бр. 8: Индекс на потемнување (BI) и индекс на избелување (WI) на корката и на внатрешниот дел од лебот на 0 и на 7 дена .....	129
Графикон бр. 9: Содржина на редуцирачки шеќери во кората и во внатрешниот дел на примероците леб .....	131
Графикон бр. 10: Вкупна содржина на полифеноли во кората и во внатрешниот дел на примероците леб .....	133
Графикон бр. 11: Антиоксидативната активност определена со методот DPPH во кората и во внатрешниот дел на примероците леб .....	136
Графикон бр. 12: Антиоксидативната активност определена со методот ABTS во кората и во внатрешниот дел на примероците леб .....	137
Графикон бр. 13: Редуктивна моќ определена со методот FRAP во кората и во внатрешниот дел на композитниите лебови.....	139
Графикон бр. 14: Содржина на акриламид во кората и во внатрешниот дел на композитниот леб.....	142
Графикон бр. 15: Сензорните карактеристики на лебот.....	148
Графикон бр. 16: Двослоен приказ на анализата на главни компоненти (PCA – Principal Component Analysis), кој се состои од биplot (горе) и факторска мапа (долу), дефинирани преку компонентите PC1 и PC2, со вкупна варијанса на податоците од 87,2 %.....	149

## СПИСОК НА ФОРМУЛИ:

Капацитетот за задржување вода (WHC).....	68
Индекс на апсорпција на вода (WAI) .....	69
Индекс на растворливост во вода (WSI) .....	69
Моќта на набабрување (SP).....	70
Капацитетот за апсорпција на вода (WAC).....	71
Капацитетот за апсорпција на масло (OAC).....	71
Хидрофилно/липофилниот индекс (HLI) .....	71
Специфичниот волумен.....	83
Индекс на белина (WI).....	84
Индекс на потемнување (BI).....	84

## СПИСОК НА ПРИЛОЗИ:

Прилог 1: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по печење (0 денови): едночасовна ферментација (1Н).....	183
Прилог 2: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по складирање (7 дена): едночасовна ферментација (1Н).....	184
Прилог 3: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по печење (0 денови): двоочасовна ферментација (2Н).....	185
Прилог 4: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по складирање (7 дена): двочасовна ферментација (2Н).....	186

## СКРАТЕНИЦИ

<b>IARC</b>	Меѓународна агенција за истражување на ракот – International Agency for Research on Cancer
<b>HACCP</b>	Анализа на опасности и критични контролни точки – Hazard Analysis and Critical Control Points
<b>SWF</b>	Меко пченично брашно – Soft wheat flour
<b>PF</b>	Брашно од тиква – Pumpkin Flour
<b>SRW</b>	Мека црвена зимска пченица – Soft red winter
<b>SW</b>	Мека бела пченица – Soft white
<b>CM</b>	Сува материја – Dry weight
<b>LAB</b>	Млечнокисели бактерии
<b>EFSA</b>	Европска агенција за безбедност на храната – European Food Safety Authority
<b>JECFA</b>	Заеднички експертски комитет на Светската здравствена организација (СЗО) и ФАО за адитиви во храна – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
<b>CAC/RCP</b>	Кодекс на практика за намалување на акриламид во храната
<b>GSH</b>	Глутатион
<b>GST</b>	Глутатион S-трансфераза
<b>P-450 CYP2E1</b>	Цитохром
<b>GA</b>	Глицадимид
<b>ДНК</b>	Дезоксирибонуклеинска киселина
<b>AAMA</b>	N-ацетил-S-(3-амино-3-оксопропил)-цистеин
<b>GAMA</b>	N-ацетил-S-(1-карбамоил-2-хидроксиетил)-цистеин
<b>Hb</b>	Хемоглобин
<b>CONTAM</b>	Панел за загадувачи во синцирот на исхрана
<b>NO</b>	Азотен оксид
<b>MAPK</b>	Митоген-активирана протеин киназа
<b>ERK</b>	Екстрацелуларно регулирани протеински кинази
<b>JNK</b>	Терминална киназа
<b>NF-κB</b>	Нуклеарен фактор-κB
<b>Nrf2</b>	Еритроиден фактор 2
<b>ROS</b>	Кислородни видови
<b>FFQ</b>	Прашалник за фреквенција на храна

<b>WAC</b>	Капацитет за апсорпција на вода
<b>WHC</b>	Капацитет за задржување вода
<b>OAC</b>	Капацитет за апсорпција на масло
<b>WAI</b>	Индекс на апсорпција на вода
<b>WSI</b>	Индекс на растворливост на вода
<b>SP</b>	Моќ на набабрување
<b>HFI</b>	Хидрофилно/липофилен индекс
<b>RVA</b>	Својства на вискозност – Rapid Visco Analyzer
<b>TPA</b>	Текстурален профил – Texture Profile Analysis
<b>L*</b>	Светлина
<b>a*</b>	Црвенило/зеленило
<b>b*</b>	Жолтило/синило
<b>C*</b>	Хрома
<b>h°</b>	Агол на нијанса
<b>TPC</b>	Вкупна содржина на полифенолни соединенија – Total Phenolic Content
<b>DPPH</b>	Антиоксидативен капацитет – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>ABTS</b>	Антиоксидативен капацитет – 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<b>FRAP</b>	Редуктивна моќ – Ferric Reducing Antioxidant Power
<b>DNS</b>	Содржина на редуцирачки шеќери – 3,5-dinitrosalicylic acid
<b>WI</b>	Индекс на белина – Whitening Index
<b>BI</b>	Индекс на потемнување – Browning Index
<b>1H</b>	Едночасовна ферментација
<b>2H</b>	Двочасовна ферментација
<b>PCA</b>	Анализа на главни компоненти – Principal Component Analysis

## АПСТРАКТ

Создавањето акриламид во лебот претставува сериозен ризик за здравјето, па затоа се неопходни стратегии за негово намалување без да се наруши нутритивната вредност. Ова истражување ги испитува синергетските ефекти од замената на меко пченично брашно со брашно од тиква (*Cucurbita maxima* Plomo) во концентрации 0–20% и од продолжената ферментација (едночасовна – 1Н и двочасовна – 2Н) врз формирањето акриламид и врз квалитетот на лебот.

Во првиот дел на истражувањето, преку детална карактеризација на мешавините од брашна беа анализирани: гранулометриската распределба; технолошко-функционалните својства (WNC, WAC, WAI, WSI, SP, OAC); профилите на паста (RVA); текстурата на гелот (TPA); реолошкото однесување (frequency sweeps); бојата; редуирачките шеќери; како и биоактивните параметри (TPC, DPPH, ABTS) во водени и етанолни екстракти. Повисоката застапеност на фини честички (<80  $\mu\text{m}$ : 13,26 %) ја зголеми водната интеракција (WNC 2,52→3,56), го намали максималниот вискозитет (2444,0→1859,5  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ), а ја стабилизираше гел-структурата ( $G'$  112,7→1151,0 Pa) со помала зависност од фреквенција; бојата се затемни ( $L^*$  91,00→84,28) со изразито зголемување на жолто-портокаловата нијанса ( $b^*$  10,13→27,13). TPC порасна до 0,57  $\text{mg/g DM}$  (вода) и 0,34  $\text{GAE mg/g DM}$  (етанол), паралелно со повисока антиоксидативна активност.

Во втората фаза кај примероците леб (контролен и лебови со 0–20 % брашно од тиква, како и две времиња на ферментација) се оценети: технолошките и сензорните својства, бојата на корката и внатрешниот дел, водната активност, содржината на редуирачки шеќери и на вкупни фенолни компоненти, антиоксидативниот потенцијал и присуството на акриламид. Продолжената ферментација (1Н наспроти 2Н) го намали акриламидот во корката кај лебот добиен со 20 % супституција на пченичното со брашно од тиква од 220 на 150 единици. Биоактивните својства значајно се подобрија: вкупната содржина на полифеноли се зголеми до 0,57  $\text{mg/g DM}$  (воден екстракт) и 0,34  $\text{mg GAE/g DM}$  (етанолен екстракт), паралелно со засилена антиоксидативна активност. Контролата постигна највисок специфичен волумен ( $2,40 \pm 0,01 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) по двочасовна ферментација, додека 20 % супституција го намали на  $1,69 \pm 0,02 \text{ cm}^3/\text{g}$ ; почетната цврстина порасна од  $6,8 \pm 1,5 \text{ N}$  (контрола) на  $14,3 \pm 1,5 \text{ N}$  (20 %) по едночасовна ферментација, а водната активност се намали од  $0,966 \pm 0,002$  (контрола) на  $0,945 \pm 0,004$  (20 %) по двочасовна ферментација.

Наодите укажуваат на тоа дека примена на 5–10 % брашно од тиква, комбинирано со продолжена ферментација (киснење) на тестото во времетраење од 2 часа, претставува оптимален пристап што овозможува значајно подобрена биоактивност и намалено формирање акриламид, при задржување прифатливи квалитативни параметри на лебот.

**Клучни зборови:** редуција на акриламид, брашно од тиква, време на ферментација, антиоксидативна активност, вкупна содржина на полифеноли.

## ABSTRACT

The formation of acrylamide in bread poses a significant health risk, which calls for reduction strategies that do not compromise its nutritional value. This study evaluates the synergistic impact of partial substitution of soft wheat flour with pumpkin flour (*Cucurbita maxima*, cv. Plomo; 0–20%) and extended proofing times (60 vs. 120 min) on acrylamide formation and bread quality. First, flour blends were comprehensively characterized for particle size distribution; techno-functional properties (WHC, WAC, WAI, WSI, SP, OAC); pasting behavior (RVA); gel texture (TPA); small-amplitude oscillatory rheology (frequency sweeps); color; and bioactive metrics (TPC, DPPH, ABTS) in water and ethanol extracts. A higher fraction of fines (<80  $\mu\text{m}$ : 13.26%) enhanced water–matrix interactions (WHC 2.52→3.56), lowered peak viscosity (2444.0→1859.5  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ), and strengthened gel stability ( $G'$  112.7→1151.0 Pa) with reduced frequency dependence; color darkened ( $L^*$  91.00→84.28) with a marked increase in yellow-orange hue ( $b^*$  10.13→27.13). TPC increased to 0.57 mg/1 g DM (water) and 0.34 GAE mg/1 g DM (ethanol), accompanied by higher antioxidant activity. Subsequently, composite breads (0–20% substitution; 1H/2H proofing) were assessed for technological and sensory attributes, crust/crumb color, water activity, reducing sugars, TPC/antioxidant capacity, and acrylamide in crust and crumb. Extending proofing to 2H reduced crust acrylamide in 20% pumpkin breads from 220 to 150 units compared with 1H proofing. Bioactive properties improved significantly, with TPC increasing up to 0.57 mg/1 g DM and 0.34 GAE mg/1 g DM in water and ethanol extracts, respectively, accompanied by enhanced antioxidant activity. The control achieved the highest specific volume ( $2.40 \pm 0.01 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) after 120 min, whereas 20% substitution decreased it to  $1.69 \pm 0.02 \text{ cm}^3/\text{g}$ ; initial hardness rose from  $6.8 \pm 1.5 \text{ N}$  (control) to  $14.3 \pm 1.5 \text{ N}$  (20%) after 60 min, and water activity declined from  $0.966 \pm 0.002$  (control) to  $0.945 \pm 0.004$  (20%) at 2H. Overall, a 5–10% pumpkin-flour substitution coupled with a 2H proofing time emerges as an optimal window that enhances bioactive properties and lowers acrylamide formation while maintaining acceptable bread quality.

**Keywords:** acrylamide reduction, pumpkin flour, proofing time, antioxidant activity, total phenolic content.

## ВОВЕД

Реформулацијата на житните производи со додавање зеленчук или овошје како извори на биоактивни состојки, е клучен правец во современата прехранбена технологија, насочен кон подобрување на нутритивноста и на функционалноста, со паралелно адресирање на безбедносни ризици. Во тој контекст, тиквата (род *Cucurbita*, фамилија *Cucurbitaceae*) особено е релевантна поради широката агрономска распространетост и традиционална употреба во исхраната и во медицината. Тиквата е богат извор на фенолни соединенија, каротеноиди, диететски влакна и витамини (Hussain et al., 2021; Hussain et al., 2022a), при што  $\beta$ -каротенот, компонента што ја детерминира портокаловата боја, е значаен провитамин А (Černiauskiėnė et al., 2014; El Khatib & Muhieddine, 2020; Anitha et al., 2020;). Антиоксидативниот потенцијал, преку биогенеза и стабилност на каротеноидите, се поврзува со поддршка на имунолошкиот систем и со редуцираниот ризик од хронични заболувања; а збогатените производи со  $\beta$ -каротен (на пр., со брашно од тиква) се препознаваат како ефикасна стратегија во средини со дефицит на витамин А (Zahra et al., 2020). Комбинацијата – привлечна боја, ниски трошоци на преработка и силен нутритивен/функционален профил – ја позиционира тиквата како атрактивна матрица за иновативни прехранбени примени (Sharma et al., 2019; Pereira et al., 2020; Gavril et al., 2024).

Брашното од тиква се карактеризира со ниска водна активност, висок индекс на апсорпција и водорастворливост, изразен жолто-портокалов профил, висока содржина на каротеноиди и со диететски влакна и добра сварливост на протеините – својства погодни за функционална храна (Pereira et al., 2020; Shajan et al., 2024). Интеграцијата на тиква во рецепти со пченица влијае врз реолошките својства на тестото, како што се еластичноста и растегливоста. Брашното од тиква ги зголемува апсорпцијата на вода, времето за развој на тестото и стабилноста, додека го намалува индексот на толеранција на мешање (Minařovičová et al., 2018; Waryat et al., 2023). Високите концентрации на диететски влакна и на фитохемикалии во брашното од тиква позитивно влијаат врз бојата, вкусот и врз текстурата на финалните производи, правејќи ги попривлечни за потрошувачите. Дополнително, се подобрува способноста на лебот да ја задржи влагата, што претставува клучен аспект за неговата сензорна прифатливост (Davis et al., 2019). Овие ефекти, кои произлегуваат од присуството на диететски влакна и на биоактивни фитохемикалии, честопати придонесуваат за поповолни сензорни својства, како што се поинтензивна боја, подобрен вкус и попријатна текстура, со што се зголемува вкупната прифатливост на финалниот производ (Forstová et al., 2014).

Од аспект на безбедност, акриламидот е критичен термички контаминент, класифициран од IARC како можен канцероген за човекот уште од 1994 година (IARC 1994). Иако токсикокинетичките податоци кај луѓе се ограничени, бројни студии укажуваат на широка ткивна дистрибуција и на можни генотоксични, репродуктивни и невротоксични ефекти (Matoso et al., 2019). Акриламидот се формира преку реакции од Мејлардов (Maillard) вид, меѓу редуцирачки шеќери и аминокиселини (Zyzak et al.,

2003); аспарагинот е главен прекурсор во термички обработени житни производи (Taeumans et al., 2004; Hamlet et al., 2008; Sadd et al., 2008). Поради широката потрошувачка и примената на термичкиот процес на печење при неговото производство, лебот претставува значаен извор на акриламид во дневниот внес, при што неговото формирање е најизразено во кората, каде што температурите се повисоки во споредба со внатрешноста (Surdyk et al., 2004; Fink et al., 2006; Rosén et al., 2007). Врз нивото на акриламид влијаат квалитетот на брашното, количината/соодносот на прекурсори, видот и времетраењето на ферментација, термичкиот режим, pH, содржината/активноста на вода, ензимите и адитивите (Mollakhalili-Meybodi et al., 2021; Sarion et al., 2021). Стратегиите за минимизирање најчесто се класифицираат во неколку главни категории: елиминација или замена на прекурсорите, адаптирање на условите на технолошка обработка, како и отстранување или редукција на соединението во финалниот производ (López-Morena et al., 2023). Актуелната состојба на научните сознанија е сумирана во насоките на FoodDrinkEurope (2019), дополнети со резултати од претходни и понови научни истражувања (Forstová et al., 2014).

Растителни матрици богати со антиоксиданси, како тиквата, нудат двоен бенефит: (i) нутритивно подобрување и (ii) потенцијална редукција на акриламид преку намалување на слободниот аспарагин, зголемување на антиоксидативниот капацитет и преку модификација на водната активност/топлотниот пренос (López-Morena et al., 2023). Диететските влакната дополнително ја ограничуваат загубата на влага при печење (Rydberg et al., 2003), што корелира со пониско формирање акриламид (Gallani & Curtis et al., 2011; Dastmalchi et al., 2016). Продолжената ферментација се издвојува како ефикасна стратегија за намалување на формирањето акриламид, при што квасецот го метаболизира слободниот аспарагин (Benedito de Barber et al., 1989; Fredriksson et al., 2004). Дополнително, примената на кисело тесто и/или селектирани соеви со изразена активност на ензимот аспарагиназа го засилува редукцискиот ефект (Zhou et al., 2022), додека пробиотските култури можат да придонесат преку микробната синтеза (биосинтеза) на аспарагиназа и преку апсорпција на веќе формираните акриламид (Khorshidian et al., 2020).

Емпириските наоди за примена на тиквата во леб покажуваат: можеен пад на специфичниот волумен со инкорпорација на брашно/прав од тиква (Hoxha et al., 2023); зголемена цврстина и цвакливост, намалена кохезивност (Aukkanit & Sirichokworraki, 2016); пораст на црвената (*a*) и жолтата (*b*) компонента во бојата (Wahyono et al., 2020), како и пораст на вкупните феноли (Różyło et al., 2014) и  $\beta$ -каротенот (Pongjanta et al., 2006). Дополнително, Хванг и Парк (Hwang & Park, 2022) укажуваат на тоа дека брашното од тиква, преку промена на хемискиот состав и преку намалување на аспарагинот, може превентивно да делува врз формирањето акриламид. Оттука, комбинацијата на брашно од тиква со меко пченично брашно (SWF) е рационална за постигнување синергетски ефекти: нутритивно збогатување (каротеноиди, феноли, диететски влакна), функционална оптимизација (водни интеракции, реолошки својства, текстура) и намален ризик од акриламид преку формулациско-процесни интервенции.

Иако постојат студии за својствата на леб збогатен со тиква (Pongjanta et al., 2006; Różyło et al., 2014; Aukkanit & Sirichokworraki, 2016; Wahyono et al., 2020; Hoxha et al., 2023) и за редукција на акриламид (Fredriksson et al., 2004; Food Drink Europe, 2019; Khorshidian et al., 2020; Zhou et al., 2022; López-Morena et al., 2023), недостига интегративен пристап што истовремено ги зема предвид варирањата на индустриски релевантни нивоа/удели на тиква (0–20 %), контролира временски режим на ферментација, како алатка за редукција на акриламид, и ги поврзува технолошко-функционалните својства со клучните квалитативни и безбедносни индикатори во производството на пекарски производ. Ова истражување го пополнува јазот со валидирана рамка за формулациска и процесна оптимизација, директно пренослива во индустриската практика.

## 1. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

Со зголемената свесност кај потрошувачите за врската помеѓу здравјето и исхраната, истражувањето на алтернативни состојки во производството на леб добива сè поголем замав. Една од ваквите состојки е брашното од тиква, добиено од семките, кората и од внатрешниот дел на тиква (*Cucurbita maxima*) (Akintade et al., 2019). Во поширок контекст на одржлива прехранбена индустрија, треба да се има предвид дека индустријата за храна создава големи количини отпад или нуспроизводи, кои честопати недоволно се искористени и покрај нивната нутритивна и фитохемиска густина. Овие фракции имаат економски потенцијал и можат да се претворат во производи со поголема додадена вредност што повторно придонесуваат во синцирот на снабдување со храна преку валоризација на отпадот од храна (Liu et al., 2023), додека нивната трансформација во одржливи производи спречува загуба на вредни хранливи материи и биоактивни компоненти (Grassino et al., 2023). Токму тиквата, член на растителниот род *Cucurbita*, широко е одгледувана и консумирана поради својата нутритивна вредност, здравствените придобивки и поради економската корист. Таа е добар извор на нутриенти и на фитохемикалии ( $\beta$ -каротен, диететски влакна, витамини и минерали) (Yang et al., 2007; Que et al., 2008; Norshazila et al., 2014; Bemfeito et al., 2020), а во поново време привлекува внимание и поради можните антидијабетични, антиоксидативни, антиканцерогени, антиинфламаторни, антихипертензивни, кардиопротективни, антихиперлипидемични и антимикуробни ефекти (Raѓu et al., 2024). Поради овие својства, големи количества тиква се преработуваат во различни производи за потребите на пекарската, месната, млечната индустрија и на индустријата на пијалаци (Staichok et al., 2016; Pereira et al., 2020; Aziz et al., 2023), при што се создаваат значајни количини нусбиомаса – најчесто кора и семки – богати со нутриенти и со биоактивни компоненти што можат директно да се употребат како храна или да се инкорпорираат во други производи како функционални состојки (Hussain et al., 2022b). Типично, преработката генерира околу 72–76 % пулпа, 2,6–16 % кора и 3,1–4,4 % семки (Rico et al., 2020), при што кората се третира како примарен отпад бидејќи пулпата и семките се користат како суровини (на пр. масло од тиквини семки).

Овој преглед на литературата ги сублимира досегашните истражувања за синергетските ефекти од инкорпорирањето брашно од тиква во рецептурите за леб, со посебен фокус на неговите нутритивни придобивки и на потенцијалот за редукција на акриламид – штетно соединение што се формира при Мејлардовите реакции во пекарските производи. Интеграцијата на брашно од тиква претставува научно и технолошки оправдана стратегија со повеќекратни бенефити: нутритивна надградба, потенцијална редукција на акриламид како процесен контаминент, одржливост преку валоризација на нуссуровини и пазарна диференцијација преку т.н. функционалност „clean-label“. Лебот, како најшироко консумирана прехранбена матрица, претставува соодветна и технолошки стабилна платформа за нутритивни интервенции со значаен популациски ефект. Умереното вклучување брашно од тиква (обично 5–15 %) овозможува зачувување на клучните сензорни својства на производот, вклучувајќи структура, волумен и вкус, при истовремено зголемување на нутритивната густина. Овој ефект се должи на присуството на диететски влакна, каротеноиди ( $\beta$ -каротен) и фенолни соединенија, кои придонесуваат за засилена антиоксидативна активност, што ја прави оваа стратегија поповолна во споредба со употребата на монофункционални адитиви (Mottram et al., 2002; Zyzak et al., 2003).

Во контекст на безбедноста на храна, релевантна е улогата на брашното од тиква во потенцијалното намалување на акриламид. Акриламидот се создава претежно преку реакцијата меѓу редуцирачките шеќери и слободната аминокиселина аспарагин при повисоки температури, особено во кората на лебот; литературата предлага неколку комплементарни механизми преку кои брашното од тиква може да придонесе кон пониски нивоа на акриламид: (1) „разредување“ на клучните прекурсори кога дел од пченичното брашно се заменува со брашно од тиква со поинаков профил на шеќери и аминокиселини; (2) антиоксидативно дејство на каротеноидите и на фенолните соединенија, кои може да пресретнат реактивни интермедиери во патеките според Мејлард (Мејлардови реакции) и да го модифицираат текот на реакцијата; (3) промени во рН и во активноста на водата ( $a_w$ ) во тестото, што индиректно влијаат врз кинетиката на акриламид-формацијата; и (4) синергии со процесните параметри, како што се подолги времиња на ферментација, кои ја намалуваат достапноста на редуцирачки шеќери и ја оптимизираат развојната динамика на тестото (Mottram et al., 2002; Zyzak et al., 2003; Claus et al., 2008a).

Изборот на леб како целен производ има јасна научна и јавноздравствена оправданост: тој е базичен, секојдневен артикл, па дури и мали подобрувања во неговиот состав и во процесната безбедност транслациски се значајни на ниво на популација. Дополнително, брашното од тиква овозможува „иновативна двојна добивка“ – истовремено подобрување на нутритивноста и намалување на ризик-маркерот – што ретко се постигнува со класични адитиви и целосно е усогласливо со т.н. трендови за минимално процесирање (minimal-processing) и чиста декларација (clean-label). Од регулаторен аспект, стратегиите за намалувањето акриламид се усогласуваат со европската Регулатива (ЕУ) 2017/2158, која бара примена на мерки за редукција до

најниско разумно достижни нивоа и споредување со референтни вредности, како и со Водичот на Codex Alimentarius (CAC/RCP 67-2009) за намалување акриламид во храната (Codex Alimentarius, 2009; European Commission, 2017;). Доколку се применат валидирани контроли НАССР за суровината и за процесот (сушење, микробиолошки статус, евентуални контаминанти), безбедноста на консумација останува висока и транспарентна, а јасното етикетање ги информира потрошувачите за изворот и за функционалноста на состојката. Имајќи предвид дека акриламидот е класифициран како „веројатен канцероген кај човекот“ (IARC Group 2A), секое технолошко решение што одржливо ги намалува неговите нивоа во масовно конзумирани производи е од јавноздравствен интерес (IARC, 1994).

Понатаму, инкорпорирањето брашно од тиква има јасни одржливи димензии. Валоризацијата на кората и на семките – честопати третирани како нуспроизводи – во фино микромелени фракции богати со диететски влакна, пектини и со феноли ја намалува загубата на биомаса и го зголемува степенот на искористеност на тиквата, што е во согласност со принципите на кружна економија и на ориентацијата кон системи на храна со понизок еколошки отпечаток (Codex Alimentarius, 2009; European Commission, 2017). Во оваа рамка, земјоделските и прехранбените нуспроизводи претставуваат евтини ресурси и нови пазарни можности за прехранбената индустрија, а токму нуспроизводите од тиква (кора/семки) – идентификувани како богати извори на нутриенти и биоактивни компоненти (Kim et al., 2012; Saewan & George, 2020; Bai et al., 2020) – обезбедуваат конкретна основа за развој на функционални брашна и на леб/сродни пекарски производи богати со диететски влакна. Во пазарна смисла, лебовите збогатени со брашно од тиква овозможуваат јасно позиционирање како функционални производи („извор на диететски влакна“, „извор на провитамин А/β-каротен“, „растителни антиоксиданти“), при што додадената вредност може да оправда умерена ценовна надградба доколку се задржат сензорните атрибути и текстурниот интегритет. Практичната имплементација бара рационална оптимизација: стартни формулации со 5–10 % замена, прецизна корекција на водната хидратација (честопати +1–3 %), проширување на време на ферментација според силата на брашното и карактеристиките на брашното од тиква, како и внимателна контрола на температурниот профил на печење за да се балансира развојот на кората со минимална генерација на акриламид (Claus et al., 2008b). Ваквиот интегративен пристап – спој на рецептурна реформулација и оптимизација на технолошкиот процес – овозможува да се произведува леб со зголемена нутритивна вредност и со докажано понизок ризик-маркер, со усогласеност кон водичите на Codex и на европската регулатива и со потенцијал за чиста и убедлива комуникација кон потрошувачите (IARC, 1994; Mottram et al., 2002; Zyzak et al., 2003; Claus et al., 2008b; Codex Alimentarius, 2009; European Commission, 2017).

Врз основа на претходно прикажаните научни истражувања, релевантните регулативи и применетите стратегии за минимизација, а во согласност со целта на оваа докторска теза, беше избрана тиква *Cucurbita maxima* Plomo, традиционално одгледувана во Полошкиот регион, како природен извор на антиоксиданти за намалување на

содржината на акриламид во пекарски производи. Експерименталниот дел од истражувањето во рамките на овој докторат опфати детална анализа на физичко-хемиските, биохемиските и технолошко-функционалните својства на суровините (пченица и тиква), оптимизација на производствениот процес, како и спроведување сензорна анализа на добиените производи, а сè со цел развој на пекарски производ со редуцирана содржина на акриламид и со задоволителни сензорни карактеристики.

### 1.1 МЕКО ПЧЕНИЧНО БРАШНО (SWF)

Мекото пченично брашно (SWF), добиено од сорти на обична пченица, што таксономски припаѓа во семејството *Poaceae*, род *Triticum*, вид *Triticum aestivum L.*, има клучна улога во технологијата на производство на леб, пред сè, поради своите специфични својства, меѓу кои и пониската застапеност на глутен во споредба со тврдата пченица. Оваа особеност на SWF е погодна за производство на деликатни печива – како торти, печива и бисквити – каде што е посакувана нежна внатрешност на производот, но може успешно да се користи и во производството на леб, ако се применат соодветни технолошки контроли и/или се прават смеси со други брашна. Во технолошката литература најчесто се групира во класите *soft red winter* (SRW) и *soft white* (SW). Содржината на глутен во SWF обично се движи од 7 % до 12 % (табела бр.1), што значително е пониска од онаа кај тврдата пченица (12%–18 %), па затоа е соодветно за производи што не бараат силна структурна поддршка од глутенот, вклучително и лебови со хемиско квасење (без квасец) и други неферментирани печива (Shewry, 2009; Olakanmi et al., 2022).

Табела 1: Основен физичко-хемиски состав на мекo пченично брашно (на 100 g)

Параметар	Типична вредност / опсег	Белешка (основа)	Референција
Влага (вода)	≈ 12 g	податоци за бело пченично брашно	U.S. Wheat Associates. (2024). Wheat Marketing Center. (2024).
Протеини Глутен	≈ 10,3 g ≈ 7%-12 %	по 100 g	U.S. Wheat Associates. (2024).
Јаглехидрати (вкупно)	≈ 76,3 g	по 100 g	U.S. Wheat Associates. (2024). Wheat Marketing Center. (2024).
Шеќери	≈ 0,27 g	по 100 g	U.S. Wheat Associates. (2024).
Диететски vlakна	≈ 2,7 g	по 100 g	U.S. Wheat Associates. (2024). Wheat Marketing Center. (2024).
Масти (вкупно)	≈ 1,0 g	по 100 g	U.S. Wheat Associates. (2024).

Скроб (од сува материја)	≈ 70–75 %	главна компонента на брашното	Mato et al., (2024)
Пепел	≈ 0,45–0,54 %	за SW брашно, на 14 % влага-база	Wheat Marketing Center. (2024).

### 1.1.1 Текстура на зрното и однесување при мелење

Ознаките „меко“ и „тврдо“ се однесуваат на текстурата на ендоспермот. Помеките зрна полесно се кршат при валчесто мелење, давајќи пофино брашно со помала оштетеност на скробот и природно пониска апсорпција на вода од брашната од тврда пченица. Текстурата е во голема мера поврзана со протеините, односно со генетската основа на тврдината (анг. Ha - Hardness locus; пуриноиндолини), но за практичната технологија на производство на леб клучно е дека меките пченици даваат брашна кои се хидрираат и обезбедуваат глутен на поинаков начин од тврдите (Morris et al., 2001; Nucia et al., 2021). Во лебот, ова подразбира: (i) пониска оптимална апсорпција на вода, (ii) побрзо „попуштање“ на тестото при премешување и (iii) намалена способност за задржување гас доколку не се засили структурата преку процес или формулација (Shewry, 2009; U.S. Wheat Associates, 2024;).

### 1.1.2 Технологија на производство на леб: како се однесува SWF во тесто

При производството на леб, брашното, водата, квасецот и солта се претвораат во аерирана вискоеластична структура. Кај SWF, „развојот“ на глутенот е посензитивен на времето на мешање и на механичката енергија; премногу мешање брзо го ослабува тестото. Во однос на тесто од брашно од тврда пченица, кај SWF честопати се потребни:

- Малку пониска хидратација за да се постигне оптимална конзистенција;
- Пократко мешање за да се избегне разградување;
- Построга контрола на ферментацијата (време/температура) за да се зачува задржувањето на гасот.

Овие практични правила произлегуваат од интеракцијата меѓу количината/квалитетот на глутенот, „оштетувањето“ на скробот (пониско кај SWF) и распределбата на водата во тестото (Bakare et al., 2015; Shewry, 2009; Della Valle et al., 2022;). Типични начини на употреба на SWF во леб:

- Како брашно за мешавини во индустриски тост-лебови (анг. pan bread) за фино подесување на нежноста и бојата на мекиот/внатрешен дел (на пример, *soft white* честопати се меша со високопротеински брашна за омекнување на цвакањето и за осветлување на внатрешноста) (U.S. Wheat Associates, 2024).
- Како примарно брашно во лебови што не бараат висока способност за задржување гас (на пр., одредени лепињи/пити или збогатени тост-лебови), особено кога

шеќерот и мастите ја омекнуваат внатрешноста на лебот, а ферментацијата е умерена (Bakare et al., 2015).

- Во композитни лебови (на пр., со растителни или легуминозни брашна), каде што „послабиот“ глутен се компензира со подобрувачи и со контролирани процесни услови (Bakare et al., 2015).

### 1.1.3 Нутритивниот профил на мекото пченично брашно (SWF)

Нутритивниот профил на мекото пченично брашно (SWF) е суштински при разгледување на неговите примени во прехранбената технологија. Иако SWF примарно се состои од јаглехидрати (приближно 78 % по маса), тоа содржи и значајни количества протеини, диететски влакна и спектар на микронутриенти. Сепак, кај SWF честопати недостигаат доволни нивоа на одредени есенцијални аминокиселини, особено лизин, што може да ја ограничи неговата нутритивна вредност кога се користи самостојно во лебни производи (Sadek et al., 2018). Во практиката, овие дефицити најчесто се адресираат преку методи на фортификација, при што се подобрува нутритивниот профил со витални витамини и минерали, како железо, фолна киселина и витамини од групата B (Abdeen et al., 2014; Cardoso et al., 2019).

Од нутритивен аспект, микро- и макронутритивниот состав на SWF значајно е условен од процесот на мелење, кој може да предизвика супстанцијални загуби на нутриенти. На пример, рафинираното меко пченично брашно може да изгуби и до 80 % од витамините за време на мелењето, главно затоа што поголемиот дел од нутриентите се лоцирани во надворешните слоеви на пченичното зрно (Zimmerman, 2013). Овие загуби отвораат прашања за нутритивната адекватност на печивата произведени од рафинирано SWF. Како одговор на овие предизвици, фортификацијата на брашното се наметна како ефикасна стратегија за зголемување на содржината на витамини и минерали. Вообичаени пристапи вклучуваат додавање микронутриенти како цинк, витамин D и фолат за да се адресираат дефицитите во популациите кои во голема мера се потпираат на производи од пченица како главна храна (Abdeen et al., 2014).

Поновите истражувања покажуваат дека воведувањето алтернативни брашна или фортификациски агенси може значително да ги подобри нутритивните и сензорните својства на лебот произведен со SWF. На пример, фортификацијата на SWF со брашна од мешунки или со други состојки богати со нутриенти може да го зголеми нивото на есенцијални аминокиселини, да го зголеми протеинскиот удел и да додаде диететски влакна, со што се добиваат печива кои не се само органолептички прифатливи, туку и нутритивно супериорни (Igbabul et al., 2018; Hussain et al., 2023). Употребата на композитни брашна, кои го комбинираат SWF со други житни култури или различни брашна, добива сè поголем замав при производството на здравствено-ориентирани алтернативи на леб (Ramos, 2024).

## 1.2 ТИКВА (*Cucurbita*): ТАКСОНОМИЈА, ЕКОНОМСКА И НУТРИТИВНА ВАЖНОСТ

Тиквата широко е култивирана и економски значајна култура што припаѓа на родот *Cucurbita* во семејството *Cucurbitaceae*. Ова семејство опфаќа богат спектар од тиквовидни растенија (тикви, дињи, краставици итн.), што ја илустрира агрономската и кулинарска разновидност на групата. Родот *Cucurbita* вклучува повеќе култивирани видови, меѓу кои *C. pepo*, *C. maxima* и *C. moschata* – главни видови во исхраната, при кулинарски примени и за украсна употреба (Ge et al., 2025; Muthoni & Shimelis, 2025).

Тиквите имаат значителна економска вредност, со широка употреба во свежа состојба, како полупроизвод (пире, каша, конзерви) и производи со додадена вредност (масло од семки, прашоци/брашна од пулпа, функционални состојки). Нутритивно, пулпата е богата со витамини А, С и Е, диететски влакна и фитохемикалии со антиоксидативна активност (Табела 2), а интензивните портокалови пигменти (доминантно поради присутниот  $\beta$ -каротен) придонесуваат со провитаминската активност (провитамин А) за потенцијални придобивки за видот и за имуниот систем (Ge et al., 2025). Овие квалитети ја позиционираат тиквата како погодна суровина за развој на здравствено-ориентирани производи и за примена во програми за подобрување на исхраната. Семките, пак, се висококалорична и нутритивно густа фракција (масло богато со незаситени масни киселини, токофероли и фитостероли), со растечка комерцијална побарувачка (Ge et al., 2025).

Табела 2: Основен физичко-хемиски состав на *Cucurbita maxima*

Параметар	Типична вредност / опсег	Матрица	Состојба	Референција
Влага	92,63 ± 2,19 %	Пулпа	Свежа материја	Márquez Cardozo et al., (2021)
pH	5,92 ± 0,29	Пулпа	Свежа материја	Márquez Cardozo et al., (2021)
Вкупни растворливи цврсти (°Brix)	3,76 ± 0,73 °Brix	Пулпа	Свежа материја	Márquez Cardozo et al., (2021)
Титрирачка киселост	0,038 ± 0,003 % (како лимонска к-на)	Пулпа	Свежа материја	Márquez Cardozo et al., (2021)
Водна активност ( $a_w$ )	0,96 ± 0,004	Пулпа	Свежа материја	Márquez Cardozo et al., (2021)
Вкупни каротеноиди (како $\beta$ -каротен екв.)	≈411 mg/100 g СМ (пулпа); во кората повисоки	Пулпа/Кора	СМ	Márquez Cardozo et al., (2021)
Масло во семки	~30–50 %	Семки	СМ	Polyzos et al., (2024);

				Montesano et al., (2018)
Протеин во семки	~25–35 %	Семки	CM	Polyzos et al., (2024) Prommaban et al., (2021)
Профил на масни киселини	Олеинска ~25–35 %, Линолеинска ~45–55 %, Палмитинска ~13–18 %, Стеаринска ~6–10 %	Масло од семки	—	Rezigi et al., (2018); Zhang et al., (2024)
Токофероли (вкупно)	~50–75 mg/100 g масло (доминира $\gamma$ -ТОХ)	Масло од семки	—	Zhang et al., (2024); Polyzos et al., (2024)
Пепел	5–10 % (по сушење; зависи од методот)	Сушена пулпа	CM	Grassino et al., (2024)
Вкупни диететски влакна	~9–15 % (зависи од сушење)	Сушена пулпа	CM	Grassino et al., (2024)
Протеини	~15–22 % (кај сушена пулпа, метод-зависно)	Сушена пулпа	CM	Grassino et al., (2024)

CM - (сува материја)

Како култура тиквата добро се адаптира на распон од умерени до тропски клими. Релативната робустност, ефикасното користење на ресурси и способноста за успешно интегрирање во плодоредните системи ја прават погодна за одржливи земјоделски системи (Muthoni & Shimelis, 2025). Во рамките на циркуларната економија, нуспроизводите (кора, семки, остатоци од обработка) можат да се валоризираат во храна, сточна храна или во функционални состојки – намалувајќи го отпадот и зголемувајќи ја економската исплатливост. Ова, придружено со локални/регионални преработувачки синџири, отвора нови пазари за земјоделците и ја подобрува нутритивната достапност во заедниците (Ge et al., 2025).

### 1.2.1 Употреба на брашно од тиква во производство на леб: нутритивни, технолошки-функционални и одржливи аспекти

Употребата на брашно од тиква (PF) во лебопроизводството сè повеќе привлекува внимание како иновативен пристап за засилување на нутритивниот профил, аромата/вкусот и за одржливоста на печивата. Брашното најчесто се добива од видовите *Cucurbita pepo*, *C. maxima* и *C. moschata* и претставува концентрат на биоактивни соединенија (каротеноиди, фенолни киселини) и диететски влакна, што го прави вредна функционална состојка во различни типови леб (Kulczyński & Gramza-Michałowska, 2019; Wahyono et al., 2020; Aziz et al., 2023).

Брашното од тиква ги содржи витамините А, С и Е, како и есенцијални минерали (на пр., калиум, магнезиум). Каротеноидите, особено  $\beta$ -каротенот, придонесуваат за изразена антиоксидативна активност, поврзана со потенцијално намалување на оксидативниот стрес и поддршка на видот и имунитетот (Kulczyński & Gramza-Michałowska, 2019). Диететските влакна во PF поддржуваат нормално функционирање на дигестивниот систем, регулирање на транзитот и можен ефект на заситување, што е релевантно при развој на печива со функционална намена (Aziz et al., 2023). Повеќе студии покажуваат дека вклучувањето на PF ја зголемува антиоксидативната активност на готовите лебови, потенцијално додавајќи здравствени придобивки над класичните рецептури (Wahyono et al., 2020).

Вклучувањето на брашно од тиква се вклопува во одржливи стратегии: тиквата широко е достапна и честопати недоволно искористена и потценета култура; употребата на пулпа/нуспроизводи ја намалува прехранбената загуба и создава додадена вредност за производителите. Во споредба со некои житарки, тиквата може да бара помало количество вода во одредени агроекосистеми, а локалната преработка и производство на композити со PF отвораат регионални пазари и подобра нутритивна достапност (Das et al., 2015).

Интеграцијата на брашно од тиква во лебовите создава мултидимензионална придобивка: (i) повисока нутритивна вредност (каротеноиди, витамини, влакна), (ii) подобрени сензорни карактеристики (боја, вкус, сочност) и (iii) одржливост (валоризација на култури/нуспроизводи). Со прецизна технолошка оптимизација (хидратација, мешање, ферментација и печење), пекарите можат да ги задоволат барањата за поздрави, иновативни производи и воедно да дадат придонес за одржливи системи за храна (анг. food systems). Идните насоки треба да вклучат усвоени и еколошко подобни методи на сушење/мелење и модели на формулација што ќе овозможат повисоки нивоа на вклучување на тиквата во рецептурите, без компромис по волуменот, структурата и други квалитативни карактеристики на производот (Das et al., 2015; Kulczyński & Gramza-Michałowska, 2019; Wahyono et al., 2020; Aziz et al., 2023).

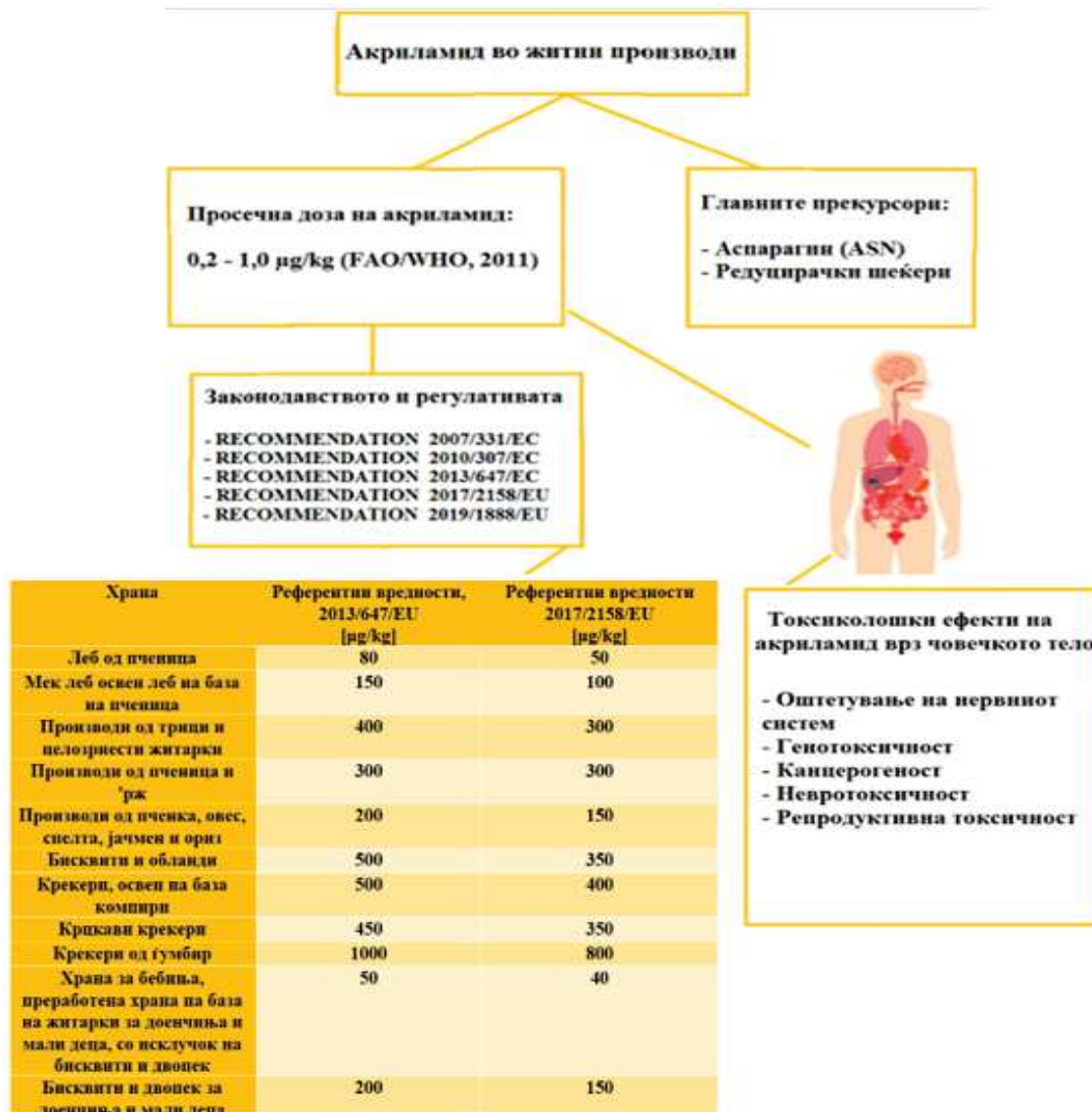
### 1.3 АКРИЛАМИД ВО ЖИТНИ ПРОИЗВОДИ

Безбедноста на храната претставува бескомпромисна цел во областа на науката за храна. Бидејќи се очекува прехранбените производи да придонесат за здравјето на човекот, потребно е да се избегнува присуство на штетни материи како што се остатоци од пестициди, микотоксини, тешки метали и загадувачи од околината. Покрај загадувачите што се наоѓаат во суровините, за време на преработката на храната може се создадат и дополнителни штетни соединенија, на пр. нитрозамини, фуран и акриламид. Вообичаено, најголем дел од загадувачите што се наоѓаат во суровините може да се отстранат пред почетокот на преработката, на пример преку внимателен избор на суровини.

Меѓутоа, доколку загадувачот се создава за време на преработката на храната, тогаш контролирањето многу е потешко. Од 2002 година, прехранбениот загадувач – акриламид привлекува глобално внимание (Stockmann et al., 2019). До таа година, немало достапни податоци дека значајна количина на акриламид може да биде присутна во храната. Меѓутоа, во студијата на Тареке и соработниците (Tareke et al., 2000) беше воспоставена поврзаноста помеѓу термички обработената храна и присуството на акриламид. Две години подоцна, истражувачката група на Тареке и соработниците (Tareke et al., 2002) потврдила дека акриламидот се наоѓа во готвената храна, па оттаму може да се заклучи дека акриламидот блиско е поврзан со човековата исхрана.

Голем број истражувања покажале дека акриламидот се создава при термичка обработка на храна богата со јаглехидрати, како што се житариците и компирот (Mottram et al., 2002; Stadler et al., 2002), при што редуцирачките шеќери (најчесто гликоза и фруктоза) реагираат со слободниот аспарагин – аминокиселина, во рамките на Мејлардовата реакција (Delatour et al., 2004). Додека редуцирачките шеќери се ограничувачки прекурсор во термички третирани производи од компир (Amrein et al., 2004), кај преработените житни производи, пак, таа улога ја има слободниот аспарагин (Claus et al., 2006; Surdyk et al., 2004; Curtis et al., 2010).

Во својот објавен труд Рафан и Халфорд (Raffan & Halford 2019), ја опишале историјата на следење на акриламидот во неколку групи на храна. Тие известиле дека по започнувањето на имплементацијата на стратегиите за намалување на акриламидот во 2002 година, содржината на акриламид успешно била намалена кај прехранбените производи. Сепак, во текот на следните години овој ефект се намалил и се појавиле флукуирачки и повисоки нивоа на акриламид. Како последица на тоа, во 2017 година од Европската комисија е објавена регулатива која има за цел регулирање и ограничување на нивото на акриламид во прехранбените производи, слика бр. 1 (Commission Regulation (EU) 2013/647 EC, 2013; Commission Regulation (EU) 2017/2158/EC, 2017; Sarion et al., 2021).



Слика бр. 1: Преглед на акриламидот, неговата токсичност и законските прописи во пекарската индустрија (приспособено од Sarion et al., 2021)

### 1.3.1 Структура и својства на акриламидот

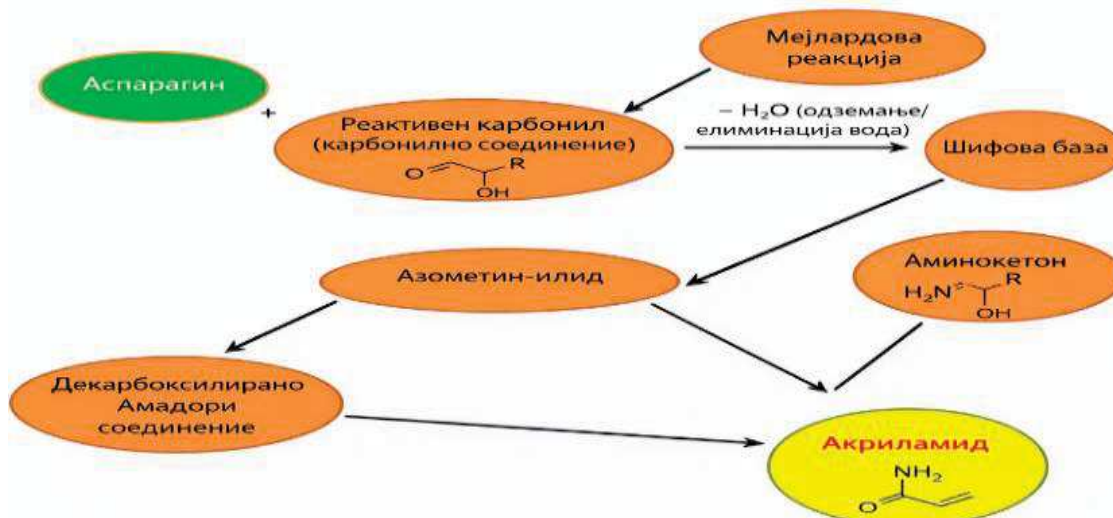
Акриламидот ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) претставува органско соединение со ниска молекулска маса, составено од јаглерод (50,69%), водород (7,09%), азот (19,71%) и кислород (22,51%), со молекулска маса од 71,08 g/mol. Станува збор за поларна супстанција која лесно се раствора во вода, метанол и етанол. Синтезата на акриламидот започнала на индустриско ниво уште во 1950 година. Полиакриламидот, како дериват,

наоѓа широка примена во различни индустрии, како и во земјоделството (Tekkeli et al., 2012).

Пред 2002 година преовладувало мислењето дека акриламидот не се јавува природно, туку исклучиво како резултат на хемиска синтеза. Сепак, во април 2002 година, Шведската државна агенција за храна, заедно со истражувачи од Стокхолмскиот универзитет, објавиле неочекувани резултати за значително присуство на акриламид во храната – во количини од 30 µg/kg до 2300 µg/kg. Највисоки концентрации биле измерени во производи од компир и од житарки кои биле подложени на висока термичка обработка (SNFA, 2013). Истата година, акриламидот бил вклучен во списокот на токсични материи што се присутни во храната. Врз основа на достапните истражувања за нивоата на акриламид и за неговиот внес преку храна, Светската здравствена организација проценила дека просечниот дневен внес кај возрасни изнесува 0,3–2,0 µg/kg телесна маса (WHO, 2005), додека кај децата, поради нивната пониска телесна маса, овие вредности можат да бидат значително повисоки (Dybing et al., 2005).

Формирањето акриламид во загреаната храна се случува преку реакција помеѓу аминокрупата на аминокиселината аспарагин и карбонилната група на шеќер. Како резултат на оваа реакција се создава меѓупроизвод – т.н. Шифова база, која потоа може директно да се претвори во акриламид или преку низа дополнителни реакции што водат до негово формирање, слика бр. 2 (Michalak et al., 2020; Maan et al., 2020).

Температурата претставува клучен фактор што влијае врз концентрацијата на акриламид во храната – особено кога таа надминува 120 °C (Torres et al., 2019). Највисоки нивоа на акриламид се детектирани во храна што била загревана на температури над 160–180 °C (Maan et al., 2020; Michalak et al., 2017; Martinez et al., 2019). Од друга страна, долготрајно загревање храна на температури над 200 °C може да предизвика разградување на веќе формираните акриламид (Capuano & Fogliano, 2011; Stadler & Studer, 2016).



Слика бр. 2: Формирање и структура на акриламид

(приспособено од Michalak et al., 2020)

Бројни истражувања покажале дека концентрацијата на акриламид во храната може значително да варира – просечно е под 100 µg/kg, додека во некои екстремни случаи се регистрираат вредности и под 10 µg/kg кај производи со висок протеински состав. Од друга страна, кај производи со висока содржина на шеќери, акриламидот може да достигне вредности од 100 до дури 4000 µg/kg. Највисоки концентрации на ова соединение се утврдени во храна што е подложена на интензивна термичка обработка, како што се пржење и печење компири, печење какао и кафе, производство на леб и на пекарски производи, како и при термичка обработка на житарици (Keramat et al., 2010; Capuano & Fogliano, 2011; Krishnakumar & Visvanathan, 2014; Michalak et al., 2016; Martinez et al., 2019; Michalak et al., 2019) (табела 3).

Табела 3: Содржина на акриламид во различни прехранбени производи (µg/kg), врз основа на податоците од EFSA (2011, 2015), Michalak et al. (2013, 2016) и JECFA (2020)

Прехранбен производ	µg/kg	Референција
<b>Храна за бебиња</b>		
Житарки (готови за јадење)	13	(Michalak et al., 2013)
Инстант житни култури	345	(Michalak et al., 2013)
Бонбони-барови	54	(Michalak et al., 2013)
Бисквити	87	(Michalak et al., 2016)
Бebешка храна во тегла	32–47	(EFSA, 2011)
Готов оброк на база на житарки	13	(EFSA, 2015)
Каша	29	(EFSA, 2015)
Почетна формула за доенчиња	14	(EFSA, 2015)
Овошно пире	22	(EFSA, 2015)
Сок	12	(EFSA, 2015)
<b>Леб</b>		
Крцкав леб (crispbread)	443	(Michalak et al., 2016)
Мек леб од пченица	38	(EFSA, 2015)
Друг мек леб	57	(EFSA, 2015)
<b>Производи од житни култури</b>		
Производи на база на пченица и 'рж	170	(EFSA, 2015)
Производи од трици и житарки од цели зрна	211	(EFSA, 2015)
Крекери	231	(EFSA, 2015)
Бисквити и наполитанки	201	(EFSA, 2015)
Крекери со ѓумбир	407	(EFSA, 2015)
Тестенини	13	(EFSA, 2015)

Пиво	14	(EFSA, 2015)
<b>Какао</b>		
Какао (100 % какао во прав)	347	
Какао во прав за пијалак (со додадени шеќери, 20 % какао)	248	(Michalak et al., 2016)
<b>Кафе и замени за кафе (суви)</b>		
Печено кафе (суво)	249	(EFSA, 2015)
Инстант кафе (суво)	710	(EFSA, 2015)
Замени на кафе (суво), на база на житарки	510	(EFSA, 2015)
Замени на кафе (суво), на база на цикорија	2942	(EFSA, 2015)
<b>Производи од компири</b>		
Помфрит	326–328	(EFSA, 2011)
Парчиња од компири	689–693	(EFSA, 2011)
Длабоко пржени производи од домашно зготвени компири	234–241	(EFSA, 2011)
Домашни производи од компир печени во рерна	317	(EFSA, 2011)
<b>Други производи</b>		
Печени ореви и семиња	93	(EFSA, 2015)
Црни маслинки во саламура	454	(EFSA, 2015)
Суви сливи и урми	89	(EFSA, 2015)
Пиперка во прав	379	(EFSA, 2015)
Риба и морска храна	25	(JECFA, 2020)
Млеко и млечни производи	6	(JECFA, 2020)
Пица	33	(JECFA, 2020)
Зелен чај печен	306	(JECFA, 2020)
Шеќери и мед	24	(JECFA, 2020)
Зеленчук	17	(JECFA, 2020)
Парчиња од зеленчук	1846	(EFSA, 2015)
Овошје сушено и преработено	131	(JECFA, 2020)
Сушена храна	121	(JECFA, 2020)

## 1.4 ФАКТОРИ ШТО ВЛИЈААТ ВРЗ ФОРМИРАЊЕТО АКРИЛАМИД ВО ПЕКАРСКИТЕ ПРОИЗВОДИ

Акриламидот е органско соединение кое се создава како нуспроизвод за време на термичката обработка на прехранбените производи, особено кај оние богати со јаглехидрати и со низок процент на вода, како пекарските производи. Тој е класифициран како веројатен канцероген за луѓето од Меѓународната агенција за истражување рак (IARC, 1994), што ја прави особено важна потребата од разбирање на факторите што влијаат врз неговото формирање.

### 1.4.1 Температура и време на печење

Меѓу главните фактори кои го определуваат формирањето акриламид во пекарските производи се температурата и времетраењето на термичката обработка. Акриламидот настанува како резултат на Мејлардовата реакција – неензимска реакција меѓу редуцирачките шеќери (како гликоза и фруктоза) и слободната аминокиселина аспарагин, што се активира при температури над 120°C (Mottram et al., 2002; Zyzak et al., 2003).

Истражувањата откриваат дека зголемувањето на температурата над 160°C предизвикува експоненцијален раст на нивото на акриламид. Клаус и соработниците (Claus et al., 2008b) утврдиле дека во белиот леб концентрацијата значително се зголемува кога температурата достигнува 180°C, особено во кората – делот со највисока температура и со најниска водна активност ( $a_w$ ). Според Амреин и соработниците (Amrein et al., 2007), кората на лебот може да содржи од 5 до 10 пати повеќе акриламид од внатрешноста, поради директното изложување на високи температури и на сув воздух.

Покрај температурата, и времетраењето на печењето има кумулативен ефект. Тареке и соработниците (Tareke et al., 2002) укажуваат на тоа дека само дополнителни 5 минути печење на 180°C можат да предизвикаат зголемување на акриламидот за 20–30 %. Во нивната студија е наведено дека примероците печени 30 минути содржеле во просек 150 µg/kg, додека оние третирани 45 минути достигнале над 400 µg/kg. И Ридберг и соработниците (Rydberg et al., 2003) известуваат за слични резултати, но и предупредуваат дека прекумерната термичка обработка – иако може да ги подобри сензорските својства како крцкавост и боја – значително ја зголемува токсиколошката опасност поврзана со акриламидот.

Бидерман-Брем и соработниците (Biedermann-Brem et al., 2003) дополнуваат дека и видот на печка има свое влијание. Конвекциските печки создаваат посува и потопла средина, што доведува до повисока температура на површината на производот, па со тоа – до поголемо формирање акриламид. Спротивно на тоа, печење со пареа (како кај некои индустриски лебови) помага да се одржи влажноста на површината и ја забавува брзината на Мејлардовата реакцијата.

Во друго истражување, Гокмен и Шењува (Gökmen & Şenyuva, 2006) ја анализираат врската меѓу потемнувањето на производот и нивото на акриламид, и

заклучуваат дека темната кафеава боја претставува добар индикатор за интензивна реакција од Мејлардов вид, а со тоа и за можна зголемена содржина на акриламид. При печење брашно на 220 °C, тие измериле концентрации над 500 µg/kg по 30 минути.

Конечно, истражувањето на Месијас и соработниците (Mesias et al., 2014) открива дека дури и начинот на распределба на топлината за време на печењето – на пример, преку ротирање или преку циркулација на воздухот – влијае врз рамномерноста на распределбата на акриламидот. Зоните кои побрзо достигнуваат високи температури, како рабовите на производот, обично покажуваат значително поголема концентрација.

#### 1.4.2 Времетраење на ферментација

Бидејќи е препознаен како потенцијален канцероген за човекот, присуството на акриламид во храната предизвикува значајна загриженост, особено кога се разгледува неговото присуство во пекарските производи, а посебно во лебот. Акриламидот се создава при печењето, односно за време на термичката обработка, најчесто преку Мејлардовата реакцијата, која вклучува реакција меѓу редуцирачките шеќери и аминокиселината аспарагин (Keramat et al., 2010). Важно е да се нагласи дека нивото на акриламид во лебот го одредуваат повеќе фактори, а еден од критичните е времетраењето на ферментацијата.

За време на ферментацијата, квасецот и млечнокиселите бактерии (LAB) метаболизираат супстрати и го менуваат составот на тестото, при што нивните активности можат да ги намалат нивоата на слободен аспарагин и со тоа да ја редуцираат количината на достапни прекурсори за формирање акриламид (Fredriksson et al., 2004). Подолгото времетраење на ферментацијата, како клучен фактор во производството на леб, овозможува поефикасна потрошувачка на аспарагин од активните микроорганизми и интензивирана ензимска активност која може да го разгради аспарагинот до нереактивни компоненти, што резултира со пониска содржина на акриламид во финалниот производ (Hwang & Park, 2022). Во таа насока, Фредриксон и соработниците (Fredriksson et al., 2004) покажале дека продолжената ферментација не само што ги намалува нивоата на слободен аспарагин, туку и директно е поврзана со пониска содржина на акриламид во финалниот леб, што потврдува дека времето на ферментација има критична улога во модулирањето и во ублажувањето на формирањето акриламид (Fredriksson et al., 2004).

Условите на ферментацијата, вклучувајќи температура, рН и употреба на специфични бактериски соеви, дополнително можат да ја зголемат ефективноста на процесот. Оптималните услови го подобруваат вкупниот квалитет на тестото и можат да придонесат за позитивни промени во текстурата и во сензорните атрибути на лебот, истовремено намалувајќи го формирањето акриламид. На пример, зголемената киселост на тестото поради продукцијата на млечна киселина за време на ферментацијата може да ја намали достапноста на слободните аминокиселини, со што се ограничува формирањето акриламид за време на печењето (Keramat et al., 2010).

Иако времетраењето на ферментацијата е важен фактор, треба да се разгледаат и други фактори – како времето и температурата на печење и влажноста – кои значително влијаат врз нивото на акриламид. Високите температури на печење, обично над 120 °C, ја поттикнуваат Мејлардовата реакција и со тоа го зголемуваат формирањето акриламид (Rydberg et al., 2003). Затоа, меѓузависноста меѓу времетраењето на ферментацијата и овие променливи критички мора да се разгледа за оптимизирање на процесот на лебопроизводство со цел минимизирање на акриламидот.

И присуството на различни видови брашна и адитиви може да влијае врз нивото на акриламид. На пример, целозрнестите брашна обично имаат поголеми количества хранливи материи и ензими кои можат да ја поттикнат ферментацијата, со што потенцијално се намалува формирањето акриламид. Изборот на шеќери и други додатоци во процесот на производство на леб може да делува синергистички или антагонистички со времетраењето на ферментацијата, при што се менуваат конечните содржини на акриламид (Keramat et al., 2010).

Идните стратегии за производство на леб треба да ги интегрираат овие заклучоци со цел развој на поздрави пекарски производи со намалена содржина на акриламид, при што се обезбедува двоен бенефит: подобрена безбедност за потрошувачите и подобрени сензорни карактеристики (Rydberg et al., 2003; Fredriksson et al., 2004; Keramat et al., 2010; Hwang & Park, 2022).

### 1.4.3 Состав на суровините

Хемискиот состав на основните суровини, особено нивната содржина на редуцирачки шеќери и слободен аспарагин, игра суштинска улога во процесот на формирање акриламид во пекарските производи. Главните прекурсори – редуцирачките шеќери (гликоза и фруктоза) и аминокиселината аспарагин – учествуваат во термичка реакција позната како Мејлардова реакција (според хемичарот Louis Camille Maillard), при што се создава акриламид (Mottram et al., 2002; Stadler & Studer, 2016; Hee et al., 2024).

Бидерман-Брем и соработниците (Biedermann-Brem et al., 2003) истакнуваат дека сортата на пченицата има директно влијание врз ризикот од формирање акриламид – оние сорти кои содржат повисоки концентрации на слободен аспарагин имаат поголем потенцијал за акумулација на акриламид во финалниот производ. Во нивното истражување е утврдено дека количината на аспарагин може да варира и до петкратно меѓу различни видови пченица.

Халфорд и соработниците (Halford et al., 2012) понатаму утврдиле дека целозрнестите нерафинирани брашна содржат повисоки количини аспарагин, бидејќи триците, кои не се отстранети при мелењето, особено се богати со оваа аминокиселина. Нивната анализа покажала дека целозрнестото брашно содржи 40–60 % повеќе аспарагин во споредба со белото рафинирано брашно. И видот на житото има значајно влијание. Клаус и соработниците (Claus et al., 2008a) и Куртис и соработниците (Curtis et al., 2010) забележале дека 'ржаното брашно има повисоки концентрации и на аспарагин

и на редуцирачки шеќери во однос на пченичното, што резултира со зголемени нивоа на акриламид по термичка обработка. Под идентични услови на печење, 'ржаните крекери покажале од два до трипати повисоки концентрации на акриламид отколку пченичните.

Гокмен и Шенјува (Gökmen и Şenyuva, 2006) посочуваат дека и природно присутните шеќери во брашното, како и додадените шеќери (во форма на гликоза, мед, сирупи), значително влијаат врз степенот на формирање акриламид. Поголема концентрација на шеќери води до поинтензивна Мејлардова реакција и до зголемено создавање акриламид.

Жанг и соработниците (Zhang et al., 2009) потврдиле дека додавањето 5 % гликоза во рецепт за бисквити го зголемува нивото на акриламид од 150 µg/kg на над 500 µg/kg, што ја потврдува дозозависната природа на шеќерите во овој процес.

Куртис и соработниците (Curtis et al., 2010) дополнуваат дека агрономските услови – како употребата на ѓубрива и начинот на одгледување – имаат значително влијание врз хемискиот состав на зрната, а со тоа и врз ризикот од формирање акриламид. Високи концентрации на азот при ѓубрење, на пример, можат да резултираат со зголемени нивоа на слободен аспарагин во зрелото жито.

Покрај тоа, процентот на протеини во брашното е уште еден релевантен фактор, бидејќи брашната со поголема содржина на протеини обично содржат и повисоки концентрации на аминокиселини, меѓу кои и аспарагин. Ова особено е значајно при изборот на брашна со висока пекарска вредност кои се користат во индустриското производство (Curtis et al., 2009).

#### 1.4.4 рН-вредност

рН-вредноста на тестото има клучно влијание врз формирањето акриламид, бидејќи го одредува интензитетот на Мејлардовата реакцијата. Оваа реакција, која создава карактеристични боја и вкус при печење, е најактивна при неутрална до благо алкална средина (рН ≈ 6,5–8). При пониски рН-вредности, односно покисела средина, реакцијата се забавува, што резултира со значително помало количество на акриламид (Rydberg et al., 2003).

Зизак и соработниците (Zyzak et al., 2003) утврдиле дека намалувањето на рН преку додавање органски киселини – како оцетна, млечна или лимонска – може да ја намали концентрацијата на акриламид и до 60 %. Во нивното истражување, додавањето на 0,5 % оцетна киселина ја намалило рН-вредноста од 6,8 на 5,2, што довело до значајно намалување на акриламидот во крајниот производ.

Гокмен и Шенјува (Gökmen & Şenyuva, 2006) истакнуваат дека оптималниот опсег за намалување акриламид е рН помеѓу 4,5 и 5,5, бидејќи Мејлардовата реакција се инхибира без да се нарушат сензорните својства. Истражувањата покажуваат дека при рН 4,5, количината на акриламид може да се намали за повеќе од 70 %, особено кога тестото содржи редуцирачки шеќери како гликоза или фруктоза.

Ферментацијата со млечнокисели бактерии (на пр. *Lactobacillus plantarum*) има двоен ефект – ја намалува рН-вредноста и истовремено ја редуцира концентрацијата на

шеќери и аспарагин, со што дополнително се намалува формирањето акриламид (Rydberg et al., 2003). Во нивните тестови, 24-часовната ферментација резултирала со намалување на акриламидот за над 50 %.

Клаус и соработниците (Claus et al., 2008a) нагласуваат дека употребата на ферментирани состојки како јогурт, сурутка или кисело млеко во тестото го намалува почетното рН и го ограничува формирањето акриламид. Овој пристап особено е релевантен кај интегрални производи богати со прекурсорни соединенија.

Сепак, премногу кисела средина може да има негативни ефекти врз органолептичките својства на производот. Жанг и соработниците (Zhang et al., 2009) предупредуваат дека премногу ниска рН-вредност ( $<4,0$ ) може да доведе до несакани промени во вкусот, структурата и во обемот на лебот, што ја ограничува практичната примена на прекумерно кисели рецептури.

#### 1.4.5 Влажност и активност на водата ( $a_w$ )

Активноста на водата ( $a_w$ ) претставува индикатор за достапноста на слободната вода во храната и е еден од најважните технолошки параметри што влијаат врз Мејлардовата реакцијата, односно врз создавањето акриламид. Највисоки нивоа на акриламид се јавуваат при средна до ниска активност на вода ( $a_w \approx 0,8 - 0,4$ ), кога реакцијата се одвива најефикасно (Michalak et al., 2020).

Според Мотрам и соработниците (Mottram et al., 2002), сувите пекарски производи – како крекери, тостови и бисквити – со вредност на  $a_w$  под 0,5, покажуваат концентрации на акриламид над 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , додека свежите лебови со поголема влажност ( $a_w > 0,9$ ) имаат значително пониски нивоа, под 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Авторите го објаснуваат овој феномен со фактот дека при пониска влажност се концентрираат редуцирачките шеќери и аспарагинот, а истовремено се зголемува ефикасноста на топлотниот трансфер, што ја засилува Мејлардовата реакција.

Сарион и соработниците (Sarion et al., 2021) потврдуваат дека времетраењето на печење и степенот на дехидратација директно се поврзани со количината на акриламид во готовите производи. Производите кои подлежат на подолг термички третман за постигнување крцкава текстура (на пример, двојно печени бисквити, крекери и тостови) покажуваат значително повисоки концентрации – дури и до 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Ова се должи на тоа што подолгото сушење ја намалува влажноста на површината и ја концентрира реакциската смеса, што овозможува интензивно создавање акриламид во финалните минути од печењето.

Клаус и соработниците (Claus et al., 2008a) укажуваат на тоа дека соодветната контрола на финалната влажност и управувањето со термичкиот профил при печење може значително да го намали ризикот од прекумерно сушење и од акумулација на акриламид. Тие препорачуваат употреба на техники како печење со пареа, намалување на температурата во завршната фаза на печење или воведување кратка фаза на стабилизација, со што се зачувува одредено ниво на влага на површината на производот, без да се компромитира текстурата. Овие пристапи можат да се комбинираат со други

техники, како контрола на рН или употреба на суровини со пониска содржина на аспарагин.

Дополнително, Гертц и Клостерман (Gertz & Klostermann, 2002) откриле дека релативната влажност на воздухот во печката има критично влијание врз количината на акриламид што се создава. Во нивните експерименти, печење во атмосфера со 80 % релативна влажност резултирало со околу 40 % пониско ниво на акриламид во споредба со печење во услови на сува топлина. Повисоката влажност го забавува процесот на дехидратација, што ја одложува фазата на интензивна Мејлардова реакција и, со тоа, ја намалува вкупната акумулација на акриламид.

Сепак, како што истакнуваат Жанг и соработниците (Zhang et al., 2009), зголемувањето на влажноста мора да се применува внимателно, бидејќи прекумерната водена пара може негативно да влијае врз сензорните и врз физичките својства на производот. Прекумерната влага во финалните фази на печење може да предизвика премногу мека кора, недоволно крцкава структура или намален рок на траење поради зголемена микробиолошка нестабилност. Затоа, оптималниот баланс меѓу влажноста, температурата и времетраењето на печење се суштински за производство на безбедни и квалитетни пекарски производи со ниска содржина на акриламид.

## 1.5 ПРАВНА РЕГУЛАТИВА ЗА ПРИСУСТВОТО НА АКРИЛАМИД ВО ХРАНА

Количината на акриламид која потрошувачот ја внесува преку исхраната значително варира во зависност од културните навики и од видот на прехранбените производи. Според Негица и соработниците (Negoiță et al., 2015), пекарските производи придонесуваат со приближно 10–30 % од вкупниот внес на акриламид, додека колачите и другите кондиторски производи учествуваат со околу 10–20 %.

Во 2005 година, Европската агенција за безбедност на храната (EFSA), преку Научниот комитет за загадувачи во синцирот на исхрана, официјално го препозна присуството на акриламид како значаен контаминант во храната. Во соработка со операторите од прехранбената индустрија, националните тела и со научните институции, EFSA започна систематско истражување на патеките на формирање акриламид и на дефинирање на мерките за негово намалување (JECFA, 2005).

Како резултат на овие активности, во 2007 година Европската комисија ја објави Препораката 2007/331/ЕС, која предвидува воспоставување тригодишна програма за мониторинг (2007–2009) на нивото на акриламид во различни категории на храна. Целта била да се соберат репрезентативни податоци од земјите членки и да се воспостават иницијални референтни вредности за овој контаминант.

Во 2012 година, EFSA ги сумирала резултатите од првата серија на мониторинг и ги објавила во научниот извештај „Ажурирање на нивоата на акриламид во храната од годините за следење 2007–2010“ (EFSA, 2009). Во Извештајот е даден преглед на главните извори на акриламид во исхраната и се идентификувани категории на производи со највисоки концентрации, како што се пржениот компир, кафето и пекарските производи.

Понатаму, во 2013 година, Европската комисија ја донела Препораката 2013/647/ЕС, со која биле дефинирани референтните вредности (benchmark levels) за акриламид во различни групи храна, врз основа на податоците добиени од мониторингот на EFSA во периодот 2007–2012 (EU, 2013).

Во следниот период, со усвојувањето на Препораката 2017/2158/EU, беа поставени ажурирани и построги критериуми за намалување акриламид во храната. Податоците од најновите мониторинзи за периодот 2018–2021 година покажуваат стабилизација и постепено намалување на нивото на акриламид во повеќето категории храна, благодарение на примената на превентивни мерки и на подобрени технолошки процеси (EU, 2017).

Сумираните податоци од двете препораки – 2013/647/EU и 2017/2158/EU – се прикажани во табелата 4, каде што се наведени референтните максимални нивоа (benchmark levels) на акриламид за различни групи пекарски и кондиторски производи, кои служат како насоки за контрола и за усогласеност во рамките на Европската Унија (EU).

Табела 4: Референтни вредности за акриламид во пекарски производи поставени од Европската комисија за 2007 година – 2021 периоди (EU, 2013; EU, 2017; Sarion et al., 2021)

Храна	Референтни вредности, 2013/647/EU [µg/kg]	Референтни вредности 2017/2158/EU [µg/kg]
Леб од пченица	80	50
Мек леб освен леб на база на пченица	150	100
Производи од трици и од целозрнести житарки	400	300
Производи од пченица и од 'рж	300	300
Производи од пченка, овес, спелта, јачмен и од ориз	200	150
Бисквити и обланди	500	350
Крекери, освен на база на компири	500	400
Крцкави крекери	450	350
Крекери од ѓумбир	1000	800
Храна за бебиња, преработена храна на база на житарки за доенчиња и за мали деца, со исклучок на бисквити и двопек	50	40
Бисквити и двопек за доенчиња и за мали деца	200	150

Во табелата 5 се дадени нивоата на референтни вредности за присуство на акриламид во храната од член 2 став (1) на Правилникот што е донесен во нашава земја и е усогласен со Регулативата на Европската комисијата (2017/2158/ЕС) за утврдување

на мерките за ублажување и за нивоата на референтни вредности за намалување на присуството на акриламид во храната (Сл. весник на РСМ бр. 39/2019).

Табела 5: Нивоата на референтни вредности за присуство на акриламид во храната (оригинално преземено, Сл. весник на РСМ бр. 39/2019)

Храна	Ниво на референтна вредност [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Пржени компири (подготвени за јадење)	500
Компир сечен на парчиња од свежи компири и тесто од компири	750
Солени крекери на база на компири Други производи од тесто од компир	
Мек леб	50
(а) Леб од пченица	
(б) Мек леб, освен леб од пченица	100
Житарки за појадок (со исклучок на овесна каша)	300
- производи од трици и интегрални житарки, зрна експандирани со ослободување притисок	
- производи од пченица и од 'рж ( <sup>1</sup> )	
- производи од пченка, овес, спелта, јачмен и од ориз ( <sup>1</sup> )	150
Бисквити и обланди	350
Солени крекери, со исклучок на крекери од компири	400
Крцкави крекери	350
Крекери од ѓумбир	800
Производи слични на други производи во оваа категорија	300
Печено кафе	400
Инстант (растворливо) кафе	850
Замени за кафе	500
(а) замени за кафе исклучиво врз основа на житарки	
(б) замени за кафе од мешавина на житарки и на цикорија ( <sup>*2</sup> )	
(в) замени за кафе исклучиво врз основа на цикорија	4 000
Бebешка храна, преработена храна врз основа на храна за доенчиња и мали деца со исклучок на бисквити и двопек ( <sup>*3</sup> )	40
Бисквити и двопек за доенчиња и мали деца ( <sup>*3</sup> )	150

**Фусноти (како во документот):**

(<sup>1</sup>) Нецели зрна и/или житарки кои не се базирани на трици. Житарките присутни во најголема количина ја одредуваат категоријата на храната.

(<sup>2</sup>) Ниво на референтна вредност кое треба да биде применето за замена за кафе од мешавина на житарки и на цикорија е во согласност со релативното количество на овие состојки во крајниот производ.

(<sup>3</sup>) Како што е дефинирано во Правилникот за храна наменета за доенчиња и за мали деца, храна за посебни медицински намени и целосна замена на дневни оброци за регулирање на телесната тежина (<sup>\*3</sup>).

(<sup>\*1</sup>) Правилникот за адитивите што се употребуваат во производството на храната е усогласен со Регулацијата (ЕЗ) број 1333/2008 на Европскиот парламент и на Советот од 16 декември 2008 година за прехранбени адитиви (СЕЛЕХ бр. 32008R1333) и Регулацијата (ЕК) број 1332/2008 на Европскиот парламент и на Советот од 16 декември 2008 година за прехранбени ензими и за изменување на Директивата број 83/417/ЕЕЗ на Советот, Регулацијата (ЕК) број 1493/1999 на Советот, Директивата број 2000/13/ЕЕЗ на Советот, Директивата број 2001/112/ЕЕЗ на Советот и Регулацијата (ЕК) број 258/97 на Советот (СЕЛЕХ бр. 32008R1332);

(<sup>\*2</sup>) Правилникот за информации поврзани со храната е усогласен со Регулацијата (ЕУ) бр. 1169/2011 на Европскиот парламент и на Советот од 25 октомври 2011 година за давање прехранбени информации на потрошувачите, за изменување на Регулацијата (ЕЗ) бр. 1924/2006 и (ЕЗ) бр. 1925/2006 на Европскиот парламент и на Советот и за укинување на Директивата 87/250/ЕЕЗ на Комисијата, Директивата 90/496/ЕЕЗ на Советот, Директивата 1999/10/ЕЗ на Комисијата, Директивата 2000/13/ЕЗ на Европскиот парламент и на Советот, Директивата 2002/67/ЕЗ и 2008/5/ЕЗ на Комисијата и Регулацијата (ЕЗ) бр. 608/2004 на Комисијата (СЕЛЕХ бр. 32011R1169);

(<sup>\*3</sup>) Правилникот за храна наменета за доенчиња и за мали деца, храна за посебни медицински намени и целосна замена на дневни оброци за регулирање на телесната тежина е усогласен со Регулацијата 609/2013/ЕК 609/2013 на Европскиот парламент и на Советот од 12 јуни 2013 година за храна наменета за доенчиња и за мали деца, храна за специјални медицински цели и целосна замена на исхраната за контрола на телесната тежина и за укинување на Директивата 92/52/ЕЕЗ на Советот, Директивата на Комисијата 96/8/ЕК, 1999/21/ЕК, 2006/125/ЕК и 2006/141/ЕК, Директивата 2009/39/ЕК на Европскиот парламент и на Советот / 2009 и (ЕЗ) бр. 953 / 2009 година (CELEX бр. 32013R0609).

## 1.6 ТЕХНОЛОШКИ СТРАТЕГИИ И МЕТОДИ ЗА НАМАЛУВАЊЕ НА СОДРЖИНАТА НА АКРИЛАМИД ВО ПЕКАРСКИТЕ ПРОИЗВОДИ

Во 2005 година, организација FoodDrinkEurope (претставник на економските оператори во индустријата за храна и за пијалаци во ЕУ) развила збирка на алатки наречена „кутија со алатки за акриламид“. Овој сет содржел најсеопфатни информации собрани од властите, научните истражувачи, меѓународните истражувачки институции и економските оператори за објаснување на процесот на создавање акриламид и за методите за негово намалување во одредени категории храна. Материјалот опфаќа 14 различни аспекти („алатки“), групирани во четири главни групи: агрономски фактори, рецептура, технологија на обработка и финална подготовка на храната. Овие „алатки“ може да се применуваат селективно, во зависност од конкретните потреби на производителите, за да се намали присуството на акриламид во нивните производи



(графикон бр. 1) (EFSA, 2009; Nguyen & Van Boekel, 2017; FoodDrinkEurope, 2019).

Графикон бр. 1: Методи за намалување на акриламид во пекарските производи  
(приспособено од Sarion et al., 2021)

Според Регулативата 2017/2158/ЕС, операторите во прехранбената индустрија имаат обврска да спроведат мерки за намалување на нивото на акриламид за да се

постигнат најниски можни вредности, под референтните нивоа утврдени во овој документ (European Commission, 2017).

Во 2009 година, Codex Alimentarius подготви водич под наслов „Кодекс на практика за намалување акриламид во храната“ – CAC/RCP 67-2009, кој содржи конкретни насоки за намалување на концентрацијата на акриламид. На операторите со храна им се препорачува да ги тестираат сите предложени мерки во своите производствени единици, за да го утврдат најефикасниот пристап за намалување на овој контаминант (Codex Alimentarius, 2009).

При примена на мерките за намалување на нивото на акриламид во храната, треба да се има предвид дека овие постапки не треба да влијаат негативно врз органолептичките, микробиолошките и нутритивните својства на готовите производи, ниту на нивната прифатливост кај потрошувачите (Codex Alimentarius, 2009).

Општо, стратегиите за намалување на формирањето акриламид може да се поделат во три групи: (i) модификација на суровините, (ii) оптимизација на условите за обработка и (iii) додавање екзогени адитиви (Mildner-Szkudlarz et al., 2019).

Во табелата бр. 6 е прикажан систематизиран преглед на клучните регулаторни рамки и технолошки интервенции за намалување на формирањето акриламид во пекарските производи, врз основа на релевантни научни студии и на официјални упатства. Презентираните податоци ги опфаќаат ефектите од различни интервенции врз нивото на акриламид, како и предложените механизми на дејство и практичните ограничувања при примена во индустриски услови.

Табела 6: Регулаторни и технолошки мерки за намалување акриламид во пекарски производи: резиме на докази од литературата

Референција	Матрица / производ	Интервенција / фактор	Ефект врз акриламид (АА)	Клучна напомена / механизам
European Commission (2017)	Сите релевантни пекарски производи	Регулаторна рамка 2017/2158/EU: мерки за намалување и референтни нивоа	Цел: постигнување најниски можни нивоа (под референтни)	Обврска за операторите да применуваат докажани мерки низ процесот
Codex Alimentarius (2009)	Општ водич (житни/пекарски)	CAC/RCP 67-2009: „Кодекс на практика за намалување на АА“	Насоки за ↓ АА	Тестирање мерки; да не се нарушат сензорика, микробиологија и нутритивност
Mildner-Szkudlarz et al. (2019)	Преглед / стратегии	Три групи: суровини, процесни услови, адитиви/ензими	Рамка за систематска ↓ АА	Стратегиска класификација за избор на мерки

Caruano et al. (2009)	Житни/пекарски системи	Оптимизација на рН, T×t (темп.×време), промена на додатоци	↓ АА со процесна оптимизација	Механизми на формирање на АА
Claus et al. (2008b)	Лебни матрици	Формулациски и технолошки фактори; подолга ферментација профил на загревање; тип печка (рецептура, процес)	↓ АА со подолга ферментација; ↓ АА со пониска T и подолго време; Конзистентно ↓ АА при соодветни приспособувања	Повисоки нивоа на акриламид кај конвекциските печки (convection oven) во споредба со индустриските пекарски печки (deck)
Ciesarová et al. (2009)	Пекарски производи	Промена на процесни параметри и на адитиви	↓ АА	Практични мерки на ниво рецептура/печење
Kotsiou et al. (2011)	Пекарски/житни	Оптимизација на печење и на рецептура	↓ АА	Сензитивност на АА кон формула и T×t
Amrein et al. (2007)	Леб со ѓумбир (gingerbread)	Замена NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> → NaHCO <sub>3</sub> во прашок за печење; замена фруктоза/гликоза → сахароза	~60% ↓ АА со сахароза	↑ Интензитет на кафеава боја → ↑ АА
Claus et al. (2006)	Пченичен/ржан леб	Тип на брашно (екстракција);	↓ АА кај брашна со низок степен на екстракција (помала застапеност на обвивката од зрното)	Мелењето (брашно со низок степен на екстракција) ↓ слободен аспарагин;
Wakaizumi et al. (2009)	Модели/теста	Употреба на 24 вида филаментозни габи	↓ АА	Биотрансформација/ензимски ефекти врз прекурсорите
Hedegaard et al. (2008)	Пченично тесто	Додавање екстракт/масло/суви листови од рузмарин	57–67% ↓ АА	Антиоксиданти - влијание врз Мејлардовите патеки
Caruano & Fogliano (2011)	Преглед / применливост	Критичка евалуација на технолошки мерки	Дел од мерките ограничени (сензорика/реологија/квалитет/цена)	Потреба од балансирање на ↓ АА со квалитет и трошоци

АА = акриламид; ↓ намалување; ↑ зголемување.

Сумирајќи ги сите мерки за ублажување на присуството на акриламид, препорачани од FoodDrinkEurope, водичот на Codex Alimentarius и Регулативата 2017/2158/EC (European Commission, 2017), може да се констатира дека тие треба да се применуваат уште од фазата на одгледување на житарките и да продолжат низ целиот технолошки процес, вклучувајќи ги и упатствата за печење на производите во угостителски објекти и во домашни услови. Бројни студии укажуваат и дека количината на акриламид може да се намали со оптимизација на процесните параметри, како што се рН-вредноста, температурата и времетраењето на термичкиот третман (Caruano et al., 2009), измена на додатоците за печење, додавање адитиви или разбирање на механизмите на негово формирање во одредена храна (Claus et al., 2008a; Ciesarová et al., 2009; Kotsiou et al., 2011; Fan et al., 2023).

Амреин и соработниците (Amrein et al., 2007) го утврдиле ефектот на амониум хидрогенкарбонатот како прашок за печење при подготовка на леб од ѓумбир. Со негово заменување со натриум хидрогенкарбонат, нивото на акриламид било намалено за 60 %. Дополнително, тие забележале дека концентрацијата на акриламид расте со интензитетот на кафеавата боја на пекарските производи. Истата истражувачка група покажала дека замената на редуцирачките шеќери (фруктоза или гликоза) со сахароза придонесува за намалување на акриламидот.

И продолженото време на ферментација на тестото може да придонесе за намалување на нивото на акриламид. Клаус и соработниците (Claus et al., 2006) откриле дека лебот со квасец содржи помалку акриламид кога ферментацијата е подолга. И процесот на мелење и типот на брашно имаат влијание – брашната со помалку лушпа содржат помалку слободен аспарагин, што резултира со помало формирање акриламид (Claus et al., 2006; Caruano et al., 2009). Утврдено е и дека намалувањето на температурата, заедно со продолжување на времето на загревање, доведува до помало количество акриламид во 'ржаниот леб, а истото важи и за пченичниот леб. Клаус и соработниците (Claus et al., 2008b) утврдиле дека типот на печка игра клучна улога во формирањето акриламид за време на печењето. Конвекциски печки, кои се базираат на присилна циркулација на воздухот, се покажани како фактори кои го зголемуваат формирањето акриламид во споредба со индустриските печки (традиционалните подни/палубни печки), поради побрзо и порамномерно загревање на површината. Наспроти тоа, употребата на индустриските печки, особено во контролираните индустриски услови, генерално резултира со пониски нивоа на акриламид, бидејќи обезбедуваат умерен и рамномерен термален профил кој го намалува формирањето на прекурсорите на акриламид.

Истражувањата покажуваат дека употребата на различни адитиви имаат значајно влијание врз деградацијата на акриламидот. Вакаиџуми и соработниците (Wakaizumi et al., 2009) ги испитале ефектите на 24 различни вида филаментозни фунги врз намалувањето на неговото формирање. Влијанието на антиоксидантите било истражувано од Хедегард и соработниците (Hedegaard et al., 2008), кои утврдиле дека

додавањето екстракт од рузмарин, масло или суви листови од рузмарин во тестото од пченица ја намалува содржината на акриламид за 57–67 %.

Во производството на храна од житарки, формирањето акриламид може да се ограничи со контрола на технолошките параметри – температура, време, pH-вредност, вид на прашок за печење, употреба на адитиви или ензими. Сепак, примената на овие методи е ограничена бидејќи тие честопати предизвикуваат промени во текстурата, вкусот или во квалитетот на финалниот производ, а понекогаш и зголемени производствени трошоци (Caruano & Fogliano, 2011).

Поради сите овие фактори, намалувањето на акриламидот претставува голем предизвик за прехранбената индустрија.

### **1.7 ПРЕДИЗВИЦИ И ПРИСТАПИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВО НА КОМПОЗИТЕН (ПЧЕНИЦА-ТИКВА) ЛЕБ ЗА РЕДУЦИРАЊЕ НА НИВОТО НА АКРИЛАМИД**

Збогатувањето на лебот со непченични брашна (од мешунки, семиња или од зеленчук) ги менува достапните прекурсори и антиоксидативниот капацитет, а тоа може да влијае врз формирањето акриламид и врз профилот на „Мејлардовите“ производи (Portman et al., 2021; Melini et al., 2024). При производство на пекарски производ, брашната од тиква (*Cucurbita maxima*), кои се богати со диететски влакна, каротеноиди и фенолни соединенија можат да ги изменат достапноста на прекурсорите и можноста да се „случи“ Мејлардовата реакција во тестото и за време на печење (Abdel-Aal et al., 2022a).

Експерименталните истражувања, конкретно со брашно од тиква, покажуваат дека вградувањето на брашно од тиква во пченични рецептури ги модифицира нутритивните и функционалните карактеристики и влијае врз содржината на акриламид зависно од степенот на супституција и од процесните услови. Композитните лебови со брашно од тиква покажуваат изменети концентрации на акриламид кои корелираат со формулацијата и со времето на ферментација/киснење на тестото (Fredriksson et al., 2004). Овие промени се конзистентни со претходни докази дека супституциите со состојки можат да ја променат содржината на акриламид зависно од нивното дејство врз слободниот аспарагин, редуцирачките шеќери и врз внесените биоактивни соединенија (Rydberg et al., 2003; Surdyk et al., 2004; Caruano et al., 2010). Оттука, брашното од тиква има потенцијал истовремено да ја подобри нутритивната вредност (диететски влакна, каротеноиди и сл.) и да ја модулира формацијата на акриламид преку ефекти врз прекурсорите и врз антиоксидантите (Abdel-Aal et al., 2022b).

#### **1.7.1 Технолошки приспособувања за намалување на акриламидот**

Продолжената ферментација ја намалува содржината на слободниот аспарагин и на другите прекурсори од реакциите од Мејлардов вид како резултат на микробниот метаболизам и протеолиза, со што се намалува акриламидот во крајниот производ; па така, повеќе студии пријавуваат значајни намалувања во нивоата на акриламид со

подолги времиња на ферментација и со употреба на кисело тесто или LAB-третмани (Fredriksson et al., 2004; Ciesarová et al., 2014; Dastmalchi et al., 2016; Bartkiené et al., 2017). Фредриксон и соработниците (Fredriksson et al., 2004) експериментално покажале дека продолженото киснење на тестото (ферментацијата) го модулира акриламидот во композитен леб пченица–тиква, укажувајќи на синергија при која ферментацијата ги намалува прекурсорите воведени/модифицирани со брашното од тиква.

**Ензимски преттретман (аспарагиназа) и селекција на микробни соеви.** Примената на аспарагиназа (растителна или микробна) или изборот на ферментативни соеви (пр. *Lactobacillus* spp.) што трошат слободен аспарагин, ја намалува формацијата на акриламид во леб и во пекарски производи (Tuncel et al., 2010; Huang et al., 2014). И комбинирањето супституција со брашно од тиква (која може да го промени нивото на прекурсори) со аспарагиназа или со таргетирана ферментација ја намалува содржината на акриламид во пекарските производи (Tuncel et al., 2010; Huang et al., 2014).

**Употреба на антиоксиданти и на фенолни екстракти.** Додавањето екстракти богати со полифеноли или со растителни антиоксиданти (зелен чај, чај од *Ampelopsis grossedentata*, рузмарин, овошни екстракти) може да инхибира формирање акриламид преку фаќање радикали или преку интеракција со интермедиери од Мејлардовата реакција; студиите покажуваат дозозависни ефекти и понекогаш двоен (промотивен/редукциски) карактер зависно од концентрацијата и од хемијата на соединението (Jing et al., 2019; Ma et al., 2020b; Wang et al., 2022; Wächter et al., 2023). Ендогените каротеноиди и феноли на брашното од тиква (пр. лутеин, зеаксантин; промени на ферулна киселина при печење) можат да придонесат за антиоксидативна активност што ги модулира реактивните патеки и го намалува нивото на акриламид, поддржувајќи синергија меѓу стратегиите на состојки и на адитиви (Abdel-Aal et al., 2022b).

### 1.7.2 Оптимизација рецептура–процес: синергија и компромиси

Кога ефектите во врска со хемискиот состав на брашното од тиква (антиоксиданти, диететски влакна, изменет баланс на шеќер/аспарагин) се комбинираат со подолга ферментација на тестото, односно со продолжено време на ферментација (микробна потрошувачка на прекурсори) и со внимателна контрола на термичкиот третман на кората (пареа, оптимизиран профил на печење), веројатни се синергистички ефекти и намалувања на нивото на акриламид во композитни лебови, кај кои варираат и застапеноста на брашното од тиква и времетраењето на ферментацијата (Fredriksson et al., 2004; İşleroğlu et al., 2012; Purlis, 2012). Комбинацијата на мерките за редукција на акриламид на ниво на состојки и контролата на процесните параметри при производството на леб, овозможуваат истовремено да се влијае и врз прекурсорите и врз условите на реакцијата – двата клучни фактора што го определуваат формирањето акриламид (Robert et al., 2004; Friedman & Levin, 2008; Keramat et al., 2010).

*Потенцијално негативни интеракции и сензорски ограничувања.* Одредени супституции на состојки или промени во процесот можат да доведат до несакани

промени во бојата на кората и/или на внатрешноста на лебот, во текстурата и во вкупната прифатливост. На пример, употребата на брашна многу богати со диететски влакна или на алтернативни брашна честопати резултира со потемна боја и со промени во структурата и во волуменот на лебот, додека претераното намалување на површинската температура при печењето може да го наруши посакуваното потемнување на кората. Поради тоа, стратегиите за ублажување на акриламидот треба да бидат избалансирани така што ќе го намалат неговото ниво без да ја компромитираат вкупната прифатливост на производот (Purlis, 2011; Bartkieniè et al., 2017). Студиите нагласуваат заедничка оптимизација на формулацијата (рецептурата) и на процесот за да се најдат прифатливи компромисни точки (Demirkesen et al., 2011; Purlis, 2012; Ayaz et al., 2022).

Влијанието на биоактивите и на алтернативните брашна врз акриламидот е зависно од дозата и од матриксот – одредени полифеноли/екстракти редуцираат акриламид само во тесни концентрациски граници и можат дури и да го промовираат создавањето во други услови. Слична комплексност важи за нивоата на брашно од тиква, кои при високи нивоа на супституција може да го зголемат присуството на редуцирачки шеќери или на аспарагин, или да ја изменат врзувачката способност за вода и својствата на кората (Wang et al., 2022; Portman et al., 2021; Surdyk et al., 2004; Rydberg et al., 2003). Овие податоци потврдуваат колку е суштинска емпириската оптимизација на сите фази од процесот.

## **1.8 МЕТАБОЛИЗМОТ НА АКРИЛАМИД ВО ЧОВЕЧКОТО ТЕЛО**

Молекулот на акриламид е мал и хидрофилен, што му овозможува пасивно да дифундира низ целото тело. Поради тоа, сите ткива се потенцијални цели на канцерогениот процес инициран од молекулот на акриламид (Hogervorst et al., 2007).

Во човечкото тело (како и кај стаорци и кај други глодари), акриламидот се метаболизира или со директна конјугација со глутатион (GSH) во реакција катализирана од глутатион S-трансфераза (GST) или, пак, ензимски преку епоксидација преку цитохром P-450 CYP2E1, проследено со конјугација со глутатион (GSH) (Kwolek-Mirek et al., 2011). Метаболитот формиран во оваа реакција е глицидамид (GA) (слики бр. 3 и 4), кој, заедно со акриламидот, формира стабилни адукти на ДНК и индуцира канцерогенеза поради неговите генотоксични својства. Најмалку 6 % од администрираната доза на акриламид се претвора во глицидамид (GA) епоксид (Kwolek-Mirek et al., 2011).



Слика бр. 3: Конверзија на акриламид во глицидамид преку цитохром P-450 CYP2E1 (приспособено од Harahap et al., 2021)

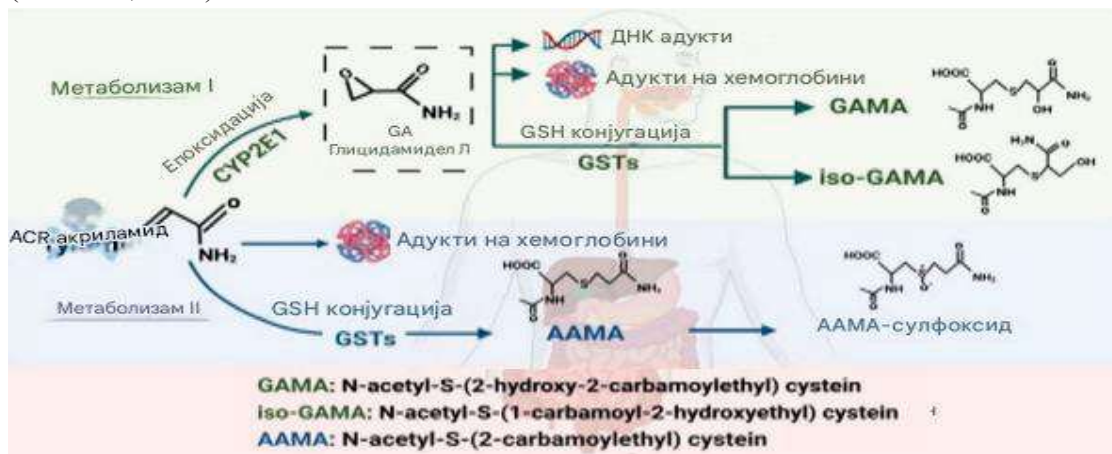
Генерално, GA е повеќе цито- и генотоксичен од акриламидот, и *in vitro* и *in vivo*. Постојат сè повеќе студии што сугерираат дека GA е примарниот агенс одговорен за иницирање рак кај карциногенезата предизвикана од акриламид (Von Tungeln et al., 2012).

Метаболичкиот и детоксикацискиот пат на акриламид вклучува конјугација со GSH за да се формираат GSH-адукти, кои брзо се трансформираат во соодветните метаболити на меркаптурична киселина: N-ацетил-S-(3-амино-3-оксопропил)-цистеин (AAMA), N-ацетил-S-(1-карбамоил-2-хидроксиетил)-цистеин (ISO-GAMA) и N-ацетил-S-(2-карбамоил-2-хидроксиетил)-цистеин (GAMA). Овие метаболити се излучуваат во човечката урина (Fennell & Friedman, 2005). AAMA и GAMA се сметаат за главни уринарни биомаркери за изложеност на акриламид (Kopp & Dekant, 2009). Моларниот однос на AAMA кон GAMA се користи и во токсикокинетички експерименти за индиректна процена на конверзијата на акриламид во пореактивен GA. Употребата на AAMA и GAMA нуди ветувачки перспективи за олеснување на токсиколошките и на епидемиолошките студии насочени кон евалуација на врската помеѓу изложеноста на акриламид и човечките болести (Wang et al., 2017).

Акриламидот се подложува на биотрансформација во црниот дроб, катализирана од глутатион S-трансфераза, каде што се коњугира со глутатион за да генерира N-ацетил-S-цистеин. Ова соединение понатаму се разградува во деривати на меркаптурична киселина на акриламид, кои се излучуваат во урината. Овојпат првенствено е одговорен за детоксикација на акриламид (Kirman et al., 2003).

Истражувањата покажаа дека GA може да се врзе за пуринските бази во молекулите на деоксирибонуклеинска киселина (ДНК) за да формира ДНК-адукти, да го инхибира ослободувањето на невротрансмитери, да предизвика дегенерација на нервните терминали, да ги оштети нервните структури и да покаже различни кумулативни ефекти. Покрај тоа, способноста на GA да формира хемоглобин (Hb) и ДНК-адукти е поголема од онаа на акриламидот. Затоа, овојпат се смета за главен механизам што лежи во основата на невротоксичноста предизвикана од акриламид (Mucci & Wilson, 2008; Li et al., 2016). Општо земено, намалувањето на глутатионот ги

намалува нивоата на антиоксиданти, што доведува до прекумерна акумулација на реактивни кислородни видови и резултира со оксидативен стрес и со невротоксичност (Pan et al., 2018).



Слика бр. 4: Метаболичкиот пат на акриламидот (приспособено од Zhao et al., 2022)

### 1.8.1 Токсиколошки ефекти на акриламид врз човечкото тело и ризици претставени со неговото консумирање

Акриламидот се апсорбира кај луѓето и кај животните преку голтање, вдишување и изложеност преку кожата. Истражувањата покажаа дека по вдишувањето, акриламидот брзо се дистрибуира до сите органи на телото преку крвотокот (слика 4). Може да се открие во мозокот, срцето, црниот дроб, бубрезите и во мајчиното млеко (Matoso et al., 2019; Mollakhalili-Meybodi et al., 2021).

Лабораториските студии покажаа дека изложеноста на акриламид предизвикува неколку несакани ефекти, вклучувајќи генотоксични, канцерогени и невротоксични ефекти, а влијае и врз машкиот репродуктивен систем. Акриламидот придонесува за генетски мутации и за формирање тумори во различни органи. Врз основа на експерименти врз животни, експертите од Европската агенција за безбедност на храната (EFSA) заклучиле дека акриламидот во храната може да го зголеми ризикот од рак кај потрошувачите од сите возрасни групи, вклучително и кај децата, кои ја претставуваат најизложената возрасна група (Bignardi et al., 2019; Crawford & Wang, 2019).

Потенцијалните канцерогени ефекти на акриламидот се препознаени уште од 1994 година, кога Меѓународната агенција за истражување на ракот (IARC) го класифицирала акриламидот како „веројатен човечки канцероген“ (Kafouris et al., 2018; Esposito et al., 2020).

Панелот за загадувачи во синцирот на исхрана (CONTAM) на Европската агенција за безбедност на храната во 2015 година издал научно мислење за акриламидот во храната. Врз основа на студии на животни, овој панел ги потврди претходните процени дека изложеноста на акриламид преку исхраната може да го зголеми ризикот

од рак кај потрошувачите од сите возрасни групи (Jouquand et al., 2018). Со оглед на тоа што акриламидот е присутен во широк спектар на храна што се консумира секојдневно, оваа загриженост важи за сите потрошувачи, но сепак, децата ја сочинуваат најизложената група врз основа на нивната телесна тежина. Според Ѓулџан и соработниците (Gülcan et al., 2020), потенцијалните негативни ефекти на акриламидот врз нервниот систем и врз пренаталниот и постнаталниот развој не се сметаат за причина за загриженост на сегашните нивоа на изложеност преку исхраната. Сепак, моменталните нивоа на изложеност на акриламид во исхраната кај сите возрасни групи укажуваат на потреба од загриженост во врска со неговите канцерогени ефекти (Zhang et al., 2017; Nematollahi et al., 2019).

### **1.8.2 Механизам на невротоксичност предизвикана од акриламид – аксонална дегенерација**

Аксоналната дегенерација е патолошка карактеристика на невродегенеративните заболувања. Таа е предизвикана од оштетување на специфични структури на периферните нерви познати како аксони, кои се продолжетоци на нервните клетки (неврони) одговорни за пренесување на нервните импулси. Претходните истражувања сугерираат дека невротоксичноста предизвикана од акриламид може да биде поврзана со оштетување на нервните терминали и во периферниот и во централниот нервен систем (LoPachin & Lehning, 1994). Истражувањата покажале дека акриламидот може да ги измени  $\beta$ -актинот,  $\beta$ -тубулинот и другите цитоскелетни протеини, со што ги нарушува невронските структури и предизвикува невротоксичност. Последователните морфолошки, електрофизиолошки и електрохемиски студии покажуваат дека нервните терминали се примарни цели на токсичноста од акриламид (LoPachin et al., 2006). Со зголемување на времетраењето на изложеноста, штетата прогресивно се влошува и на крајот води до аксонална дегенерација. Хроничната интоксикација со акриламид може да предизвика селективна дегенерација на периферните и на централните нервни влакна, првично јавувајќи се на дисталните краеве на долгите нервни влакна со голем дијаметар, проследена со прогресивна и континуирана дегенерација на проксималните аксони (Spencer & Schaumburg, 1975). Понатамошни студии покажале дека акриламидот влијае врз невронските протеини, што резултира со недоволно снабдување со аденозин трифосфат, што ја нарушува функционалноста на аксоналниот транспорт (An et al., 2016).

Развојот на масената спектрометрија и нуклеарната магнетна резонанца им помогна на истражувачите подобро да разберат како акриламидот влијае врз нервниот систем. Како електрофилно соединение, акриламидот лесно реагира со сулфхидрилни групи во протеините и може да се врзе и за ДНК, формирајќи адукти за кои се смета дека играат клучна улога во неговите невротоксични ефекти (LoPachin et al., 2006). Покрај ова, акриламидот реагира со протеини што содржат тиол, го нарушува пресинаптичкото сигнализирање на азотен оксид (NO), ги оштетува нервните терминали и се меша во нормалниот пренос на нервните сигнали, што на крајот доведува до невротоксичност

(Mohr et al., 1994). Доказано е дека продолжената изложеност предизвикува моторни нарушувања, придружени со изразена дегенерација на допаминергичните и на холинергичните неврони (Murray et al., 2020). Имено, Копањска и соработниците (Корањска et al., 2022) истакнале тесна врска помеѓу невротоксичноста предизвикана од акриламид и дисфункцијата на холинергичниот антиинфламаторен пат.

Доказано е дека акриламидот ги намалува холинергичната невротрансмисија и ослободувањето на ацетилхолин, со што се потиснува холинергичниот антиинфламаторен пат и потенцијално предизвикува системски воспалителен одговор (Корањска et al., 2022). Покрај тоа, Јанутова и соработниците (Janoutová et al., 2015) објавија дека когнитивниот пад што е резултат на невронска дегенерација честопати претходи на развојот на Алцхајмеровата болест, додека губењето на допаминергичните неврони е поврзано со Паркинсоновата болест. Заедно, овие наоди сугерираат дека изложеноста на акриламид може да придонесе за патолошките процеси што лежат во основата на невродегенеративните нарушувања (Benedetto et al., 2010).

### 1.8.3 Апоптоза и автофагија

Апоптозата, добро позната форма на програмирана клеточна смрт, игра витална улога во развојот и во прогресијата на невродегенеративните заболувања (Unver-Saraydin et al., 2020). Нервните клетки – вклучувајќи ги невроните, астроцитите и микроглијата – дејствуваат заедно за да ја одржат нормалната функција на мозокот (Barres, 2008). Астроцитите главно обезбедуваат метаболичка и невротрофична поддршка на невроните (Sofroniew & Vinters, 2010), додека микроглијата делува како резидентни имунолошки клетки на централниот нервен систем, континуирано следејќи ја невронската средина (Graeber & Streit, 2010). Иако микроглијалната активација е од суштинско значење за имунолошката одбрана, прекумерната или продолжената активација може да доведе до ослободување на проинфламаторни медијатори и да придонесе за оштетување на нервите (Block et al., 2007). Самите неврони се одговорни за пренесување на нервните импулси, а нивното оштетување се манифестира како когнитивни дефицити и моторна дисфункција. Преку индукција на апоптоза во овие популации на нервни клетки, акриламидот може да ја наруши хомеостазата на мозокот и на крајот да доведе до невротоксичност.

Лиу и соработниците (Liu et al., 2015) ги истражувале молекуларните механизми што лежат во основата на овој процес и покажале дека акриламидот предизвикува митохондријална дисфункција во клетките на човечкиот астроцитом. Оваа дисфункција ги активира каспазата-9 и низводните апоптотични каскади, ја зголемува експресијата на про-апоптотичниот протеин BCL-2-асоциран X протеин (Bax), го менува односот Bax/B-клеточен лимфом-2 (Bcl-2) и на крајот предизвикува митохондрија-зависна апоптоза, со што придонесува за невротоксични ефекти.

Покрај митохондријалните патишта, неколку интрацелуларни сигнални каскади се вклучени во апоптоза предизвикана од акриламид. Митоген-активирана протеин киназа (МАРК), серин-треонин протеин киназа, може да контролира многу клеточни

активности, како што се апоптозата и пролиферацијата и изразувањето сигнално регулирана протеинска киназа екстрацелуларно регулирани протеински кинази (ERK), c-Jun N- терминални киназа (JNK) и p38 протеин гени (Cuadrado & Nebreda, 2010; Wagner, et al., 2009). Инактивирањето ERK и активирањето JNK и p38 се од суштинско значење за индуцирање апоптоза. Табешпур и соработниците (Tabeshpour et al., 2020) покажале дека изложеноста на акриламид го намалува односот p-ERK/ERK, додека ги зголемува односите Вах/Vcl-2, p-JNK/JNK и p-p38/p38 во церебралниот кортекс, што укажува на тоа дека активирањето на патеката MAPK ја промовира апоптозата предизвикана од акриламид. Дополнително, нуклеарниот фактор-кВ (NF-кВ) регулира различни целни гени, како што се пролиферација и апоптоза, додека сигналот NF-кВ е склон кон вкрстување и влијае врз неколку сигнални патишта (Taniguchi & Karin 2018).

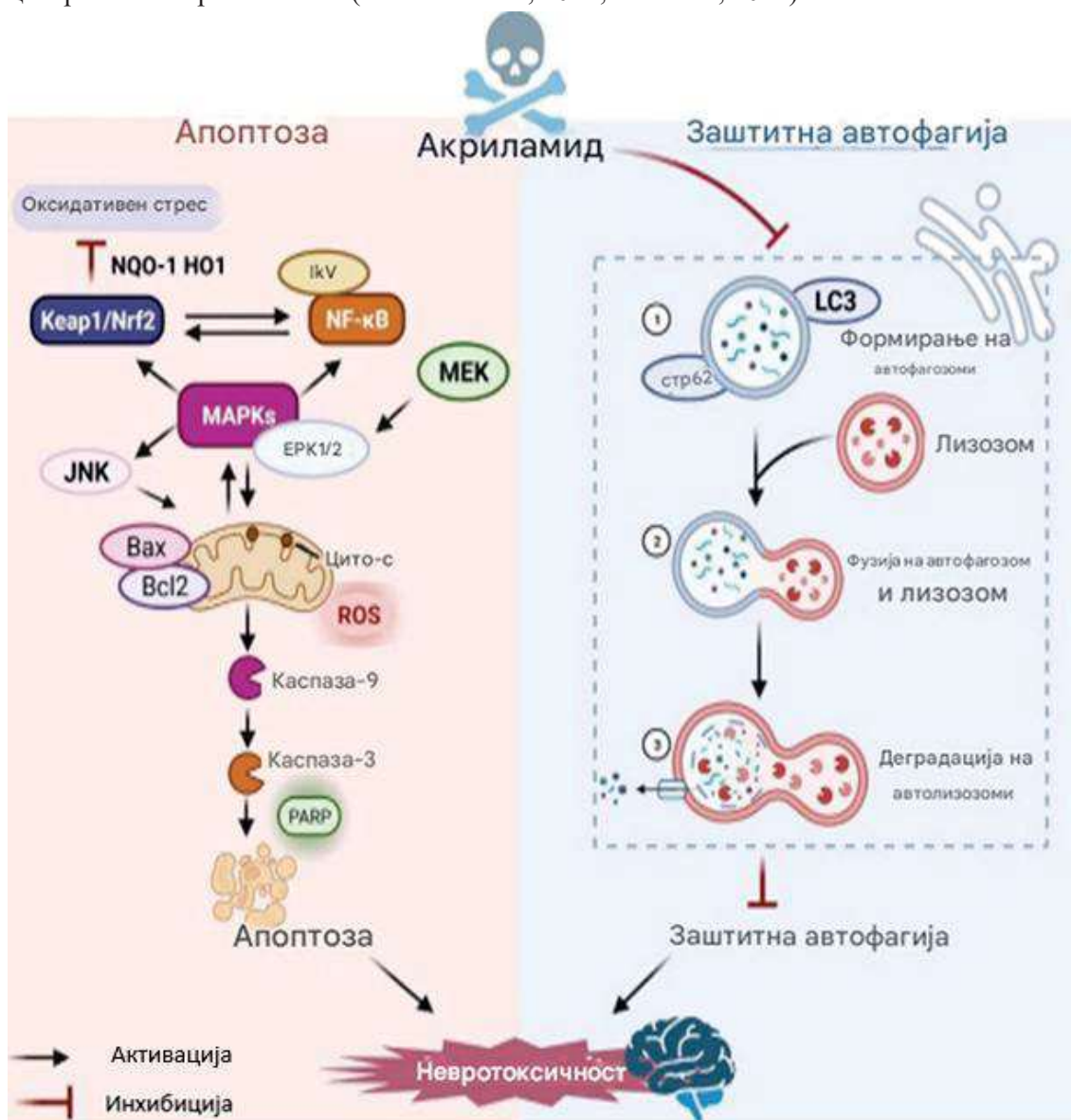
Докажано е дека акриламидот предизвикува апоптоза преку MAPK-посредувана активација на NF-кВ сигналите, што на крајот резултира со цитотоксични ефекти (Yan et al., 2019). Паралелно, факторот E2, поврзан со нуклеарниот фактор еритроид 2 (Nrf2), функционира како клучен регулатор на клеточната редокс-хомеостаза и ги координира адаптивните антиоксидантни одговори на оксидативен стрес (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

Пан и соработниците (Pan et al., 2017) објавиле дека акриламидот ги активира и патеките Nrf2 и MAPK во клетките PC12. MAPK ја регулираат нуклеарната транслокација на Nrf2, со што придонесуваат за механизмите за антиоксидантна одбрана. Важно е да се напоми дека MAPK можат да влијаат и врз сигнализацијата Nrf2 и врз сигнализацијата NF-кВ, овозможувајќи двонасочни регулаторни интеракции помеѓу овие патеки (Pan et al., 2017). Како резултат на тоа, вкрстувањето помеѓу сигналните на NF-кВ, MAPK и на Nrf2 е од витално значење играјќи клучна улога во апоптозата и во невротоксичноста предизвикана од акриламид.

Заштитната автофагија посредувана од лизозоми, е од суштинско значење за одржување на интрацелуларната редокс-рамнотежа и за отстранување на оштетените протеини и органели, со што се поддржува преживувањето на клетките (Aldawood et al., 2020). Сепак, прекумерната изложеност на акриламид го нарушува овој заштитен механизам. Лиу и соработниците (Liu et al., 2015) покажале дека супхроничната изложеност на акриламид го нарушува автофагичниот флуks со инхибирање на лизозомската протеаза D, што го компромитира воспалителното чистење и го промовира локалното воспаление – ефект што може да биде клучен во невротоксичноста предизвикана од акриламид. Слично на тоа, Сонг и соработниците (Song et al., 2021) забележале зголемени нивоа на автофагичниот маркер лесен ланец на протеинот 1 поврзан со микротубули 3-II (LC3-II) заедно со акумулацијата на p62, што укажува на инхибиција на автофагичната деградација.

Автофагијата претставува строго регулиран, повеќестепен процес кој вклучува формирање автофагозоми, фузија на автофагозоми со лизозоми и деградација на автолизозомска содржина (Yorimitsu et al., 2009). Важно е да се напоми дека рамнотежата и интеракцијата помеѓу апоптозата и автофагијата се клучни за одржување

на здравјето на мозокот и играат значајна улога во патогенезата на нарушувањата на централниот нервен систем (Ghavami et al., 2014; Wu et al., 2014).



Слика бр. 5: Потенцијалниот механизам на акриламид – индуцирана апоптоза и автофагија (приспособено од Zhao et al., 2022)

Студијата на Денг и соработниците (Deng et al., 2021) ги потврдила позициите на имунофлуоресценција и колокализација и коекспресија на клучните автофагични маркери за време на триавтофагичниот процес. Клеточната апоптоза и автофагичниот флукс покажале дека ограничувањето на автофагијата предизвикана од акриламид дополнително го промовира почетокот на апоптозата (слика бр. 5), која се појавува како резултат на акумулацијата на автофагозоми предизвикана од акрилами, спречувајќи ги автофагозомиите да се комбинираат со лизозомите (Zhao et al., 2022).

#### 1.8.4 Оксидативен стрес

Мозокот е поранлив на оксидативен стрес во споредба со другите органи (Foyet et al. 2017; da Silva et al., 2014), бидејќи многу компоненти на нервните клетки многу се подложни на оксидативно оштетување (Chen & Zhong, 2014). Сè повеќе студии покажуваат дека оксидативниот стрес може да биде вклучен во појавата и во прогресијата на невродегенеративни и на хронични болести (како што се мозочен удар, дијабетес, Паркинсонова, Алцхајмерова болест и други болести) (Patil et al., 2014).

Иако реактивните кислородни видови (ROS) се создаваат природно за време на нормалните физиолошки процеси, прекумерното производство на ROS ја инхибира активноста на антиоксидантната редуктаза и ја нарушува клеточната редокс-хомеостаза и на крајот води до оксидативно оштетување (Santhanasabapathy et al., 2015). Во контекст на изложеност на акриламид, невротоксичноста најчесто се поврзува со интрацелуларно намалување на глутатион, клучен антиоксидант, што укажува на тоа дека оксидативниот стрес игра централна улога во оштетувањето на нервите предизвикано од акриламид (Korańska et al., 2015).

Лиу и соработниците (Liu et al., 2015) покажале дека акриламидот значително ја зголемува продукцијата на ROS во микроглијалните клетки BV-2, што резултира со оксидативен стрес и митохондријална дисфункција, проследени со зголемена експресија на про-апоптотични гени и активација на каспаза-зависниот апоптотичен пат. Овие наоди укажуваат на тоа дека оксидативниот стрес е главен фактор што придонесува за развојот на невротоксичност предизвикана од акриламид. Важно е да се напоми дека на покачените нивоа на ROS и на оксидативното оштетување во мозокот треба да се гледа не само како на видливи исходи, туку и како на последици од подлабоки нарушувања во редокс-регулираните сигнални патишта. Затоа, разјаснувањето како овие редокс-промени се поврзани со специфични молекуларни сигнални механизми е од суштинско значење за поцелосно разбирање на невротоксичноста предизвикана од акриламид.

#### 1.8.5 Епидемиолошки студии на акриламид во човековата исхрана и ризикот од рак

Епидемиологијата е научна дисциплина која ја испитува распространетоста на болестите и нивните детерминанти во популацијата (Rothman, 1998). Соодветно и добродизајнираните епидемиолошки студии имаат потенцијал да обезбедат релевантни податоци за адресирање на клучни истражувачки прашања во областа на јавното здравство. Во контекст на зголемената загриженост поврзана со присуството на акриламид во храната, биле спроведени четири епидемиолошки студии за проценка на внесот на акриламид и на ризикот од рак, користејќи постоечки податоци од шведски популациски студии и други кохортни истражувања (Mucci et al., 2003; Mucci et al., 2004; Mucci et al., 2005b; Mucci et al., 2006).

Резултатите од овие студии покажуваат дека вообичаената изложеност на акриламид преку исхраната не е поврзана со зголемен ризик од рак на дебелото црево,

ректумот, мочниот меур, бубрезите или на дојката (Mucci et al., 2003; Mucci et al., 2004; Mucci et al., 2005b; Mucci et al., 2006). Во рамките на анализираниите студии, контролните групи биле формирани од пациенти хоспитализирани во истите здравствени установи поради акутни, не-неопластични заболувања. За сите проучувани типови рак, не беа идентификувани докази за позитивна асоцијација помеѓу диететскиот внес на акриламид и ризикот од рак. Дополнително, не била забележана разлика во асоцијацијата помеѓу пушачите и непушачите.

Понатаму, во рамките на Холандската кохортна студија за исхрана и за рак (Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer, NLCS), била спроведена епидемиолошка студија која опфатила проспективна кохорта од 62 573 жени (Hogervorst et al., 2007). Со примена на проспективна кохортна студија, биле вклучени 1 350 жени со рак на дојка, 195 жени со рак на јајниците и 221 жена со рак на ендометриумот, дијагностицирани во периодот од 1986 до 1997 година. За зголемување на ефикасноста при обработката на податоците од прашалникот за фреквенција на храна (FFQ), по случаен избор била формирана контролна група составена од 2 438 жени без претходно дијагностициран карцином.

Според наодите од студијата, не била утврдена асоцијација помеѓу диететскиот внес на акриламид и ризикот од рак на дојка. Сепак, кај жените со највисок внес на акриламид бил забележан зголемен ризик од рак на јајниците, со релативен ризик од 1,8 (95 % CI = 1,1–2,9). Дополнително, иако не била утврдена поврзаност помеѓу внесот на акриламид и ризикот од рак на ендометриумот во целокупната популација, релативниот ризик при споредба на највисокиот со најнискиот внес изнесувала 2,0 (95 % CI = 1,1–3,5) кај жените кои никогаш не биле пушачи. Овие резултати се разликувале од наодите пријавени од Пелуки и соработниците (Pelucchi et al., 2006).

Една од клучните предности на студијата NLCS е фактот што процената на исхраната била спроведена пред поставувањето на дијагнозата, со што се минимизира можноста за појава на селекциски предрасуди, кои честопати се присутни кај болничките студии. Во таа насока, важно е да се нагласи дека во холандската популација колачот со ѓумбир претставувал главен диететски извор на акриламид.

Иако авторите не ги прикажале поединечните процени на релативниот ризик поврзани со специфични прехранбени производи богати со акриламид – што би овозможило појасно разграничување на потенцијалниот ефект на акриламидот од ефектите на други компоненти на исхраната – добиените наоди, сепак, укажуваат на оправданост на понатамошни истражувања во оваа област.

Епидемиолошките студии имаат значајна предност бидејќи овозможуваат директна процена на тоа дали изложеноста на акриламид на нивоа релевантни за човековата исхрана го зголемува ризикот од рак во човечката популација, за разлика од експерименталните биолошки модели кај кои се применуваат дози што се 1 000–100 000 пати повисоки од реалната изложеност. За процена на ризикот при ниски дози, математичките модели обично претпоставуваат дека ефектот на акриламид се зголемува линеарно, дури и при многу ниски нивоа на изложеност (JECFA, 2005). Понатаму,

стапката со која акриламид се претвора во неговиот пореактивен метаболит, глицидамид, зависи од дозата, а на ниски концентрации клеточните механизми за заштита, вклучувајќи поправка на ДНК и апоптоза, можат ефикасно да го неутрализираат и акриламидот и глицидамидот (Dybing & Sanner, 2003; JECFA, 2005).

Според процените на Мучи и Адами (Mucci & Adami, 2005a), за откривање на релативните ризици предвидени според студии со животни, би била потребна популација поголема од два милиони лица. Малите проценети зголемувања на ризикот ја ограничуваат можноста епидемиолошките истражувања да ја потврдат или да ја отфрлат постоечката асоцијација, што претставува значајно ограничување на студијата. Дополнително, толку ниско зголемување на ризикот не се смета за приоритетно од аспект на јавното здравје.

Дополнителен предизвик при процената на ризикот од акриламид преку епидемиолошки студии е потенцијалната пристрасност во изборот на учесници и при извештајот за внес на храна, особено кај студии што се потпираат на самопријавени податоци преку прашалници за фреквенција на храна (FFQ). Прецизното определување на внесот на акриламид преку овие прашалници е ограничено, бидејќи секоја ставка мора да се оцени со една единечна вредност на акриламид, додека самите ставки честопати групираат различни намирници со значително различни концентрации на соединението. Дополнително, повеќето студии користат една единечна процена на изложеноста во средната возраст, што не ја отсликува варијабилноста на внесот низ целиот животен век. Понатаму, акриламидот не е единственото генотоксично соединение создадено при термичка обработка на храната; идентификувани се приближно 50 други соединенија со потенцијално канцерогено дејство (HEATOX, 2007). Затоа, и покрај тоа што резултатите од епидемиолошките студии досега не покажале силни и конзистентни асоцијации со ризикот од рак, овие ограничувања ја нагласуваат потребата за понатамошни истражувања со поефикасни методи за процена на изложеноста и за разграничување на ефектите на акриламидот од други потенцијални канцерогени соединенија во храната.

## 2. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕ И ДЕФИНИРАЊЕ НА ПРОБЛЕМОТ

Пекарските производи се сметаат за еден од главните извори на акриламид во исхраната на луѓето. Поради тоа, редуцираното формирање акриламид во термички обработената храна претставува значаен предизвик за пекарската индустрија. Со оглед на глобалната потрошувачка на пекарски производи, во последните години акриламидот стана актуелен проблем и од аспект на науката за исхрана, токму поради неговите токсични ефекти.

Имајќи го предвид претходно изнесеното, проблемот на истражувањето во оваа докторска теза произлегува од потребата за редукција на присуството на акриламид, соединение кое се формира при термичката обработка, особено при печењето на пекарските производи. Акриламидот, како веројатен канцероген за луѓето, може да претставува значителен ризик за здравјето на потрошувачите, поради што постои итна потреба за развој на стратегии за редукција на неговото ниво во храната. Оваа ситуација бара длабинско истражување на факторите што влијаат врз неговото формирање, како и истражување на можностите за реформулирање на рецептурите и за оптимизација на технолошките процеси за да се постигне целта за безбедност на храната. Оттука произлегува и работната хипотеза на оваа докторска теза – Употребата на природни антиоксиданти и други функционални компоненти (содржани во „брашното“ од тиква) присутни во соодветно количество во рецептурата и оптимизирањето на технолошките услови, односно ферментацијата во производството на пекарските производи може да обезбедат редуцирано создавање акриламид во пекарскиот производ, без да се компромитираат сензорните својства на финалниот функционален производ. Во оваа рамка, дисертацијата систематски ги испитува ефектите од додавање брашно од тиква (0–20 %) во смеси со меко пченично брашно при два режима на ферментација (едночасовна – 1Н и двочасовна – 2Н ферментација) пред печење. Оценети се: загуби при печење, специфичен волумен, надворешен изглед, порозност, текстура, водна активност; колориметрија (кора/внатрешност); антиоксидативна активност и вкупни полифеноли; редуцирачки шеќери; и акриламид. Паралелно се карактеризираат гранулометриската распределба и технолошко-функционалните индикатори (WNC, WAC, WAI, WSI, SP, OAC), реолошките и вискозните својства за да се поврзат структурно-функционалните промени со перформансите на лебот.

Главната цел е да се утврди дали и во кој обем брашното од тиква, во комбинација со продолженото време на киснење на тестото (ферментација), обезбедува нутритивно и функционално унапредување со истовремена редукција на присуството на акриламид во готовиот производ. За остварување на целта на ова истражување, поставени се повеќе специфични задачи: (1) да се квантифицира влијанието на додаденото брашно од тиква (5–20 % масен удел) врз технолошко-функционалните параметри и реолошките својства; (2) да се моделира врска меѓу гранулометриските карактеристики, интеракциите со водата и макросвојствата (волумен, текстура, водна активност, боја); (3) да се проценат антиоксидативниот капацитет и содржината на вкупни полифеноли во зависност од

нивото на тиква и од времето на ферментација; (4) да се измери присуството на редуцирачки шеќери и на формиранитот акриламид, како и нивната зависност од формулација/процес; (5) да се дефинира оптимален интервал на инкорпорација на брашното од тиква што обезбедува прифатливи сензорни особини и редуцирана содржина на акриламид. Студијата нуди научно заснована, применлива рамка за реформулација на леб со брашно од тиква при контролирана ферментација, усогласлива со индустриските упатства за редукција на акриламид. Идентификуваните придобивки се: (i) нутритивно/функционално подобрување (каротеноиди, фенолни соединенија, диететски влакна; подобрени водни интеракции) и (ii) потенцијална редукција на акриламид преку синергија меѓу формулацијата и процесот. На поширок план, резултатите придонесуваат за одржливи прехранбени системи и за јавното здравје, без компромис на сензорниот интегритет на производот. Со ова поставување, дисертацијата ја артикулира потребата од интегрирана, експериментално валидирана оптимизација на рецептурата и технологијата во производство на леб – преку компатибилно користење брашно од тиква и процесни стратегии – за мерливи подобрувања во квалитетот и во безбедноста на лебот.

Согласно со изнесеното, овој докторскиот труд има за цел да придонесе за развој на иновативни стратегии за намалување на акриламидот во пекарските производи, преку систематско испитување и преку анализа на факторите кои влијаат врз неговото формирање. Примената на реформулирани рецептури и оптимизацијата на технолошките процеси ќе обезбедат нови производи кои не само што ќе бидат безбедни за консумација, туку и ќе задоволуваат високи стандарди за квалитет и за сензорни својства. Поради тоа, сметаме дека ова истражување ќе придонесе како за заштита на здравјето на потрошувачите, така и за зголемување на конкурентноста на пекарските производи на пазарот.

### 3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Истражувањето спроведено во рамките на оваа докторска дисертација беше дизајнирано и изведено во две последователни, меѓусебно поврзани фази, при што експерименталните активности и анализи беа реализирани во соработка со повеќе научноистражувачки институции. Примарните експериментални испитувања беа спроведени на Технолошко-техничкиот факултет – Велес, при Универзитетот „Св. Климент Охридски“ – Битола, Република Северна Македонија. Карактеризацијата и анализата на примероците беше направена, на Факултетот за производствено инженерство, Оддел за биотехнологија и анализа на храна, Адаптивен акцелератор за системи за храна – Истражувачки центар при Универзитетот за економија и бизнис во Вроцлав, Република Полска, додека квантитативната анализа за содржината на акриламид беше спроведена во Истражувачката лабораторија Interlabo, Варшава, Република Полска. На овој начин беше обезбедена систематска, детална и репрезентативна карактеризација на сите параметри релевантни за процената на функционалните, технолошките, биохемиските и на сензорните својства на лебот со додаток на брашно од тиква (*Cucurbita maxima* Plomo).

#### ➤ АНАЛИЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА СУРОВИНИТЕ

Првата фаза на истражувањето опфати детална анализа на суровините користени при подготовката на експерименталните формулации на леб. Во оваа фаза беа изведени следниве групи на анализи:

1. **Физичко-хемиска карактеризација на брашната**
  - Определување на основните параметри: содржина на влага, протеини, јаглехидрати, масти, пепел и диететски влакна;
  - Гранулометриска анализа (распределба на големината на честичките).
2. **Технолошко-функционалните својства на брашната**
  - Капацитет за апсорпција и за задржување вода и масло (WAC, WHC, OAC);
  - Индекс на апсорпција и растворливост во вода (WAI, WSI);
  - Моќ на набабрување (SP);
  - Хидрофилно/липофилен индекс (HLI).
3. **Реолошки својства**
  - **Својства на вискозност** – определени со Rapid Visco Analyzer (RVA StarchMaster2, Newport Scientific, Sydney, Australia), преку мерење максимална и минимална вискозност, разлика во вискозност и т.н. вискозност „сет-бек“;
  - **Текстура на гел** – анализирана преку текстурален профил (TPA) на гелови добиени од пастата на RVA, со параметри за цврстина, кохезивност, еластичност, жилавост и за стабилност;

- **Вискоеластични карактеристики** – Скенирање фреквенција и амплитуда – изведено со реометар Anton Paar MC102 (Anton Paar, Stuttgart, Germany), при 25 °C и 1 mm растојание помеѓу плочите за да се одредат модул на складирање ( $G'$ , storage modulus) и модул на „загуба“ или вискозност ( $G''$ , loss modulus) во линеарната вискоеластична област;
4. **Параметри на боја** – измерени со колориметар Konica Minolta CR-310 (Ramsey, NJ, USA) поврзан со процесор DP-301, при што беа определени вредностите  $L^*$  (светлина),  $a^*$  (црвенило/зеленило),  $b^*$  (жолтило/синило),  $C^*$  (хрома) и  $h^\circ$  (агол на нијанса).
5. **Биоактивни и антиоксидативни својства**
- Вкупна содржина на полифенолни соединенија (TPC – метод Folin–Ciocalteu);
  - Антиоксидативен капацитет (методи DPPH и ABTS);
  - Редуктивна моќ (метод FRAP);
  - Содржина на редуцирачки шеќери (метод DNS).

Овој експериментален протокол овозможи целосна карактеризација на брашното од пченица, брашното од тиква и на мешавините брашна, со што беа дефинирани нивните технолошки и функционални потенцијали, како и основата за оптимално комбинирање во различни концентрации за подготовка на лебови.

#### ➤ ПОДГОТОВКА, АНАЛИЗА И ЕВАЛУАЦИЈА НА ЛЕБОВИТЕ

Втората фаза од оваа докторска дисертација опфати производство, анализа и детална карактеризација на експерименталните лебови, добиени со замена на пченичното брашно со брашно од тиква (*Cucurbita maxima* Plomo) во концентрации од 5 %, 10 %, 15 % и 20 %, при што лебот со 100 % пченично брашно беше користен како контролен примерок.

Во оваа експериментална фаза, за да се испита влијанието на ферментацискиот процес врз технолошките својства, биохемискиот профил и врз содржината на акриламид, сите предвидени анализи беа спроведени за примероците леб подготвени со две различни времетраења на ферментација – едночасовна и двочасовна (1Н и 2Н).

Дополнително, за да се оценат стабилноста и промените на физичко-хемиските својства при складирање, дел од анализите беа изведени веднаш по печењето (0 ден) и по 7 дена складирање на лебовите на температура од 4 °C.

Попрецизно:

- Технолошките, физичко-хемиските, текстурните и структурните анализи беа спроведени кај примероците добиени со примена на различно време

на ферментација (1Н и 2Н), и тоа по печењето (0 ден) и по 7 дена складирање;

- Додека анализите за антиоксидативниот профил, редуцирачките шеќери (DNS), содржината на акриламид и сензорните анализи беа спроведени кај лебовите со 1-часовна и 2-часовна ферментација на денот на печење на лебот (0 ден).

Експерименталниот дизајн, прикажан подолу, овозможи интегрирана процена на технолошките, структурните, биохемиските и сензорните својства на готовите производи.

**1. Подготовка на лебовите** – процесот на подготовка ги опфати стандардните чекори на месење, ферментација, печење и на ладење. Ферментацијата беше идентификувана како клучен експериментален фактор, со времетраење од 1 час и 2 часа, при константни услови на температура (35 °C) и со релативна влажност (82 %).

Овие услови овозможија систематско испитување на влијанието на времето на ферментација врз развојот на структурата, задржувањето на влага, текстурата, бојата и врз формирањето акриламид во финалните производи.

## **2. Квалитативни карактеристики на лебовите**

Оваа потфаза вклучи анализа на основните физички и технолошки параметри:

- **Загуба на маса при печење и специфичен волумен** – определени преку мерење на масата пред и по печење и 3D волуметриска анализа;
- **Физичко-хемиска карактеризација** – мерење на влажноста, активноста на водата ( $a_w$ ), бојата на кората и внатрешниот дел на лебот, со дополнителна пресметка на индекс на белина (WI) и индекс на потемнување (BI).

Овие параметри беа определени веднаш по печењето (0 ден) и по 7 дена складирање, за да се утврди динамиката на промени во текстурата и во бојата при чување на лебот.

## **3. Анализа на текстура и на структура**

- **Анализа на текстура** – со Texture Profile Analysis (TPA) беа определени цврстината, еластичноста, кохезивноста и цвакливоста на внатрешниот дел на лебот, еден час по печењето и по 7 дена складирање.
- **Определување на порозноста** – преку дигитална обработка на слики со ImageJ, со што квантитативно беа проценети воздушната структура и распределбата на алвеолите.

Овие анализи овозможија поврзување на структурните параметри со технолошките индикатори (специфичен волумен и ферментација).

#### 4. Биохемиски и антиоксидативни анализи

Подготвени беа етанолни и водни екстракти од кората и од внатрешниот дел на лебовите со 1-часовна и 2-часовна ферментација, врз кои беа изведени следниве анализи:

- Вкупна содржина на полифенолни соединенија (TPC);
- Антиоксидативен капацитет (DPPH и ABTS);
- Редуктивна моќ (FRAP);
- Содржина на редуцирачки шеќери (метод DNS).

Овие анализи беа изведени само кај свежите лебови (0 ден), за да се испита ефектот на времетраењето на ферментацијата (1Н и 2Н) врз антиоксидативниот потенцијал.

**5. Анализа на акриламид** – содржината на акриламид беше определена со UHPLC–MS/MS, со акцент на квантификацијата во кората и во внатрешниот дел од лебот при различно времетраење на ферментацијата (1Н и 2Н).

Оваа анализа имаше централно значење во ова истражување, бидејќи овозможи разбирање на влијанието на времетраењето на ферментацијата и на составот на брашното врз формирањето акриламид, во контекст на реакциите на Мејлард и во однос на промените во редуцирачките шеќери и аминокиселини.

#### 6. Сензорна анализа

Сензорната евалуација беше спроведена со обучен панел од 10 оценувачи, кои ги оценуваа волуменот, надворешниот изглед, изгледот на внатрешниот дел, аромата на кората и внатрешниот дел и вкусот на кората и внатрешниот дел на примероците лебови според методот на Калуѓерски и Филиповиќ (Kaluderski & Filipović, 1998). Секоја сесија опфати примероци со 1Н и со 2Н ферментација, а оценувањето беше извршено веднаш по печењето.

#### 7. Статистичка евалуација

Податоците добиени од двете истражувачки фази беа подложени на еднофакторна и на двофакторна анализа на варијанса (ANOVA), при што беа разгледани следниве фактори:

- процент на замена со брашно од тиква (%),
- времетраење на ферментација (1Н и 2Н),
- и, каде што беше применливо, период на складирање, односно стареење на лебот (0 и 7 дена).
- Тестовите за значајност пост-хок беа изведени со Tukey HSD при ниво на значајност  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  за да се утврдат статистички релевантните разлики меѓу примероците.

Резултатите се прикажани како средни вредности  $\pm$  стандардна девијација, а сите анализи беа спроведени во три или во повеќе повторувања, зависно од природата на методот (физички, хемиски или сензорен тест).

Овој статистички пристап овозможи да се идентификуваат критичните фактори што значително влијаат врз функционалниот и врз сензорниот квалитет на лебовите, како и да се воспостават научно засновани корелации меѓу технолошко-функционалните својства на брашното, биохемиските параметри и термичките процеси кои водат до формирање акриламид.

Со спроведувањето на втората експериментална фаза беше овозможена целосна процена на технолошките, биохемиските и на безбедносните аспекти на лебовите, произведени со различни нивоа на брашно од тиква и времетраења на ферментација.

Преку интеграција на резултатите од анализите на квалитет, структура, антиоксидативен потенцијал и на акриламид, оваа фаза овозможи да се идентификува заедната поврзаност меѓу составот, процесните услови и финалниот квалитет на производот, создавајќи научно заснована основа за примената на брашното од тиква како функционален и нутритивно збогатувачки додаток во технологијата на производство на леб.

### 3.1 АНАЛИЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА СУРОВИНИТЕ

#### 3.1.1 Суровини

Во рамките на оваа докторска дисертација како основна суровина беше употребено меко пченично брашно од тип Т 750 (контрола), во понатамошниот текст означено како **SWF** (анг. soft wheat flour), произведено со мелење на селектирана пченица наменета за подготовка на леб во мелницата *Stoislaw* (Полска).

Дополнително, беше употребено брашно од тиква *Cucurbita maxima* Plomo, во понатамошниот текст означено како **PF** (анг. pumpkin flour), кое беше избрано поради неговата богата нутритивна вредност, како и поради структурните и функционалните својства погодни за формирање и за стабилизација на тесто.

#### 3.1.2 Подготовка на мешавини од брашно

Брашното од тиква (*Cucurbita maxima* Plomo), применето како суровина во ова истражување беше произведено од плодови тиква одгледани во селото Камењане, Република Северна Македонија. Брашното беше произведено во лабораториски услови. По отстранување на дршката, кората и на семките, внатрешниот месест дел од тиквата беше обработен со сечење на тенки парчиња, по што дополнително беше ситно изрендан. Подготвениот материјал беше сушен во лабораториска печка *NANO (HENDI 227077, Rhenen, The Netherlands)* при контролирана температура од  $45 \pm 2$  °C и со релативна влажност од 60–65 % (слика бр. 6).



Слика бр. 6: Подготовка на суровината („брашно“ од тиква)

Процесот на сушење траеше  $24 \pm 2$  часа, сè до постигнување на крајна содржина на влага пониска од 10 %. По сушењето, материјалот беше измелен со лабораториска мелница ИКА А11, а добиеното брашно беше складирано во херметички затворени стерилни садови за да се минимизира повторната апсорпција на влага и да се зачува стабилноста на хранливите и на биоактивните компоненти.

Подготовката на мешавините од пченично брашно/брашно од тиква се изведе со ротирачки барабански миксер (*TM100, Vevor, Guangzhou, China*) кој овозможува промена на насоката на ротација. Процесот на мешање траеше 10 минути за да се обезбеди целосна хомогенизација на компонентите. Подготвените формулации опфаќаа пет варијанти на состав: 5 %, 10 %, 15 % и 20 % брашно од тиква (PF) во комбинација со 95 %, 90 %, 85 % и 80 % меко пченично брашно (SWF), соодветно. Дополнително, за аналитичките испитувања беа користени и примероците: 100 % брашно од тиква (PF) и 100 % меко пченично брашно (SWF), како контролен примерок.

### 3.1.3 Физичко-хемиските карактеристики на брашното

#### 3.1.3.1 Хемиски состав на брашно

Во брашното од тиква (PF) беше определен проксиматниот (хемиски) состав преку анализа на влага, масти, протеини, јаглехидрати, вкупни диететски влакна (растворливи и нерастворливи) и на пепел. Содржината на влага беше определена кај сите примероци, односно кај мекото пченично брашно (SWF), брашното од тиква (PF) и кај сите нивни мешавини, со примена на методот ААСС 44-19.01 (2011), со инструмент за анализа на влага Sartorius MA-30, согласно со упатството на производителот, а резултатот беше изразен во %.

Другите параметри – масти, протеини, пепел, вкупни диететски влакна (вклучувајќи растворливи и нерастворливи фракции) и јаглехидрати – беа определени за брашното од тиква (PF). Притоа, мастите беа определени со Сокслет-екстракција според АОАС 920.39 / 930.09, протеините со методот на Кјелдахл (вкупен азот и пресметка на суров протеин со соодветен конверзиски фактор, англ. Protein in grains – Kjeldahl method), според АОАС Official Method 979.09, пепел според АОАС Method 923.03: (англ. Ash of Flour — Direct Method), вкупните диететски влакна, растворливите и нерастворливите фракции, со ензимско-гравиметриски метод АОАС Official Method 2022.01, додека

јаглехидратите беа пресметани по разлика (анг. Carbohydrates by difference) согласно АОАС Method *Carbohydrates (by difference)*.

### 3.1.3.2 Гранулометриски карактеристики на брашното од пченица и на брашното од тиква

Гранулометриските карактеристики на примероците од пченично и од брашно од тиква беа определени со примена на методот ААСС 55-60.01 (2011), предложен од Чачак-Пјетшак и соработниците (Сасак-Пјетрзак et al., 2024), со одредени модификации во согласност со условите на ова истражување. Анализата беше спроведена со апарат за гранулометриска распределба на брашно LPzE-2e MultiserW Morek, опремен со сет на аналитички сита со големина на отвори во опсег од  $\varnothing$  200 mm до  $\varnothing$  0,080 mm (слика бр. 7).



Слика бр. 7: Апарат за определување гранулометриски состав на брашното LPzE-2e MultiserW Morek

Методологијата се состоеше од внимателно претходно мерење на определена маса брашно (50 g), која потоа беше поставена во горното сито. Системот на сита беше подложен на стандардизиран механички вибрациски процес со времетраење од 10 минути, при што честичките се раздвојуваа по големина низ сите нивоа на сита. По завршувањето на процесот, секое сито беше внимателно измерено за да се определи масата на задржаните честички. Податоците од мерењата беа обработени за да се пресмета процентуалната распределба на честичките по гранулометриски класи. Дополнително, беа изведени и пресметки за средна големина на честички, коефициент на униформност и за индекс на дистрибуција за да се добие целосна слика за гранулометриската структура на брашното. Овој пристап овозможи објективно споредување на физичките својства на пченичното брашно и на брашното од тиква, кои претставуваат клучен фактор за реолошките карактеристики на тестото и за квалитетот на финалниот производ.

### 3.1.4 Технолошко-функционални својства на контролното и на композитните брашна

#### 3.1.4.1 Капацитет за задржување вода (Water Holding Capacity – WHC)

Капацитетот за задржување вода (WHC) претставува еден од клучните технолошко-функционални параметри за процена на технолошките својства на брашната и на финалните производи. Тој се дефинира како количината вода што може да ја задржи примерокот во својата матрица по изложување на надворешни услови. Според Фернандес Пелаес и соработниците (Fernández Peláez et al., 2021), WHC ја опишува способноста на хранливата матрица да врзе и да задржи вода, додека, според Карпентиери и соработниците (Carpentieri et al., 2024), овој параметар конкретно го одразува степенот на апсорпција и на задржување вода во услови кога гравитацијата е единствената сила што делува врз системот.

Овој параметар особено е значаен при карактеризација на технолошко-функционалните својства на брашната, бидејќи директно влијае врз реолошките својства на тестото, квалитетот на ферментацијата и развојот на структурата, како и врз текстурата и сочноста на финалниот производ. Високиот WHC најчесто укажува на поголема содржина на растворливи и нерастворливи влакна или на присуство на структурни компоненти со висок капацитет за хидратација, додека пониските вредности одразуваат ограничена интеракција со водата и потенцијално послаби технолошки карактеристики. Во случај на функционални брашна, како што е брашното од тиква, овој параметар обезбедува значајни информации за да придонесе нивниот потенцијал кон подобрување на нутритивните и на технолошките својства на лебот. Во ова истражување, WHC беше определен според методологијата на Карпентиери и соработниците (Carpentieri et al., 2024), со одредени модификации приспособени на анализираните примероци. Конкретно,  $0,5 \pm 0,005$  g од примерокот ( $W_s$ ) беа ставени во епрувети и надлеани со 10 mL дестилирана вода. Примероците беа оставени да се хидрираат во текот на 24 часа при собна температура за да се обезбеди целосна и рамномерна хидратација на достапните хидрофилни места во матрицата на брашното. По завршувањето на периодот на хидратација, неапсорбираната вода внимателно беше отстранета, а потоа се мереше масата на хидрираниот примерок ( $W_{hs}$ ).

Капацитетот за задржување вода (WHC) е одреден како g вода/g сува маса (CM) и беше пресметан според следнава формула:

$$WHC = \frac{W_{hs}}{W_s} \quad (1)$$

каде што:

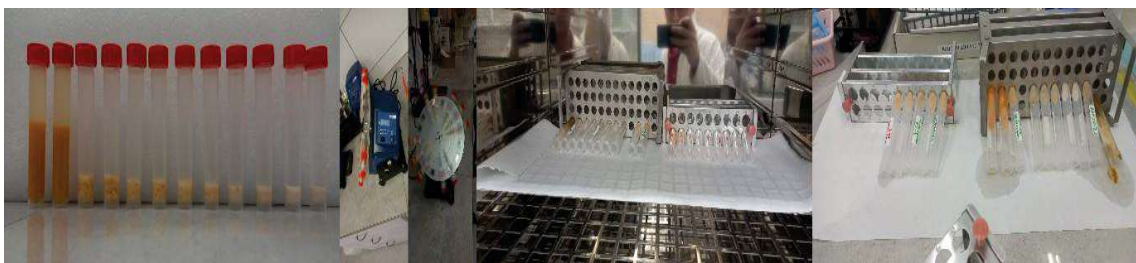
$W_{hs}$  – маса на хидрираниот примерок (g),

$W_s$  – маса на сувиот примерок (g).

За да се обезбедат точност и репродуктивност на резултатите, анализата за секој примерок беше изведена во три паралелни проби, а резултатите беа изразени на грам сува материја (CM). На овој начин, добиените податоци овозможуваат квантитативна процена на хидратациската способност на различните формулации со пченично и со брашно од тиква, при што WHC се разгледува како индикатор за квалитет, функционална применливост и за потенцијална додадена вредност во технологијата на производство на леб.

### 3.1.4.2 Својствата на желатинирање; Индекс на апсорпција на вода (WAI), индекс на растворливост во вода (WSI) и моќ на набабрување (SP)

Својствата на желатинирање и на формирање гел на брашното беа проценети преку три технолошки-функционални индикатори: индексот на апсорпција на вода (WAI), индексот на растворливост во вода (WSI) и моќта за набабрување (SP). Овие параметри се од суштинско значење за карактеризација на функционалното однесување на брашната, бидејќи ја опишуваат способноста на скробот и на протеините да врзат вода, да ја задржат во матрицата, како и да се раствораат или да се ослободуваат во водна средина за време на процесите на загревање и ладење. Методологијата за нивно определување беше адаптирана врз основа на пристапите на Карпентиери и соработниците (Carpentieri et al., 2024) и Недвиha и Харасим (Nedviha & Harasym, 2024), со соодветни модификации (слика бр. 8).



Слика бр. 8: Приказ од постапките при определување на технолошко-функционалните својства (WHC, WAI, WSI, SP, WAC, OAC и HLI) на брашното (од пченица и од тиква)

Индексот на апсорпција на вода (анг. WAI - Water Absorption Index) претставува показател за степенот на желатинизација и за способноста на примерокот да апсорбира и да задржува вода во циклусот на загревање и на ладење. Високи вредности на WAI укажуваат на поинтензивно набабрување на скробните гранули и на поголема способност на матрицата да ја интегрира водата, што може да влијае директно врз реолошките својства на тестото и на текстурата на готовите производи (Harasym et al., 2020).

Индексот на растворливост во вода (анг. WSI - Water Solubility Index) ја одразува количината на растворливи соединенија што се ослободуваат од гелот во присуство на вишок вода. Овој параметар е индикатор за степенот на деградација или на деструктурирање на скробните гранули и на протеинската матрица за време на

обработката. Поголемата растворливост е поврзана со ослободување нискомолекуларни соединенија (како декстрини или растворливи протеински фракции), што, пак, влијае врз вкусот, аромата и врз стабилноста на крајниот производ (Harasym et al., 2020).

Моќта на набабрување (анг. SP - Swelling Power), односно моќта за набабрување, го опишува капацитетот на брашното да апсорбира вода и при тоа значително да го зголеми својот волумен. Овој параметар тесно е поврзан со структурата на скробните гранули и со присуството на влакна во матрицата, а има големо значење за текстурата, мекоста и засочноста на готовите производи (Harasym et al., 2020).

Методолошки, за анализата беа користени  $0,5 \pm 0,005$  g од примерокот ( $W_s$ ) суспендирани во 15 mL дестилирана вода во епрувети ( $W_t$ ). Епруветите беа загревани во водена бања (*MLL147, AJL Electronics, Kraków, Poland*) на  $90$  °C 10 минути, а потоа оладени до амбиентална температура. Потоа беа подложени на центрифугирање за време од 10 минути при  $3000 \times g$ . Содржината на сувиот материјал ( $W_{ss}$ ) беше определена со мерење на самиот седимент ( $W_{ws}$ ), додека супернатантот беше истурен во челична Петри-шолја ( $W_{pd}$ ) која претходно беше измерена, а потоа сушена во лабораториска печка (*SML, Zalmed, Łomianki, Poland*) на  $110$  °C во текот на 24 часа.

Врз основа на овие мерења, вредностите на WAI и на SP кои се одредени како g вода/g CM и на WSI g вода/100 g CM, беа пресметани според следниве формули:

$$WAI = \frac{W_{ws} - W_t}{W_s} \quad (2)$$

$$WSI = \frac{W_{ss} - W_{pd}}{W_s} \times 100 \quad (3)$$

$$SP = \frac{W_{ws} - W_t}{W_s} \times (W_{ss} - W_{pd}) \quad (4)$$

каде што:

- $W_s$  – маса на сувиот примерок (g),
- $W_t$  – маса на празната епрувета (g),
- $W_{ws}$  – маса на седиментот (g),
- $W_{ss}$  – маса на сувиот материјал (g),
- $W_{pd}$  – маса на челична Петри-шолја (g).

Секоја анализа беше изведена со три паралелни проби за да се обезбедат статистичка валидност и репродуктивност на резултатите, кои беа изразени на грам сува материја (CM), односно 100 грама сува материја (CM). На тој начин, методологијата обезбеди квантитативна процена на желатинирачките својства на брашната и споредба помеѓу различните формулации со пченично брашно и со брашно од тиква. Овие параметри, разгледувани заедно, претставуваат индикатори за квалитетот,

функционалноста и за применливоста на брашната во технологијата на производство на леб.

### 3.1.4.3 Капацитет за апсорпција на вода (WAC), на масло (OAC) и хидрофилно/липофилен индекс (HLI)

Технолошко-функционалните својства на брашното дополнително беа карактеризирани преку капацитетот за апсорпција на вода (WAC), капацитетот за апсорпција на масло (OAC) и хидрофилно/липофилниот индекс (HLI). Овие параметри се од суштинско значење за процена на технолошката применливост на брашната, бидејќи обезбедуваат информации за нивната способност да врзат и да задржат течности, како и за рамнотежата меѓу хидрофилните и липофилните својства на матрицата. Методологијата беше адаптирана од Карпентиери и соработниците (Carpentieri et al., 2024) со одредени модификации, приспособени на природата на примероците во ова истражување.

**Капацитетот за апсорпција на вода (WAC)** ја опишува способноста на брашното да апсорбира и да задржува вода при примена на механички сили како мешање и центрифугирање. Високи вредности на WAC укажуваат на матрица со висока хидратациска способност, што е клучно за развојот на структурата на тестото, неговата вискозност, стабилност и за текстурата и мекоста на готовиот леб (Duarte et al., 2024).

**Капацитетот за апсорпција на масло (OAC)** ја одразува способноста на брашното да врзе липиди, со што се откриваат степенот на хидрофобни интеракции во матрицата и поврзаноста на протеинските фракции со маслените компоненти. Овој параметар е значаен за задржување на маснотиите и за аромата во тестото, а влијае и врз сочноста и стабилноста на производите за време на печењето и на складирањето (Duarte et al., 2024).

**Хидрофилно/липофилниот индекс (HLI)** претставува однос помеѓу водоврзувачката и масловрзувачката способност на брашното. Овој интегрален показател обезбедува квантитативна процена на рамнотежата меѓу хидрофилните и липофилните својства на матрицата и е индикатор за тоа во какви хранливи системи брашното може најдобро да се примени – било во системи со висок удел на вода или, пак, во формулации со поголем удел на липиди (Lawrence et al., 2025).

За одредување на WAC и на OAC, во епрувети (Wt) беа додадени  $0,5 \pm 0,005$  g од примерокот (Ws) со 15 mL дестилирана вода (за WAC) или 15 mL масло (за OAC). Примероците беа изложени на вортексирање во траење од 30 секунди (Vortex 06-MX-S, Stargard, Poland), по што беа оставени да мируваат 10 минути; процесот беше повторен за да се обезбеди рамномерна дисперзија. Потоа, епруветите беа подложени на центрифугирање 25 минути при  $3000 \times g$  (MPW-350, MPW, Warsaw, Poland). По отстранување на супернатантот, епруветите повторно беа измерени (Wts), а преостанатата течност беше сушена во лабораториска печка (Vindon Scientific, Rochdale, UK) на  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  во траење од 25 минути.

Врз основа на овие мерења, вредностите на WAC, OAC и на HLI се одредени како g вода/g сува маса (g of water/g of dry matter) и беа пресметани според следниве формули:

$$WAC/OAC = \frac{W_{ts} - W_t}{W_s} \quad (5)$$

$$HLI = \frac{WAC}{OAC} \quad (6)$$

каде што:

$W_{ts}$  – маса на епруветата по отстранување на супернатантот (g),

$W_t$  – маса на празната епрувета (g),

$W_s$  – маса на сувиот примерок (g).

Секоја анализа беше изведена со три паралелни проби за да се обезбедат статистичка валидност и репродуктивност на резултатите, кои беа изразени на грам сува материја (CM). Овој пристап овозможи не само да се процени водоврзувачката и масловрзувачката способност на различните брашна, туку и да се добие поширок увид во нивната функционалност и потенцијалната применливост во технологијата на лебопроизводството.

### 3.1.5 Определување на реолошки карактеристики

#### 3.1.5.1 Карактеристики на брашното за формирање паста – RVA (Rapid Visco Analyzer)

Вискозните својства на подготвените мешавини беа испитани со употреба на инструмент (Rapid Visco Analyzer, RVA) StarchMaster2 (Newport Scientific, Сиднеј, Австралија), кој претставува стандардно користен инструмент за проучување на својствата на брашна и на скробни системи за формирање паста. Овој уред овозможува прецизна симулација на условите на загревање и на ладење, при што се следат и однесувањето на скробните гранули и нивните трансформации во зависност од применетата температура и од присуството на вода.

За секој примерок, во специјалниот контејнер на уредот беа префрлени 2,5 g од мешавината брашно (коригирани на база на 14 % влага), а другиот дел до вкупна маса од 28,5 g беше дополнет со дестилирана вода, која служеше како растворувач и овозможуваше хидратација на скробните и на протеинските компоненти.

Температурниот профил применет за сите примероци беше стандарден за ваков тип анализи и вклучуваше неколку фази:

- Одржување на 50 °C за 2 минути – иницијална стабилизација и хидратација на скробните гранули.
- Загревање од 50 °C до 95 °C со брзина од 5 °C/min – фаза во која започнуваат желатинизацијата и набабрувањето на скробните гранули, што води до зголемување на вискозноста.

- Задржување на 95 °C за 5 минути – период на максимално желатинизирање и на евентуална деструкција на гранулите, со можност за ослободување амилоза во растворот.
- Ладење до 50 °C со брзина од 5 °C/min – фаза на ретроградација, во која се формираат нови водородни врски и се врши делумна реорганизација на амилозата и амилопектинските структури.
- Одржување на 50 °C за 4 минути – стабилизирачка фаза, каде што се оценуваат крајната вискозност и стабилноста на формируваниот гел.

Примарните параметри на вискозност што беа измерени со RVA опфаќаа:

- Максимална вискозност (Peak Viscosity) – максималната вредност на вискозност што се постигнува за време на загревањето, која ја одразува способноста на скробот да набабри и да формира вискозна суспензија.
- Минимална вискозност (Trough Viscosity) – најниската вредност постигната за време на задржувањето на висока температура, која укажува на стабилноста на пастата при термички стрес.
- Крајна вискозност (Final Viscosity) – вискозноста измерена на крајот на циклусот на ладење, која ја одразува способноста на скробот и на протеините да се реорганизираат и да формираат стабилен гел.
- Разлика во вискозност (Breakdown Viscosity) – разликата меѓу максималната и минималната вискозност, која укажува на термичката и на механичката стабилност на пастата.
- Сет-бек вискозност (Setback Viscosity) – разликата меѓу крајната и минималната вискозност, која ги одразува степенот на ретроградација и тенденцијата на гелираните компоненти да се реорганизираат при ладење.

Со ваквиот пристап се овозможува целосна процена на реолошките својства на брашната и на нивната функционална применливост во процесот на производство на леб.

Секоја анализа беше изведена со три паралелни примероци за да се обезбедат статистичка валидност и репродуктивност на резултатите.

### 3.1.5.2 Текстура на гел

Геловите беа формираны од пастата добиена согласно со постапката опишана во точката 3.1.5, која служеше како основа за нивното создавање и како структурна стабилизација. Свежо подготвената паста внимателно беше префрлена во цилиндрични калапи со дијаметар од 20 mm за да се обезбедат стандардизиран облик и волумен на примероците. Потоа, калапите со пастата беа оставени да се стабилизираат при температура од 4 °C во текот на 24 часа, што овозможи структурирање на геловите преку формирање стабилна мрежа на скробни и на протеински молекули.

По завршувањето на фазата на стабилизација, геловите внимателно беа извадени од калапите и приспособени на унифицирана висина од 20 mm за да се обезбеди конзистентност при механичките мерења. Подготвените гелови беа подложени на

анализа за определување на нивниот текстурен профил (TPA – Texture Profile Analysis) со помош на анализатор за текстура FC200STAV500/300 (AXIS, Гдањск, Полска). Овој метод овозможува определување клучни параметри како што се цврстина, кохезивност, еластичност, жилавост и стабилност, кои се фундаментални индикатори за механичките и за сензорните својства на геловите.

Податоците од тестирањето беа собрани и беа обработени со помош на софтверот AXIS FM v.2\_18, кој овозможува прецизна дигитална анализа на кривите добиени при компресија на примероците. За секој гел беа изведени шест репликати за да се минимизира варијабилноста и да се обезбедат статистичка сигурност и репродуктивност на резултатите.

### 3.1.5.3 Вискоеластични карактеристики

Примероците за испитување на реолошките својства беа подготвени согласно со постапката опишана во точката 3.1.5. Накусо, по завршувањето на термичкиот циклус на загревање и на ладење, добиената паста беше распределена во пластични контејнери со волумен од 3 mL. По период на мирување од 10 минути, примероците внимателно беа пренесени и поставени на мерната плоча на реометарот. За мерењето беше применета паралелна геометрија на плоча со дијаметар од 40 mm, со назабени челични површини, поставена на растојание од 1 mm за да се минимизира лизгањето на примерокот и да се обезбеди точна регистрација на однесувањето на пастата. Температурата беше одржувана на 25 °C со прецизна регулација преку термички контролер *KNX2002*.

Динамичките осцилаторни тестови на мешавините беа спроведени со помош на реометар Anton Paar MC102 (Anton Paar, Штутгарт, Германија). Фреквентното скенирање се изведуваше во опсег од 10 Hz до 1 Hz, во рамките на линеарната вискоеластична област (LVE), при константен напрегање од 1 Pa. Овој протокол овозможи карактеризација на вискоеластичното однесување на примероците без предизвикување на структурни оштетувања.

Вискоеластичните параметри беа оценети преку:

- **модул на „акумулирање“ или еластичност ( $G'$ , storage modulus)** – кој ја одразува еластичната компонента, односно количината на енергија што материјалот ја акумулира за време на деформацијата,
- **модул на „загуба“ или вискозност ( $G''$ , loss modulus)** – кој ја одразува вискозната компонента, односно количината на енергија што материјалот ја дисипира (губи) во форма на топлина.

Односот меѓу  $G'$  и  $G''$  служи како индикатор за доминацијата на еластичните или на вискозните својства на примерокот, што е клучно за разбирање на структурната стабилност и на функционалните карактеристики на мешавините. За да се обезбедат статистичка сигурност и репродуктивност на добиените резултати, секоја анализа беше изведена во шест паралелни повторувања за секој примерок.

### 3.1.6 Параметри на боја

За карактеризација на колориметриските својства на примероците беше користен колориметар Konica Minolta CR-310 (Рамзи, Њу Џерси, САД), кој преку сериски интерфејс RS232 беше поврзан со процесорот за податоци DP-301. Оваа конфигурација овозможи директен пренос и дигитална обработка на измерените вредности, со што се минимизираа можните грешки при рачна регистрација на податоците.

За анализа на грануларни примероци беше применет специјализираниот додаток CR-A50, кој овозможува оптимално позиционирање и репрезентативно мерење на бојата кај материјали со нерамномерна површина и со различна гранулација.

За да се обезбеди висока точност, репродуктивност и статистичка сигурност на добиените податоци, секој примерок беше подложен на осум последователни мерења, а од добиените резултати беше пресметана средна вредност за примерокот.

Анализата опфати повеќе параметри кои се дел од колориметрскиот систем CIELAB, вклучувајќи:

- $L^*$  – параметар што ја опишува светлината на примерокот, од 0 (црно) до 100 (бело);
- $a^*$  – оска што претставува градација помеѓу зелена (-) и црвена (+);
- $b^*$  – оска што претставува градација помеѓу сина (-) и жолта (+);
- $C^*$  (chroma) – индикатор за заситеност или за интензитет на бојата;
- $h^\circ$  (hue angle) – агол на нијанса кој ја дефинира доминантната боја во просторот.

Со ваквата анализа не само што се обезбедува квантитативна оценка на бојата, туку и се добиваат индикатори за степенот на хемиските трансформации што се одвиваат за време на печењето, што е од суштинско значење за разбирање на врската меѓу технологијата на процесирање, составот на брашното (пченица/тиква) и финалниот квалитет на производот.

### 3.1.7 Подготовка на екстракти и анализа на антиоксидативниот профил и на содржината на редуцирачки шеќери во брашната

Од секој примерок (контрола – SWF, брашно од тиква – PF, како и формулации со 5 %, 10 %, 15 % и 20 % брашно од тиква) беа земени по  $1 \pm 0,0001$  g. Екстракцијата беше спроведена со 10 mL екстракциски средства. Беа подготвени алкохолни и водни екстракти од примероците. При подготовка на алкохолните екстракти во улога на екстракциски средства беше користен 80% етанол (етанол:вода = 80:20, v/v), а за подготовка на водните екстракти – дестилирана вода. Различните екстракциски системи беа применети за да се овозможи екстракција на широк спектар биоактивни соединенија со различна поларност. Процесот на екстракција траеше 1 час, при што беше користена радијална мешалка (MX-RD PRO, ChemLand, Stargard, Полска) со режим на работа од 60 вртежи во минута, за да се овозможат константно движење и ефикасен контакт меѓу матрицата на брашното и растворувачот.

По завршувањето на екстракцијата, суспензиите беа подложени на центрифугирање во MPW-350 (MPW, Варшава, Полска) при брзина од 10 000 rpm за 15

минути. Со оваа постапка се овозможи ефикасно одвојување на течната и на цврстата фаза, при што супернатантот беше искористен како примарен екстракт за понатамошни аналитички испитувања.

Добиените екстракти беа анализирани за присуство и концентрација на клучни биоактивни соединенија и за антиоксидативни параметри, вклучувајќи:

**Вкупна содржина на полифенолни соединенија (TPC)** – индикатор за антиоксидативен потенцијал и за фитохемиски профил;

**Редуктивен антиоксидативен потенцијал (FRAP)** – параметар кој ја оценува способноста на екстрактите да редуцираат железни јони, одразувајќи го нивниот капацитет за електронско донирање;

**Вкупен антиоксидативен капацитет (DPPH и ABTS)** – тестови засновани на неутрализација на слободни радикали за да се прикаже ефективноста на екстрактите во спречување оксидативни процеси;

**Содржина на редуцирачки шеќери (метод DNS)** – параметар кој ја одразува количината на шеќери со способност за редукција, значајни за нутритивните и за функционалните својства на производите.

За секој примерок беа подготвени екстракти во дупликат за да се обезбедат висока точност, повторливост и статистичка валидност на резултатите.

### 3.1.7.1 Определување на вкупната содржина на полифенолни соединенија

За квантификација на вкупната содржина на фенолни соединенија во примероците беше користен реагенсот Folin–Ciocalteu, според методологијата на Јен и Чен (Yen & Chen, 1995), со одредени модификации приспособени на целите на ова истражување. Анализата беше спроведена со примена на спектрофотометар (SEMCO, S91 E, Gdynia, Poland).

Во реакциската смеса беа додадени 1,58 mL дестилирана вода и 0,1 mL реагенс Folin–Ciocalteu кон 0,02 mL од екстрактот, по што смесата беше оставена да инкубира 5 минути за да започне реакцијата. Потоа, се додаваше 0,3 mL раствор на натриум карбонат ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), со што се иницираше развивањето на карактеристичната сина боја, резултат на редукција на фосфомолибденовите и на фосфоволфрамовите комплекси во присуство на полифеноли.

Реакциската смеса беше подложена на инкубација од 20 минути на температура од 38 °C, во темни услови, за да се спречи деградација на чувствителните соединенија. По завршување на инкубацијата, апсорбанцата на примероците беше измерена на бранова должина од 765 nm, што претставува максимум на апсорпција на формираниот комплекс. За пресметка на концентрацијата на фенолните соединенија беше користена стандардна крива со гална киселина, а резултатите беа изразени како милиграми еквивалент на гална киселина на грам сува материја (mg GAE/g CM).

Секоја анализа беше изведена во дупликат за да се обезбедат точност, прецизност и репродуктивност на добиените резултати. На овој начин, методологијата овозможи

сигурна процена на полифенолниот профил и антиоксидативниот потенцијал на испитуваните примероци.

### **3.1.7.2 Определување на антиоксидативниот потенцијал на брашната**

#### **3.1.7.2.1 Метод DPPH**

Антиоксидативниот капацитет на примероците, во однос на стабилноста и неутрализацијата на 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикалот (DPPH), беше определен со примена на спектрофотометриски метод (SEMCO, S91 E, Gdynia, Полска), според методологијата на Клименко и соработниците (Klymenko et al., 2019), со мали приспособувања.

За подготовка на реакциската смеса, беа комбинирани 1 mL метанолен раствор на DPPH (0,1 mM) со 0,035 mL екстракт од испитуваниот примерок. По интензивно мешање, смесата се инкубираше 20 минути на темно, на собна температура, за да се овозможи целосна интеракција помеѓу антиоксидантите присутни во екстрактот и стабилниот слободен радикал DPPH.

Механизмот на овој тест се заснова на редукција на виолетовата боја на растворот на DPPH, при што антиоксидативните соединенија во примерокот донираат електрони или водородни атоми и го неутрализираат радикалот. Како резултат на тоа, се формира жолта боја со намалена апсорпција на карактеристичната бранова должина од 517 nm, што беше регистрирана со спектрофотометар.

Секоја анализа беше изведена во дупликат за да се обезбедат точност, прецизност и репродуктивност на добиените резултати. Резултатите од мерењата беа изразени како милиграми Trolox еквивалент на грам сува материја (mg TE/g CM), односно Trolox (водорастворлив аналог на витамин E) беше користен како стандард за калибрација. Со ова се овозможи квантификација на антиоксидативниот капацитет на различните формулации на брашно, што е клучен индикатор за нивната функционална вредност и за нивниот потенцијал за превенција на оксидативни процеси во хранливи системи.

#### **3.1.7.2.2 Метод ABTS**

Антирадикалниот потенцијал на испитуваните примероци во однос на катјонскиот радикал 2,2-азо-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS<sup>•+</sup>) беше определен со примена на спектрофотометриски метод (SEMCO, S91 E, Gdynia, Полска), според методологијата на Шридхар и Чарлс (Sridhar & Charles, 2019), со мали приспособувања.

Раствор од калиум персулфат беше употребен за генерирање на радикалот ABTS<sup>•+</sup>, по што добиениот раствор беше инкубиран на темно, на собна температура (23 °C) во период од 16 до 24 часа за да се овозможи целосно формирање и стабилизација на радикалниот вид.

За тестирањето, во 1,0 mL разреден раствор на ABTS<sup>•+</sup> беше додаден 0,02 mL екстракт од испитуваниот примерок. Веднаш по додавањето и по мешањето, смесата

беше оставена да реагира 10 секунди, по што беше измерена апсорбанцата на бранова должина од 734 nm.

Принципот на методот се заснова на тоа што антиоксидативните соединенија во екстрактите донираат електрони или водородни атоми, со што го редуцираат синозелениот катјонски радикал ABTS до безбојна неутрална форма. Намалувањето на апсорбанцата е пропорционално со антирадикалниот капацитет на примерокот.

Секоја анализа беше изведена во дупликат за да се обезбедат точност, прецизност и репродуктивност на добиените резултати.

Резултатите беа изразени како милиграми Trolox еквивалент на грам сува материја (mg TE/g CM). На овој начин беше овозможена директна споредба на антиоксидативниот капацитет меѓу различните формулации на брашна.

### 3.1.7.2.3 Метод FRAP

Редуктивната моќ на примероците, односно нивната способност за редукција на  $Fe^{3+}$  јони до  $Fe^{2+}$ , беше проценета со примена на методот FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), според методологијата на Re и соработниците (Re et al., 1999), со мали приспособувања направени за целите на ова истражување. Анализата беше спроведена со користење спектрофотометар (SEMCO, S91 E, Gdynia, Полска).

За подготовка на реакцискиот систем, беше изготвен FRAP-реагенс составен од: 300  $\mu$ M ацетатен пуфер (pH 3,6), 10  $\mu$ M TPTZ (2,4,6-трипиридил-s-триазин) растворен во 40  $\mu$ M HCl и 20  $\mu$ M  $FeCl_3$ .

При тестирањето, кон екстрактите од мешавините брашно беше додаден 1 mL од FRAP-реагенсот. По мешањето, примероците беа оставени 20 минути на собна температура, за да се овозможи целосна реакција меѓу антиоксидативните соединенија и комплексот  $Fe^{3+}$ -TPTZ. Принципот на методот се заснова на редукцијата на  $Fe^{3+}$ -TPTZ-комплексот во  $Fe^{2+}$ -TPTZ, кој добива интензивна сина боја со максимум апсорпција на бранова должина од 593 nm. Интензитетот на бојата е пропорционален на редуктивниот капацитет на екстрактот.

Секоја анализа беше изведена во дупликат за да се обезбедат точност и сигурност на резултатите. Резултатите беа изразени како еквиваленти на железо (II) сулфат ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) на грам сува материја ( $\mu$ M  $FeSO_4$ /g CM).

Овој метод овозможи квантитативна процена на способноста на примероците да учествуваат во редокс-реакции, што претставува важен индикатор за нивниот антиоксидативен потенцијал и за нивната биолошка вредност.

### 3.1.7.3 Определување на содржината на редуцирачки шеќери

Содржината на редуцирачките шеќери во екстрактите од примероците беше определена преку спектрофотометриски метод (SEMCO, S91 E, Gdynia, Полска), користејќи го принципот на редуктивната способност на шеќерите кон 3,5-динитросалицилна киселина (DNS). Методологијата беше заснована на пристапот

описан од Милер (Miller, 1959), со мали приспособувања направени за целите на ова истражување.

Основата на методот се заснова на тоа што редуцирачките шеќери (на пр. гликоза, фруктоза, малтоза) имаат способност да ја редуцираат DNS-киселината, при што се формира 3-амино-5-нитросалицилна киселина, која се карактеризира со интензивна портокалово-црвена боја. Интензитетот на оваа боја директно е пропорционален на концентрацијата на редуцирачките шеќери во примерокот.

За тестирањето, 1 mL DNS-реагенс беше додаден на 1 mL воден екстракт од примерокот. По мешањето, реакциските смеси беа подложени на загревање во врела вода за 5 минути за да се иницира редуцирачката реакција. По завршување на загревањето, примероците беа оставени да се оладат на собна температура, по што беше измерена нивната апсорбанца на бранова должина од 535 nm.

Секоја анализа беше изведена во дупликат за да се обезбедат прецизност и репродуктивност на добиените резултати.

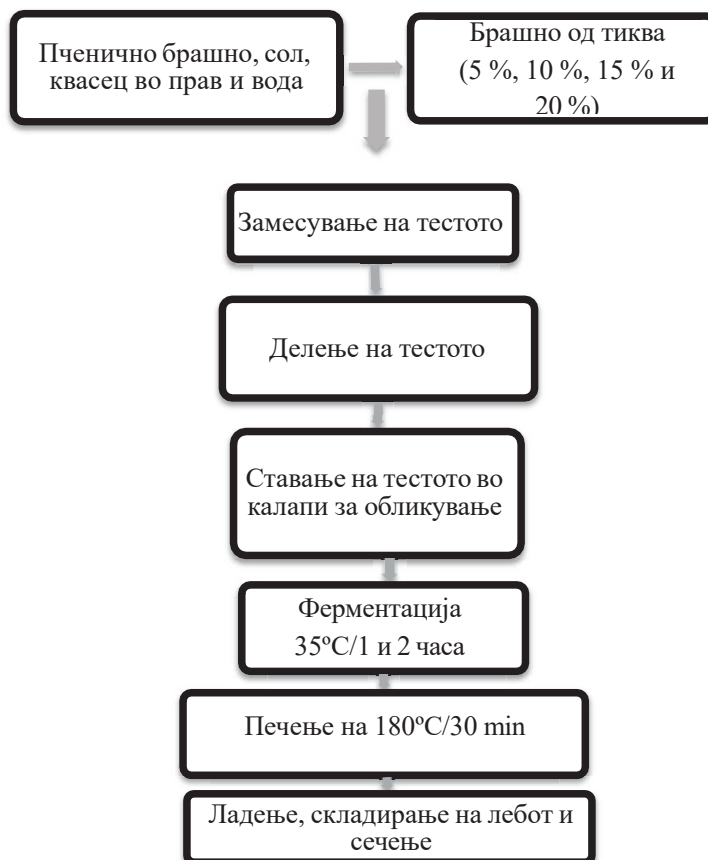
За квантификација беше користена стандардна калибрациска крива со гликоза, а резултатите беа изразени како милиграми еквивалент на гликоза на грам сува материја (mg GE/g CM).

Овој метод претставува сигурен и едноставен пристап за оценување на концентрацијата на редуцирачките шеќери, кои се значаен показател за хранливата вредност, ферментацискиот потенцијал и за можните сензорни промени во производите на база на брашно.

## 3.2 ПОДГОТОВКА, АНАЛИЗА И ЕВАЛУАЦИЈА НА ПРИМЕРОЦИТЕ ЛЕБ

### 3.2.1 Подготовка на леб

Шематски приказ на процесот на подготовка и на печење леб е даден на сликата бр. 9.



Слика бр. 9: Шематски приказ на процесот на производство

За подготовка на тестото беше употребен сув квасец (*Saccharomyces cerevisiae*), произведен во Полска за да се обезбеди стабилна и контролирана ферментациска активност. Во рецептурата беше додадена и сол во стандардна концентрација, која служеше за регулирање на процесот на ферментација и за формирање на карактеристичниот сензорен профил на лебот.

Лебовите беа изработени според стандардизирана рецептура, при што мешавините на брашна претставуваа 100 % од вкупната количина брашно, со додавање 2 % сол, 2 % сув квасец (*Saccharomyces cerevisiae*) и 55 % вода (пресметано врз основа на масата на брашното). Вкупно беа подготвени пет формулации на леб: контролен примерок добиен со 100 % пченично брашно (SWF) и четири примероци на леб со различен сооднос на пченично брашно и брашно од тиква:

- примерок со ознака **5 %** (подготвен од мешавина со сооднос 95:5 (w/w) пченично брашно : брашно од тиква);
- примерок со ознака **10 %** (подготвен од мешавина со сооднос 90:10 (w/w) пченично брашно : брашно од тиква);
- примерок со ознака **15 %** (подготвен од мешавина со сооднос 85:15 (w/w) пченично брашно : брашно од тиква и
- примерок со ознака **20 %** (подготвен од мешавина со сооднос 80:20 (w/w) пченично брашно : брашно од тиква.

Формулациите композитен леб беа развиени врз основа на претходно искуство и на иницијални експериментални тестирања на брашната – од првиот дел на истражувањето. По хомогенизацијата и по месењето на сите состојки во траење од 5 минути со лабораториската машина *SILVER CREST*, од тестото се одвојуваа примероци со маса од 95–100 g, кои беа обликувани и поставени во калапи.

Како клучен експериментален фактор беше воведено времетраењето на ферментацијата, кое изнесуваше 1 час и 2 часа, при константна температура од 35 °C и со релативна влажност од 82 % во инкубаторот *Binder*. Овој параметар беше избран затоа што времетраењето на ферментацијата може значително да влијае врз содржината на акриламид, како и врз други физичко-хемиски и сензорни параметри на финалниот производ.

По завршувањето на ферментацијата, примероците беа печени во лабораториска печка за печење (*HENDI 227077, Rhenen, The Netherlands*) на температура од 180 °C во времетраење од 25 ± 5 минути, по што беа оставени да се ладат во траење од 1 час (слика бр. 10).



Слика бр. 10: Изглед на ферментираниите примероци и на финалните производи

Кај сите добиени примероци (со едночасовна и со двочасовна ферментација) беа анализирани квалитативните карактеристики, антиоксидативната активност, вкупните полифенолни соединенија и содржината на акриламид. Поради тоа, ферментацијата беше идентификувана како еден од клучните независни фактори во оваа докторска дисертација.

Подготвените лебови беа складирани во фрижидер на температура од 4 °C, завиткани во хартија за печење, во траење од 7 дена, при што дел од анализите беа повторени за да се следат промените во текот на складирањето.

Со оваа постапка беа добиени вкупно пет типа леб, секој подготвен во по четири паралелни примероци (репликати), кои беа користени за понатамошни аналитички испитувања.

### 3.2.2 Квалитативни карактеристики на лебовите

#### 3.2.2.1 Загуба на маса при печење и специфичен волумен

Квалитетот на лебот, покрај сензорните и текстуралните параметри, во голема мера зависи и од неговите физички карактеристики – пред сè, загубата на маса при печење (baking loss) и специфичниот волумен (specific volume), кои претставуваат клучни индикатори за технолошката успешност на процесот на ферментација и на печење (Nurgozhina et al., 2022).

Загубата на маса при печење беше определена преку мерење на масата на примероците пред печењето ( $W_s$ ) и по завршување на печењето ( $W_b$ ), при што дополнително беше следена и загубата на маса по складирање од 7 дена ( $W_w$ ). Мерењето на примероците по печењето беше изведено по ладење на собна температура (околу 25 °C) во траење од 1 час за да се постигне стабилизација на влагата и за спречување на испарувањето на преостанатата вода од површината (Bellegia et al., 2023).

Процентот на загуба на маса при печење беше пресметан според формулава:

$$\text{Загуба на маса при печење [\%]} = \frac{W_s - W_{b/w}}{W_s} \times 100 \quad (7)$$

каде што:

$W_s$  – маса на лебот пред печење (g);

$W_{b/w}$  – маса на лебот по печење или по складирање (g).

Овој параметар претставува важен индикатор за испарувањето на водата и за летливите компоненти за време на термичката обработка и е во тесна корелација со составот на брашното, содржината на влакна, нивото на хидратација и со структурата на глутенската мрежа.

**Специфичниот волумен на лебот ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )** претставува однос меѓу волуменот ( $V$ ) и масата ( $W_{b/w}$ ) на испечениот производ и служи како индикатор за неговата аерација и порозност, односно за степенот на задржување на гасовите генерирани за време на ферментацијата и на печењето (Lisovska et al., 2023).

Волуменот на лебовите беше определен еден час по печењето, користејќи 3D скенер Matter and Form v2 (Toronto, ON, Canada), кој овозможува прецизна реконструкција на обликот и волуменот на примерокот со помош на софтверот *Quick Scan*. За секој примерок беа направени три независни мерења, по што беше пресметана средната вредност.

Специфичниот волумен беше пресметан според формулава:

$$\text{Специфичен волумен [cm}^3\text{/g]} = \frac{V}{W_{b/w}} \quad (8)$$

каде што:

$V$  – волумен на лебот ( $\text{cm}^3$ );

$W_{b/w}$  – маса на испечениот леб (g).

Високи вредности на специфичен волумен укажуваат на добро развиена глутенска мрежа и на стабилна структура на внатрешен дел од лебот, додека пониските вредности најчесто се поврзани со поголем удел на неглутенски компоненти (vlakna, пектини, скроб со изменета структура) кои ги намалуваат еластичноста и капацитетот за задржување гас (Lisovska et al., 2023).

Овие два параметра – загубата на маса при печење и специфичниот волумен – меѓусебно се поврзани и во комбинација претставуваат фундаментални показатели за технолошкиот квалитет на лебовите, особено кога се оценува влијанието на функционални брашна како што е брашното од тиква врз крајните својства на производот.

### 3.2.3 Физичко-хемиска карактеризација на лебовите

Физичко-хемиската карактеризација на добиените лебови имаше за цел да обезбеди квантитативна процена на влијанието на составот на брашната и времетраењето на ферментацијата врз основните технолошки параметри на производот, особено оние што се однесуваат на влажноста, активноста на водата и на бојата на кората и внатрешниот дел на лебот.

#### 3.2.3.1 Активност на водата ( $a_w$ )

Активноста на водата ( $a_w$ ) беше определена според методот на Фавето и соработниците (Favetto et al., 1983), со користење на анализаторот AquaLab 3TE (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA), кој овозможува мерење на рамнотежната водна активност на примероците врз основа на принципот на електричен отпор и на температурна стабилизација. За секој примерок беа изведени четири паралелни мерења ( $n = 4$ ), а резултатите се прикажани како средна вредност  $\pm$  стандардна девијација (Nedviha et al., 2025).

Овој параметар претставува клучен индикатор за стабилноста на производот при складирање, бидејќи контролира раст на микроорганизми, ензимска активност и оксидативни процеси. Промените на  $a_w$  беа следени во корелација со процентот на брашно од тиква и со времето на ферментација, бидејќи двата фактора можат да влијаат врз врзувањето на водата во матрицата и врз нејзината достапност за биохемиски реакции.

### 3.2.3.2 Анализа на боја (кора и внатрешен дел)

Бојата на кората и на внатрешниот дел од лебот беше определена со рефлективниот спектрофотометар TS7036 (#nh, Guangdong, China), користејќи го системот на координати CIE Lab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), кој претставува меѓународно стандардизиран модел за колориметриска евалуација (Nedviha et al., 2025).

Мерењата беа изведени на кората и на внатрешниот дел од лебот (во пресек со ширина од 40–45 mm), при што беа определени следниве параметри:

- $L^*$  – светлина (0 = црно, 100 = бело),
- $a^*$  – индекс на боја од зелено (–) кон црвено (+),
- $b^*$  – индекс на боја од сино (–) кон жолто (+).

Врз основа на овие примарни координати, беа пресметани секундарни параметри кои овозможуваат подлабока анализа на визуелните промени:

- **Хрома ( $C^*$ )**, што ја одразува интензивноста на бојата,
- **Агол на нијанса ( $h^\circ$ )**, кој ја определува доминантната боја,
- **Индекс на потемнување (BI)** – показател за степенот на реакциите на Мајард и за карамелизација во кората,
- **Индекс на белина (WI)** – показател за степенот на избеленост на внатрешен дел од лебот.

Сите мерења беа изведени четирипати ( $n = 4$ ), користејќи стандардно осветлување D65 (дневна светлина) и стандардизиран набљудувач под агол од  $2^\circ$ , што обезбедува компатибилност со препораките на CIE за спектрофотометриска анализа.

Пресметките за секундарните индекси на боја беа изведени според следниве формули:

**Индекс на белина (WI)**

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^{*2}) + (b^{*2})} \quad (9)$$

**Индекс на потемнување (BI)**

$$BI = \frac{100x(x-0.31)}{0.172} \quad (10)$$

каде што:

$$x = \frac{(a^* + 1.75L^*)}{(5.645L^* + a^* - 3.012b^*)}$$

Овие формули овозможуваат квантификација на визуелните промени во бојата на лебот што настануваат како резултат на интеракцијата помеѓу шеќерите, аминокиселините и топлинската обработка, особено во контекст на реакциите на Мајард, кои имаат клучна улога во формирањето на карактеристичната кафеаво-златна нијанса на кората.

### 3.2.4 Определување на текстуралниот профил на лебот (Texture Profile Analysis – TPA)

Текстуралните својства на лебот беа оценети со примена на двостепен тест на компресија (Texture Profile Analysis – TPA) за да се утврди влијанието на составот на брашната и условите на складирање врз механичките и врз структурните карактеристики на внатрешниот дел од лебот (Nedviha et al., 2025).

Мерењата беа изведени еден час по завршувањето на печењето и повторно по седум дена складирање за да се процени стабилноста на текстурата во текот на времето. За анализата беше употребен текстурниот анализатор FC20STAV500/500 (AXIS, Гдањск, Полска), кој работи на принцип на двократно компресирање на примерокот со фиксирана брзина и длабочина на деформација, при што првото притискање симулира залак, а второто симулира мастикација (цвакање).

Податоците од мерењата беа обработени со специјализираниот софтвер AXIS FM v.2\_18, во согласност со методологијата опишана од Оленцки и Харасим (Ołędzki & Narasym, 2023).

При анализата беа определени следниве основни параметри на текстурата:

- **Цврстина (Hardness, N):** максималната сила (во њутни) потребна за првото компресирање на примерокот, што претставува индикатор за густината и за отпорот на внатрешниот дел на лебот;
- **Кохезивност (Cohesiveness):** однос меѓу енергијата на второто и на првото компресирање, што ги одразува внатрешната поврзаност и структурниот интегритет на внатрешниот дел;
- **Еластичност (Springiness):** способност на внатрешниот дел да ја поврати својата првична форма по отстранување на деформацијата, што директно е поврзано со реолошките својства на глутенската мрежа;
- **Цвакливост (Chewiness):** индикатор за енергетската потреба при мастикација, изведен од комбинацијата на параметрите цврстина, кохезивност и еластичност.
- **Стабилност (Resilience):** параметар кој ја опишува способноста на внатрешниот дел од лебот да се врати во првобитна состојба веднаш по првото компресирање, односно да ја врати својата структура по краткотрајна деформација. Овој параметар ги одразува еластичната реакција на материјалот и неговата способност да ја задржи првичната конзистентност при надворешно оптоварување.

Секој примерок беше анализиран четирипати ( $n = 4$ ), а резултатите се прикажани како средна вредност  $\pm$  стандардна девијација ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ).

Оваа анализа овозможи квантитативна процена на структурната стабилност на внатрешниот дел од лебот со различни нивоа на замена на пченично брашно со брашно од тиква. Истовремено, резултатите дадоа увид во тоа како влакнестата и полифенолната компонента на брашното од тиква влијаат врз механичката сила, мекоста и врз

свежината на лебот при складирање, што претставува значаен параметар за технолошката и за индустриската применливост на овие формулации.

### 3.2.5 Определување на порозноста на лебот

Порозноста на лебот претставува еден од најзначајните параметри за оцена на неговиот квалитет, бидејќи директно ги одразува структурата на внатрешниот дел, степенот на задржување на гасовите при ферментацијата, како и влијанието на употребеното брашно и на условите на ферментација врз текстурата и врз волуменот на крајниот производ.

Во ова истражување, анализата на порозноста беше изведена според методологијата опишана од авторите Морале и соработниците (Morreale et al., 2018), со одредени модификации.

Еден час по завршувањето на печењето, како и по седум дена складирање, секој леб прецизно беше пресечен на половина по должина за да се обезбеди карактеристичен пресек на внатрешниот дел за визуелна и за дигитална анализа.

Пресеците беа скенирани со рамнениот скенер Lexmark X1250 (Lexington, KY, USA) со висока резолуција, при стандардни параметри на осветлување и на контраст, со што се обезбедија конзистентност и репродуктивност на сликите.

Добиените дигитални слики беа подложени на компјутерска анализа со софтверот ImageJ (National Institutes of Health, USA), според следниов протокол:

1. **Првична дигитална обработка:** од оригиналната RGB-фотографија беше креирана 8-битна слика во сиви нијанси (црно-бели тонови) (8-bit grayscale), за да се елиминираат колориметриските варијации и да се нагласат структурните контури на алвеолите.
2. **Избор на репрезентативна зона:** од централниот дел од лебот беше издвоен дел со димензии  $2 \times 2$  cm, кој претставуваше карактеристичен сегмент за анализа на микроструктурата.
3. **Бинарна обработка:** избраниот сегмент беше претворен во бинарна слика (црно-бела), каде што белите области ја претставуваа воздушната празнина (алвеолите), а црните области ја претставуваа структурата на внатрешниот дел (мрежата на глутен и на скроб).
4. **Квантитативна анализа:** со користење на алатките на ImageJ, беше пресметан процентот на белите површини во однос на вкупната анализирана област, при што овој однос беше интерпретиран како вредност на порозност на лебот (%).

Порозноста беше оценета како просечна вредност од четири независни мерења ( $n = 4$ ) за секој тип леб и за секое ниво на складирање (0 и по 7 дена).

Резултатите се прикажани како средна вредност  $\pm$  стандардна девијација (mean  $\pm$  SD).

Овој пристап овозможи објективна и репродуцибилна процена на микроструктурата на внатрешниот дел, а добиените податоци обезбедија вредни информации за поврзаноста меѓу порозноста, специфичниот волумен и текстуралните

својства, што претставува суштински аспект при оцена на технологиското и сензорното влијание на брашното од тиква врз финалниот производ.

### **3.2.6 Подготовка на екстракти и определување антиоксидативни, оксидоредуктивни активности, вкупни фенолни соединенија и редуцирачки шеќери во лебовите**

Во рамките на оваа докторска дисертација, анализите на антиоксидативните својства (DPPH, ABTS, FRAP), вкупните фенолни соединенија (TPC) и содржината на редуцирачки шеќери (DNS) кај примероците леб беа спроведени со примена на методите опишани погоре (види точка 3.1.7 Подготовка на екстракти и анализа на антиоксидантниот профил и содржината на редуцирачки шеќери во брашната)-

Меѓутоа, кај примероците леб, анализите беа изведени за мостри земени од две различни локации на примерокот (готовиот производ) и тоа, од корката и од внатрешниот дел од лебот, за да се добие појасна слика за дистрибуцијата и за стабилноста на биоактивните соединенија по процесот на ферментација и на печење. За определување на антиоксидативните својства (DPPH, ABTS и FRAP) и на вкупните фенолни соединенија (TPC), беше користен екстракциски раствор составен од етанол (99,99 %) и дестилирана вода во волуменски однос 80:20 (v/v, етанол:вода), додека за анализата со методот DNS се користеше дестилирана вода како растворувач.

Преку ова беше овозможено директно споредување на резултатите меѓу мешавините на брашна и готовите производи, за да се идентификува степенот на задржување или деградација на антиоксидантните соединенија за време на технолошкиот процес (мешање, ферментација и печење).

Резултатите за редуцирачките шеќери (DNS), вкупните феноли (TPC) и антиоксидативните анализи (DPPH, ABTS) беа изразени во истите единици како и кај анализата на мешавините на брашна, согласно со стандардните калибрациски криви. Единствено кај FRAP-анализата, резултатите беа изразени како микрограм еквивалент на железо (II) сулфат ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) на грам сува материја ( $\mu\text{g FeSO}_4/\text{g CM}$ ).

На тој начин беше можно да се процени реалниот биохемиски потенцијал на брашното од тиква во системот на производство на леб, како и да се утврдат влијанието на времето на ферментација (1 час и 2 часа) врз концентрацијата на фенолни соединенија, антиоксидативниот капацитет и промените во редуцирачките шеќери во кората и во внатрешниот дел на лебот.

Сите анализи беа изведени во дупликат за секој примерок (кора и внатрешен дел) за да се обезбедат статистичка точност и повторливост.

### 3.2.7 Анализа на акриламид

Содржината на акриламид во испитуваните примероци беше определена со примена на UHPLC-MS/MS (Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry), според методологијата на Жао (Zhao, 2019), со соодветни модификации приспособени на природата на матрицата.

За екстракција на акриламидот, 1 g примерок беше хомогенизиран со 10 mL дестилирана вода и со 10 mL ацетонитрил. За подобрување на фазното разделување, беше додадена смеса QuEChERS (MgSO<sub>4</sub>:NaCl во однос 4:1), која овозможи ефикасна деградација на матрицата и подобро извлекување на анализираното соединение. По оваа постапка, суспензијата беше подложена на центрифугирање, при што се доби јасна органска фаза. Од горниот органски слој беше издвоен 1 mL, кој беше дополнително разреден и филтриран пред да биде внесен во аналитичкиот систем.

Аналитичкото одделување беше изведено со помош на системот Agilent 1290 Infinity II LC, во комбинација со тростепениот масен спектрометар 6470A, опремен со порозна графитна јаглеродна колона. Како мобилна фаза беше користена 0,1 % оцетна киселина во вода и во метанол, што обезбеди оптимални услови за елуција и за стабилност на сигналот.

Детекцијата на акриламидот се базираше на принципот на Multiple Reaction Monitoring (MRM), што овозможува висока специфичност и чувствителност во сложени матрици. Квантификацијата беше изведена преку внатрешна калибрација, со употреба на калибрациски стандарди за воспоставување линеарна зависност помеѓу концентрацијата и интензитетот на сигналот.

Постигнатите аналитички параметри овозможува дефинирање на граница на квантификација (LOQ), која изнесуваше 2,5 ng/g при фактор на разредување 5, односно 10 ng/g при фактор на разредување 20. Овие вредности укажуваат на висока чувствителност и сигурност на методот, овозможувајќи детекција на акриламид во траги, што е од особено значење со оглед на неговата токсиколошка релевантност и на регулаторните ограничувања.

Преку оваа методологија беше обезбедена прецизна и репродуктивна процена на концентрацијата на акриламид во различните формулации на леб, што овозможи увид во поврзаноста помеѓу технолошките параметри (ферментација, состав на брашната) и нивната улога во формирањето на ова соединение.

### 3.2.8 Сензорна анализа

Сензорната анализа на лебовите беше спроведена според методологијата на Калуѓерски и Филиповиќ (Kaluderski & Filipović, 1998), со одредени модификации. Анализата имаше за цел да ја оцени сензорната прифатливост на различните формулации леб добиени со замена на дел од пченичното брашно со брашно од тиква (*Cucurbita maxima* Plomo), преку квантитативно опишување и рангирање на повеќе квалитативни атрибути.

Оценувањето беше извршено од панел составен од 10 искусни оценувачи, селектирани врз основа на нивната сензорна чувствителност, искуството со процена на пекарски производи и способноста за конзистентно оценување на атрибутите. Панелистите беа запознаени со целите на анализата и со дефинициите на сензорните критериуми пред почетокот на тестирањето.

Оценувањето беше спроведено во контролирани лабораториски услови, при температура од  $22 \pm 2$  °C, со неутрално осветлување и без надворешни дразби (мириси, бучава), за да се минимизираат факторите кои би можеле да влијаат врз перцепцијата на вкусовите и на аромите. Секој примерок беше обележан со трокоден број за да се обезбедат анонимност и објективност во оценувањето.

Сензорните параметри кои беа оценувани вклучуваа:

- Волумен на лебот ( $k = 4$ ) – визуелна процена на висината и на развиеноста на лебот во однос на контролниот примерок;
- Надворешен изглед ( $k = 3$ ) – униформност на формата, бојата и на карактеристиките на кората;
- Изглед на внатрешниот дел ( $k = 5$ ) – структура, порозност, еластичност и распределба на шуплините во внатрешниот дел на лебот;
- Арома на кората и на внатрешниот дел ( $k = 3$ ) – интензитет и пријатност на мирисните ноти карактеристични за печен леб;
- Вкус на кората и на внатрешниот дел ( $k = 5$ ) – рамнотежа меѓу аромата, свежината и послевкусот.

Секој атрибут беше оценет според скала од 1 до 5, каде што:

- 1 означуваше незадоволителен квалитет,
- 3 означуваше прифатлив/просечен квалитет,
- 5 означуваше исклучителен квалитет.

Вкупниот сензорен резултат беше добиен со множење на оценката за секој атрибут со соодветниот коефициент на релевантност ( $k$ ) и нивно собирање. Оваа пондерирана метода овозможува повисока тежина на параметрите што имаат поголемо влијание врз вкупната сензорна перцепција на лебот, како што се вкусот и внатрешната структура.

За секој примерок, врз основа на податоците добиени од сите оценувачи, беше пресметана и просечна вкупна сензорна оценка, која овозможуваше директна споредба на вкупната сензорна прифатливост меѓу различните формулации на леб.

Со спроведувањето на двете експериментални фази – анализата на суровините и функционалните својства на брашното од тиква, како и со карактеризацијата на лебовите произведени со замена на пченичното брашно со брашно од тиква во нивоа од 5 %, 10 %, 15 % и 20 % и со времетраење на ферментацијата од 1 и од 2 часа – беше воспоставена научна основа за проценка на синергетските ефекти од реформулирањето на рецептурата и од оптимизацијата на технолошкиот процес врз формирањето акриламид.

Во рамките на следното поглавје се презентирани и интерпретирани добиените резултати преку споредбена анализа на физичко-хемиските, текстуалните, сензорните и биохемиските параметри, со посебен акцент на влијанието на времетраењето на ферментацијата (1Н и 2Н) врз намалувањето на содржината на акриламид, како и врз технолошкиот квалитет на лебот.

Овој дел претставува клучна интерпретативна врска меѓу експерименталната методологија и практичната примена, обезбедувајќи научно засновано разбирање за тоа како брашното од тиква и оптимизацијата на ферментацијата можат да придонесат за производство на леб со подобрен функционален и безбедносен профил.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 4.1 АНАЛИЗА НА БРАШНАТА ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА ПРИМЕРОЦИТЕ ЛЕБ

Резултатите што следуваат (од првиот дел на истражувањето) претставуваат основа за разбирање на технолошките и функционалните карактеристики и на биоактивниот профил на мекото пченично брашно (SWF) и на брашното од тиква (PF) во процесот на производство на леб, како и за поврзување на овие својства со последователните промени забележани во втората фаза на истражувањето, односно кај подготовката, анализата и кај евалуацијата на лебовите. Според податоците од производителот, хемискиот состав на 100 g пченично брашно (SWF) изнесуваше: 1,8 % масти (вклучувајќи 0,4 % заситени масти), 68 % јаглехидрати, 12 % протеини, 2,9 % диететски влакна и 0,64 % пепел, додека за 100 g брашно од тиква (PF) беше утврден состав од 1,21 % масти, 8,04 % протеини, 45,34 % јаглехидрати, 39,27 % вкупни диететски влакна (14,37 % растворливи и 24,9 % нерастворливи) и 6,12 % пепел, што укажува на суштински различен нутритивен и минерален профил помеѓу двете суровини (табела 7).

Табела 7: Хемиски состав на меко пченично брашно (SWF) и на брашно од тиква (PF) (на 100 g)

Параметар (%)	SWF	PF
Масти	1,80	1,21
Заситени масти	0,40	—
Јаглехидрати	68,00	45,34
Протеини	12,00	8,04
Вкупни диететски влакна	2,90	39,27
Растворливи диететски влакна	—	14,37
Нерастворливи диететски влакна	—	24,90
Пепел	0,64	6,12

„—“ означува дека податокот не е пријавен/достапен за соодветниот примерок.

Дополнително, вредностите на влага кај брашната и нивните мешавини беа: 10,8 % за 100 % пченично брашно (SWF), 9,76 %, 9,89 %, 9,31 % и 9,43 % за мешавините со 5 %, 10 %, 15 % и 20 % брашно од тиква, како и 9,44 % за 100 % брашно од тиква (PF), што обезбедува важна основа за интерпретација на разликите во хидратацијата, реолошкото однесување и во стабилноста на тестото во понатамошните фази на производството.

#### 4.1.1 Гранулометриски карактеристики на брашното (пченично и од тиква)

Големината на гранулите на брашното претставува еден од клучните параметри што ја определуваат технолошката и функционалната изведба на брашната во процесите на месење, ферментација и на печење. Таа директно влијае врз преносот на топлина и на маса, степенот на хидратација, желатинизацијата, како и врз реолошките и текстуалните својства на тестото и на финалните производи (García-Segovia et al., 2020).

Табела 8: Гранулометриска анализа на пченичното брашно и на брашното од тиква

Дијаметарот на сито ( $\mu\text{m}$ )	SWF (%)	PF (%)
>200	72,96 $\pm$ 10,94 <sup>d</sup>	60,76 $\pm$ 9,11 <sup>c</sup>
200<>180	6,70 $\pm$ 1,01 <sup>c</sup>	3,78 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>
180<>150	7,74 $\pm$ 1,16 <sup>c</sup>	5,30 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>
150<>125	4,28 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	4,86 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>
125<>106	4,00 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>	4,94 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>
106<>80	3,86 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	4,60 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>
<80	1,10 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	13,26 $\pm$ 1,99 <sup>b</sup>

SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква – контрола; малите букви означуваат дека вредностите во колоните статистички се разликуваат ( $p = 0,05$ ).

Гранулометриската анализа на мекото пченичното брашно (SWF) и на брашното од тиква (PF), прикажана во табелата 8, открива јасни разлики во распределбата на честичките. Пченичното брашно покажува доминација на покрупни фракции, особено оние задржани на ситата со отвори  $\geq 0,200$  mm, кои опфаќаат  $72,96 \pm 10,94$  % од вкупната маса. Оваа карактеристика е во согласност со индустриски произведените пченични брашна со средна гранулација, кај кои распределбата на големината на честичките и степенот на мелење се поврзуваат со технолошките својства на тестото и со пекарскиот квалитет; на пр., структура/волумен на производот (Dziki et al., 2024).

Во средните фракции (од 0,180 до 0,106 mm), пченичното брашно покажува релативно рамномерна распределба (4–8 %), што укажува на добар степен на мелење и на хомогеност на честичките. Од друга страна, најситната фракција ( $< 0,080$  mm) сочинува само  $1,10 \pm 0,17$  %, што ја ограничува способноста на брашното да врзува вода, но придонесува за стабилна структура на глутенската мрежа и за контролирана вискозност на тестото.

Брашното од тиква, пак, покажува распределба со две доминантни фракции, што е во согласност со природната структура на суровината и со присуството на диететски влакна. Најголем дел од честичките ( $60,76 \pm 9,11$  %) се задржани на ситото  $\varnothing 0,200$  mm, што укажува на присуство на поголеми гранули кои се должат на високата содржина на нерастворливи диететски влакна и на клеточни сидови кои не се дисперзираат целосно при мелењето. Меѓутоа, фракцијата со најситни честички ( $< 0,080$  mm) значително е

повисока ( $13,26 \pm 1,99$  %) во споредба со пченичното брашно, што сугерира поголема површинска активност и потенцијал за хидратација.

Овој феномен, како што истакнуваат Алвиола и Монтерде (Alviola & Monterde) (2018), произлегува од структурната комплексност и хемискиот состав на суровината, вклучително и од повисокиот удел на диететски влакна и полифенолни соединенија во тиквата, кои го зголемуваат бројот на хидрофилни групи достапни за врзување вода. Дополнително, Карпентиери и соработниците (Carpentieri et al., 2022) нагласуваат дека распределбата на големината на честичките е клучна за одредување на правилната хидратација на брашнените системи, бидејќи фините честички имаат тенденција да се прехидрираат, создавајќи леплива конзистенција, додека покрупните честички може да останат недоволно хидратирани, што резултира со покруто тесто и со намалена еластичност.

Според Катјал и соработниците (Katyal et al., 2017), големината на гранулите на пченичното брашно има директно влијание врз технолошките својства на тестото, вклучувајќи ги способноста за задржување гасови, вискозноста и крајниот волумен на лебот. Во контекст на ова истражување, може да се заклучи дека поголемата застапеност на ситни честички кај брашното од тиква создава повеќе активна површина за апсорпција на вода, што потенцијално ги зголемува способноста за задржување вода и способноста за желатинизација на мешавините. Слични резултати за гранулометриската распределба на брашното од тиква пријавуваат и други автори, кои истакнуваат дека токму ваквата комбинација на крупни и на ситни честички овозможува подобра текстура на рамнотежа и подобрени функционални својства на финалниот производ (Batista et al., 2018).

Таквата комбинација на микро и макроструктурни фракции не само што придонесува за поефикасна хидратација и за подобро формирање на тестото, туку создава и предуслови за подобра технолошка контрола во процесот на ферментација и на печење, што особено е значајно во контекст на намалувањето на формирањето акриламид во последователните процесни фази.

#### **4.1.2 Технолошко-функционалните својства на брашната – Капацитет за апсорпција и за задржување вода и масло (WAC, WHC, OAC); Индекс на апсорпција и растворливост во вода (WAI, WSI); Моќ на набабрување (SP); Хидрофилно/липофилен индекс (HLI)**

Резултатите за функционалните својства на бинарните мешавини од меко пченично брашно (SWF) и од брашно од тиква (PF) се прикажани во табелата 9. Анализираниите параметри – индекс на апсорпција на вода (WAI), индекс на растворливост во вода (WSI), моќ на набабрување (SP), капацитет за апсорпција на вода (WAC), капацитет за апсорпција на масло (OAC), капацитет за задржување вода (WHC) и хидрофилно/липофилен индекс (HLI) – овозможуваат сеопфатна процена на функционалното и на структурното однесување на брашното и на неговите мешавини.

Податоците од табелата 9 откриваат сеопфатен увид во способноста за интеракција со вода и со масло кај брашното од тиква и кај бинарните мешавини со пченично брашно при различни концентрации. Кај контролниот примерок (пченично брашно), се забележуваат референтни вредности кои претставуваат основна точка за споредба: капацитет за задржување вода (WHC) од 2,52, капацитет за апсорпција на вода (WAC) од 1,83, и индекс на апсорпција на вода (WAI) од 5,62, сите изразени во g вода/g сува материја. Овие вредности ги рефлектираат типичните хидратациски својства на пченичното брашно, кои главно се определени од содржината на протеини и од морфологијата на скробните гранули.

Табела 9: Технолошко-функционалните својства на мешавините од брашно од тиква и од пченично брашно

Примерок	WHC	WAC	WAI	SP	WSI	OAC	HLI
	(g вода /g CM)				(g вода / 100 g CM)	(g масло /g CM)	
SWF	2,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,62 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,36 <sup>a</sup>	1,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,00 <sup>a</sup>
5 %	2,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,07 <sup>ab</sup>	5,68 ± 0,10 <sup>a</sup>	5,91 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,62 ± 0,14 <sup>ab</sup>	1,18 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,79 ± 0,01 <sup>a</sup>
10 %	2,78 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,04 ± 0,07 <sup>ab</sup>	5,80 ± 0,03 <sup>ab</sup>	6,15 ± 0,03 <sup>ab</sup>	5,82 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,26 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,79 ± 0,03 <sup>a</sup>
15 %	3,07 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,14 ± 0,00 <sup>ab</sup>	5,94 ± 0,07 <sup>b</sup>	6,38 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,84 ± 1,10 <sup>bc</sup>	1,33 ± 0,00 <sup>d</sup>	1,78 ± 0,02 <sup>a</sup>
20 %	3,56 ± 0,15 <sup>d</sup>	2,24 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,88 ± 0,15 <sup>c</sup>	7,53 ± 0,16 <sup>c</sup>	8,60 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,41 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,75 ± 0,03 <sup>a</sup>
PF	10,89 ± 0,14 <sup>e</sup>	8,01 ± 0,33 <sup>c</sup>	8,64 ± 0,14 <sup>d</sup>	12,22 ± 0,23 <sup>d</sup>	29,27 ± 2,47 <sup>d</sup>	1,78 ± 0,02 <sup>f</sup>	4,98 ± 0,04 <sup>b</sup>

SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква; 5–20 % – мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; WHC – капацитет за задржување вода; WAC – капацитет за апсорпција на вода; OAC – капацитет за апсорпција на масло; HLI – хидрофилен/липофилен индекс; WAI – индекс на апсорпција на вода; WSI – индекс на растворливост во вода; SP – моќ на набобрување; малите букви означуваат дека вредностите во колоните статистички се разликуваат ( $p = 0,05$ ).

Со зголемувањето на концентрацијата на брашно од тиква од 5 % до 20 %, се забележува прогресивно зголемување на способноста за интеракција со вода. Вредностите на WHC континуирано растат од  $2,52 \pm 0,02$  g вода/g CM на  $3,56 \pm 0,15$  g вода/g CM, што укажува на подобрена способност на мешавините да ја задржуваат водата под гравитациски сили. Сличен тренд беше забележан и во истражувањето на Алџахани (Aljähani, 2022). Истовремено, вредностите на WAC се зголемуваат од  $1,83 \pm 0,15$  g вода/g CM на  $2,24 \pm 0,04$  g вода/g CM, што укажува на подобро врзување вода под влијание на надворешни сили.

Брашното од тиква (PF) се одликува со значително поголем индекс на апсорпција на вода ( $WAI = 8,64 \pm 0,14$  g вода/g CM) во споредба со пченичното брашно ( $WAI = 5,62 \pm 0,03$  g вода/g CM). Овој тренд се одразува и кај мешавините: со зголемување на процентот на брашно од тиква од 5 % до 20 %, WAI се зголемува прогресивно од  $5,68 \pm 0,10$  g вода/g CM до  $6,88 \pm 0,15$  g вода/g CM, што потврдува дека брашното од тиква има поголем афинитет за вода и повисок потенцијал за хидратација на тестото. Како што е прикажано во гранулометриската анализа, помалата гранулација на брашното од тиква

создава поголема површина за врзување вода, што резултира со повисоки вредности на WAI.

Слична тенденција се забележува и кај индексот на растворливост во вода (WSI), кој значително се зголемува со зголемување на процентот на брашно од тиква – од  $3,80 \pm 0,36$  g вода/100 g CM за SWF до  $8,60 \pm 0,00$  g вода/100 g CM за мешавината со 20 % PF, а кај чистото брашно од тиква достигнува дури  $29,27 \pm 2,47$  g вода/100 g CM. Високиот WSI укажува на поголемо ослободување на растворливи полисахариди и на нискомолекуларни соединенија, кои се дисперзираат во водената фаза за време на термичката обработка. Според Јусф и соработниците (Yousf et al., 2017), високата вредност на WSI одразува интензивна деградација на скробните гранули и поголема екстракција на растворливи компоненти. Гиздареану и соработниците (Ghizdareanu et al., 2023) додаваат дека на WSI влијаат фактори како што се структурата на гранулите на скробот и соодносот на амилоза и амилопектин, додека Жао и соработниците (Zhao et al., 2009) посочуваат дека намалувањето на големината на гранулите го зголемува WSI, бидејќи овозможува поинтензивно „истекување“ на растворливи компоненти во водната фаза.

Најизразени разлики се забележуваат кај брашното од тиква (PF), кое покажува значително повисоки вредности за сите параметри: WNC =  $10,89 \pm 0,14$  g вода/g CM, WAC =  $8,01 \pm 0,33$  g вода/g CM, WAI =  $8,64 \pm 0,14$  g вода/g CM и WSI =  $29,27 \pm 2,47$  g вода/100 g CM. Овие резултати значително се повисоки од оние пријавени од Митал и соработниците (Mittal et al., 2019), кои забележале вредност на WAC од  $2,56$  g вода/g CM. Слични вредности на WSI се забележани од Селеау и Шлајнинг (Saeleaw & Schleining, 2011), додека Переира и соработниците (Pereira et al., 2020) пријавиле пониски вредности, но добиле споредливи резултати за WAI. Овие високи вредности се должат на повисоката содржина на влакна и на специфичниот протеински состав на PF, кои овозможуваат поголем капацитет за задржување вода и подобра хидратација на скробната матрица.

И моќта на набабрување (SP) следи растечки тренд со зголемувањето на процентот на брашно од тиква, од  $5,84 \pm 0,01$  g вода/g CM кај SWF до  $7,53 \pm 0,16$  g вода/g CM кај мешавината со 20 % PF, а највисока вредност е измерена кај чистото брашно од тиква (SP =  $12,22 \pm 0,23$  g вода/g CM). Овие резултати ја потврдуваат поголемата способност за хидратација и за експанзија на клеточната матрица на брашното од тиква, што се должи на присуството на диететски влакна и на повисоката содржина на растворливи диететски влакна.

Високата вредност на WNC укажува на тоа дека PF би можел да се користи во прехранбени формулации каде што се бара зголемена вискозност, подобра хидратација и задржување свежина, особено кај термички обработени производи. Акташ и Герчеказлан (Aktas & Gerçekaslan, 2024) пријавуваат дури и повисока вредност на WNC ( $12,91 \pm 0,40$  g вода/g CM) за брашно добиено од пулпа на тиква.

Што се однесува до капацитетот за апсорпција на вода (WAC), вредностите исто така бележат зголемување со зголемување на процентот на PF – од  $1,83 \pm 0,03$  g вода/g

CM кај SWF до  $2,24 \pm 0,04$  g вода/g CM кај мешавината со 20 % PF, додека кај чистото брашно од тиква WAC достигнува  $8,01 \pm 0,33$  g вода/g CM. Овој параметар е клучен за процена на вискозноста, стабилноста и на хомогеноста на тестото, бидејќи ја рефлектира способноста на матрицата да ја задржи водата при механички стрес и при гравитациски сили.

Од друга страна, капацитетот за апсорпција на масло (OAC) покажува побавен раст со зголемувањето на процентот на PF, од  $1,14 \pm 0,02$  g масло/g CM кај SWF до  $1,41 \pm 0,01$  g масло/g CM кај 20 % PF, а највисока вредност од  $1,78 \pm 0,02$  g масло/g CM е забележана кај чистото брашно од тиква. Како што укажуваат Гравел и Дојен (Gravel & Douen, 2020), OAC е поврзан со структурата на протеините и со нивните хидрофобни региони, што влијае врз емулгирачките својства и врз задржувањето на маснотиите во хранливите системи. Брашното од тиква, богато со протеини со ниска густина и со хидрофобни региони, покажува поголем афинитет кон липидите, што ги подобрува задржувањето на аромата и текстурата на готовите производи. Слични резултати за зголемена апсорпција на вода се пријавени од многумина автори (Adubofuor et al. 2018; Nohha et al., 2023; Pasha et al., 2013 и Van Toan et al., 2018), додека Еке-Еџиофор и соработниците (Еке-Еџиофор et al., 2021) известуваат за компаративни резултати за мешавини од пченично брашно и од брашно од тиква во поглед на WAC и на OAC. Зголемувањето на WAC со растот на процентот на PF може да се припише на високата содржина на растителни влакна во брашното од тиква, кои создаваат повеќе активни места за врзување вода. Поголемата вредност на WSI, пак, произлегува од поголемата фракција на ситни честички во PF во споредба со SWF.

Хидрофилно/липофилниот индекс (HLI), кој го претставува односот меѓу WAC и OAC, овозможува процена на рамнотежата меѓу хидрофилните и липофилните својства на брашното. Кај сите анализирани мешавини, вредностите на HLI се движат во релативно тесен опсег ( $1,75 \pm 0,03$  g масло/g CM до  $1,80 \pm 0,00$  g масло/g CM), што укажува на добра структурна стабилност и на функционална рамнотежа помеѓу апсорпцијата на вода и на масло. Сепак, кај чистото брашно од тиква HLI значително е повисок ( $4,98 \pm 0,04$  g масло/g CM), што ги потврдува неговиот силно хидрофилен карактер и потенцијалот за примена како функционален додаток за подобрување на влажноста и на свежината на пекарските производи.

Овие резултати јасно покажуваат дека зголемувањето на уделот на брашно од тиква доведува до значајно зголемување на параметрите поврзани со водната фаза (WHC, WAC, WAI, WSI, SP), додека влијанието врз липидната фаза (OAC) е поумерено. Ваквиот профил укажува дека мешавините со брашно од тиква имаат висок хидрофилен капацитет, што е од особено значење за развој на тесто со подобрена хидратација, висока пластичност и со стабилност при ферментација.

Статистичката анализа, означена со мали букви во табелата, потврдува значајни разлики помеѓу примероците за повеќето параметри, особено при повисоки концентрации на PF, што го нагласува значајното влијание на брашното од тиква врз технолошко-функционалните својства на бинарните мешавини. Конечно, овие податоци

даваат значајни насоки за потенцијална примена на брашното од тиква во формулации на функционални лебови, особено во контекст на намалување на формирањето акриламид преку регулирање на влажноста и на реактивноста на матрицата за време на термичката обработка.

#### 4.1.3 Вискозност на брашната (пченично и од тиква) и на мешавините

Вискозноста претставува еден од клучните параметри за карактеризација на физичко-технолошките својства на различни материјали, а особено на прехранбени системи како брашното и тестото. Вискозните карактеристики на мекото пченично брашно (SWF), брашното од тиква (PF) и на нивните мешавини се прикажани во табелата 10.

Табела 10: Вискозност на брашната (пченично, од тиква и мешавини)

Примерок	Максимална вискозност (mPa·s)	Минимална вискозност (mPa·s)	Разлика во вискозноста (mPa·s)	Крајна вискозност (mPa·s)	Сет-бек вискозност (mPa·s)	Темп. на вискозност (°C)	Макс. време (s)
SWF	2444,0 ± 4,2 <sup>c</sup>	1386,5 ± 0,7 <sup>d</sup>	1057,5 ± 3,5 <sup>c</sup>	2920,0 ± 12,7 <sup>c</sup>	1533,5 ± 13,4 <sup>d</sup>	87,6 ± 0,53 <sup>b</sup>	6,42 ± 0,40 <sup>a</sup>
5 %	2342,5 ± 27,6 <sup>de</sup>	1273,0 ± 1,4 <sup>c</sup>	1069,5 ± 29,0 <sup>c</sup>	2706,0 ± 26,9 <sup>bc</sup>	1433,0 ± 28,3 <sup>cd</sup>	87,7 ± 0,57 <sup>b</sup>	6,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
10 %	2219,0 ± 25,5 <sup>cd</sup>	1146,5 ± 12,0 <sup>b</sup>	1072,5 ± 13,4 <sup>c</sup>	2501,0 ± 38,2 <sup>b</sup>	1354,5 ± 26,2 <sup>bc</sup>	87,5 ± 0,48 <sup>b</sup>	5,40 ± 0,57 <sup>a</sup>
15 %	1978,5 ± 92,6 <sup>b</sup>	981,0 ± 46,7 <sup>a</sup>	997,5 ± 46,0 <sup>bc</sup>	2184,0 ± 84,9 <sup>a</sup>	1203,0 ± 38,2 <sup>ab</sup>	87,2 ± 0,04 <sup>b</sup>	5,67 ± 0,00 <sup>a</sup>
20 %	1859,5 ± 13,4 <sup>a</sup>	901,0 ± 4,2 <sup>a</sup>	958,5 ± 9,2 <sup>c</sup>	2000,5 ± 36,1 <sup>a</sup>	1099,5 ± 31,8 <sup>ab</sup>	87,3 ± 0,04 <sup>b</sup>	5,64 ± 0,05 <sup>a</sup>
PF	2265,0 ± 14,1 <sup>cd</sup>	2098,0 ± 89,1 <sup>c</sup>	167 ± 75,0 <sup>a</sup>	3549,5 ± 231,2 <sup>d</sup>	1451,5 ± 142,1 <sup>cd</sup>	50,2 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,17 ± 2,60 <sup>a</sup>

SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква; 5-20 % – мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; средните вредности во колоните со мали букви статистички значајно се разликуваат (p = 0,05).

Со постепено зголемување на уделот на PF, вискозните параметри укажаа на изразени промени поврзани со процесите на желатинизација и на ретроградација. Кај контролниот примерок (SWF) беа добиени вредности типични за пченични системи: максимален вискозитет од 2444,0 ± 4,2 mPa·s, минимален вискозитет од 1386,5 mPa·s ± 0,7 и краен вискозитет од 2920,0 ± 12,7 mPa·s. Овие показатели го опишуваат вообичаениот одговор на SWF при желатинизација на скробот, односно изразено набабрување при загревање и последователна реорганизација на структурните компоненти во фазата на ладење.

Зголемувањето на PF од 5 % до 20 % резултираше со јасно, систематско намалување на максималната вискозност (од 2342,5 ± 27,6 mPa·s на 1859,5 ± 13,4 mPa·s), што упатува на ограничен капацитет за набабрување на скробните гранули при термичка обработка. Паралелно, беше забележано и намалување на минималната вискозност (од 1273,0 ± 1,4 mPa·s на 901,0 ± 4,2 mPa·s), што може да се толкува како пониска стабилност на набабрените гранули при продолжено изложување на висока температура. Разликата во вискозност (максимален вискозитет – минимален вискозитет) покажуваше релативно мали варијации меѓу мешавините (958,5 ± 9,2 – 1072,5 mPa·s ± 13,4), што сугерира дека кршливоста/деградацијата на гранулите останува споредлива и покрај промените во

составот. Слични резултати се наведени и кај композитни системи пченица – жолта тиква во трудот на Алјохани (Aljahani, 2022).

Паралелно со тоа, крајната вискозност бележеше стабилен пад (од  $2920,0 \pm 12,7$  mPa·s кај SWF до  $2000,5 \pm 36,1$  mPa·s при 20% PF), што упатува на ослабена ретроградација во текот на ладењето. Намалувањето на т.н. вискозноста „сет-бек“ (од  $1533,5 \pm 13,4$  mPa·s на  $1099,5 \pm 31,8$  mPa·s) дополнително ја потврдува оваа тенденција и е во согласност со резултатите на Алјохани (Aljahani, 2022). Наспроти овие промени, температурата на вискозност остана речиси непроменета (околу  $87$  °C) низ мешавините, додека времето до достигнување на максимум се скрати од 6,42 на 5,64 секунди. Според Промсаха на Сакон Нахон и соработниците (Promsakha na Sakon Nakhon et al., 2017), ваквото намалување на вискозните вредности може да се објасни преку интеракциите на протеинските и на липидните компоненти во PF со амилозата, кои го ограничуваат развојот на вискозноста. Дополнително, со зголемување на PF се намалува релативната скробна фракција и се зголемува присуството на диететски влакна, што го редуцира набабрувањето и ја менува водната распределба во системот (Promsakha na Sakon Nakhon et al., 2017).

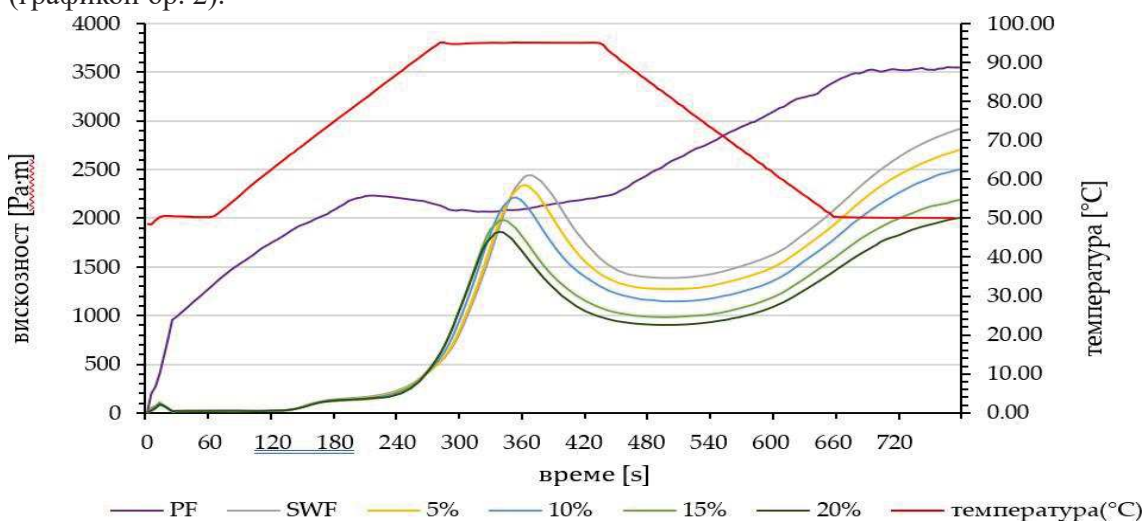
Во споредба со SWF и со композитите, PF покажа суштински поинакво реолошко однесување: максимален вискозитет  $2265,0$  mPa·s  $\pm 14,1$ , минимален  $2098,0 \pm 89,1$  mPa·s и многу мала разлика ( $167$  mPa·s  $\pm 75,0$ ). Оваа комбинација на параметри укажува на висока отпорност на гел-структурата при продолжено загревање и минимално т.н. однесување „breakdown“. Пониската температура на вискозност кај PF ( $50,2$  °C), заедно со високиот краен вискозитет ( $3549,5 \pm 231,2$  mPa·s), упатуваат на различна основа на желатинизацискиот процес во однос на пченичните системи, што најверојатно произлегува од доминантниот ефект на матрицата богата со диететски влакна, особено на нерастворливите диететски влакна.

Температурните показатели за PF се усогласуваат со студиите на неколкумина автори (Slamet et al., 2019; Mardiah et al., 2020), додека Акташ и Герчеказлан (Aktas & Gerçekaslan, 2024) за брашно од пулпа од тиква пријавуваат значително повисока температура на вискозност ( $84,00 \pm 0,01$  °C). Графичките профили на мешавините PF – SWF се прикажани на графиконот бр. 2.

Контролниот примерок (SWF) покажал класичен желатинизациски профил со максимална вискозност од околу  $2500$  mPa·s во интервалот  $65$ – $70$  °C. Со додавање PF (5–20 %), максималниот вискозитет се намалуваше, развојот на желатинизацијата се поместуваше, а стабилноста при  $95$  °C беше поограничена, проследена со пониска крајна вискозност – индикатор за намалена ретроградација.

Кај примерокот од PF се забележува поран почеток на „развој“ на вискозноста и поголема стабилност во фазата на задржување, а при ладењето се регистрира изразено зголемување на вискозноста, што укажува на поинакви механизми на формирање на мрежестата структура во споредба со SWF. Оваа разлика е потврдена со податоците прикажани во табелата 10 и сугерира дека интеракциите меѓу компонентите на PF и скробот го ограничуваат набабрувањето на скробните гранули, но истовремено го

фаворизираат формирањето мрежа изградена од протеини и од диететските влакна во PF (графикон бр. 2).



Графикон бр. 2: Профили на вискозитет на брашната од мека пченица и тиква (SWF и PF) и на мешавините од брашна од SWF и PF (5-20 % брашно од тиква)

Конечно, Варијат и соработниците (Waryat et al., 2023) утврдиле дека максималната вискозност значајно зависи од додавањето PF, преку неговата водоврзувачка способност, и од составот на скробната фракција. Со зголемувањето на концентрацијата на PF може да се измени реологијата и да се подобри задржувањето на влага во тестото, што се рефлектира врз неговиот технолошки квалитет. Според Давуди и соработниците (Davoudi et al., 2020), PF може да придонесе за постабилна структура на тестото, која подобро ја задржува формата при печење, додека т.н. вискозност „сет-бек“ се поврзува со свежината и со динамиката на застарување (рок на траење) на производот (Ge et al., 2021).

#### 4.1.4 Текстура на гел

Текстурните параметри на геловите од загреана паста од брашно од тиква, мека пченица и од нивните мешавини се прикажани во табелата 11.

Табела 11: Текстура на геловите добиени од RVA

Примерок	Цврстина (анг. Hardness) (N)	Кохезивност	Еластичност (анг. Springiness)	Жилавост (анг. Gumminess) (N)	Стабилност (анг. Resilience)
SWF	0,46 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,815 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,842 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,312 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,576 ± 0,02 <sup>a</sup>
5 %	0,44 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,777 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,792 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,272 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,507 ± 0,02 <sup>a</sup>
10 %	0,40 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,778 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,763 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,236 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,549 ± 0,02 <sup>a</sup>
15 %	0,34 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,482 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,165 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,028 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,419 ± 0,10 <sup>a</sup>
20 %	0,35 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,378 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,123 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,014 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,452 ± 0,09 <sup>a</sup>
PF	0,04 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,000 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,000 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,000 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,251 ± 0,15 <sup>b</sup>

SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква; 5-20 % – мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; средните вредности во колоните со мали букви статистички значајно се разликуваат ( $p = 0,05$ ).

Кај контролниот примерок од SWF беа регистрирани текстурните параметри што се типични за пченичните, скробно-базираните гелови. Неговото однесување беше во рамки на очекуваното вискоеластично реагирање, пред сè, како резултат на желатинизираниот пченичен скроб и на интеракциите меѓу протеинските компоненти. Притоа, измерената цврстина изнесуваше  $0,46 \pm 0,01$  N, кохезивноста  $0,815 \pm 0,04$ , а еластичноста  $0,842 \pm 0,01$ . Дополнително, вредностите за жилавост ( $0,312 \pm 0,01$  N) и за стабилност ( $0,576 \pm 0,02$ ) го потврдија балансираниот профил на SWF-гелот и укажаа на способноста на системот да го задржи структурниот интегритет при механичка деформација. Овие резултати укажуваат на тоа дека скробно-протеинската мрежа има клучен придонес за кохезивните и за еластичните својства на матрицата (Aljähani, 2022; Weldeyohanis Gebremariam et al., 2024).

Со зголемувањето на концентрацијата на PF од 5 % на 20 %, карактеристиките на текстурата на гелот се модифицираа систематски. Цврстината се намали постепено од  $0,44 \pm 0,01$  N при 5 % инкорпорација на PF до  $0,35 \pm 0,02$  N при 20 %, што укажува на прогресивно омекнување на гелните структури. Во согласност со наодите на Алјахани (Aljähani, 2022), ова намалување на цврстината се поврзува со повисокото задржување на влага и со зголемената содржина на влакна во PF, при што помеката текстура е резултат на нарушување на скробно-протеинската матрица. Значително намалување се забележа и кај кохезивноста, која опадна од  $0,777 \pm 0,00$  при 5 % на  $0,378 \pm 0,02$  при 20 % PF, при што овој тренд беше придружен со намалена внатрешна поврзаност во гелната матрица, каде што се нарушува интегритетот на структурата на гелот како резултат на присуството на нескробни полисахариди (Tedom et al., 2019).

Истовремено, жилавоста се намалува од  $0,272 \pm 0,01$  N при 5 % PF на  $0,014 \pm 0,00$  N при 20 % PF, што може да се објасни како комбиниран ефект на намалената цврстина и на пониската кохезивност, а тоа води кон помеката текстура (Aljähani, 2022). Кај PF-гелот,

текстуралниот профил јасно беше различен. Се добија минимална цврстина ( $0,04 \pm 0,00$  N), нула кохезивност и нула еластичност, па како резултат и жилавоста беше нула. Сепак, PF-гелот покажал поголема стабилност ( $1,251 \pm 0,15$ ), што може да се поврзе со специфичните својства на полисахаридите од тиква и со нивното влијание врз формирањето на гелната структура (Aljahani, 2022; Mahmood et al., 2018).

Општо, резултатите од ова истражување покажаа дека со зголемувањето на процентот на PF во мешавината се јавуваат промени во цврстината, кои во многу случаи водат кон помеката текстура, пред сè, поради подобреното задржување влага и поради високата содржина на диететски влакна во PF. Дополнително, инкорпорацијата на PF значително ја редуцира тврдоста кај пекарските производи, со што тие стануваат попријатни за консумирање. Истражувањата укажуваат и дека тестото со определени концентрации на PF покажува пониски вредности на жилавост, што може позитивно да влијае врз сензацијата при консумирање и да го подобри целокупниот текстурен профил на производот (Aljahani, 2022). Други истражувања укажуваат и дека тестото со определени концентрации на PF покажува пониски вредности на жилавост, што може позитивно да влијае врз сензорните атрибути и истовремено да придонесе за подобар текстурен профил (Aljahani, 2022).

Статистичката анализа на добиените резултати покажува дека кај повеќето параметри постојат значајни разлики меѓу примероците, што е означено со различни мали букви во истите колони (табела 11). Генерално, контролниот примерок (SWF) и мешавините со 5 % и со 10 % PF честопати припаѓаат на исти статистички групи, што укажува дека при пониски нивоа на супституција, промените се умерени и не секогаш статистички значајни. Наспроти тоа, кај повисоките удели (15 % и 20 % PF) најчесто се јавува премин во статистички различни групи, што потврдува дека зголемената супституција со PF доведува до значајни промени во текстурниот профил. Дополнително, PF како самостоен примерок најчесто се издвојува од пченичните и од композитните системи со различна статистичка група, што укажува на фундаментално поинакви структурно-реолошки својства во однос на SWF.

#### 4.1.5 Вискоеластични карактеристики на гелот

Профилите на скенирање фреквенција и амплитуда, како и реолошките параметри на геловите од брашно од тиква, мека пченица и од нивните мешавини, се прикажани на графиконот бр. 3 и во табелата 12.

Табела 12: Реолошки својства на брашното од тиква, мека пченица и од нивните мешавини

Примерок	$G'$ (Pa)	$a$	$G''$ (Pa)	$b$	$\tan \delta$	$c$	$G' = G''$ (Pa)
<b>SWF</b>	$112,7 \pm 11,5^a$	$0,1876 \pm 0,0151^c$	$26,7 \pm 1,6^a$	$0,2298 \pm 0,0125^c$	$0,2379 \pm 0,0103^a$	$0,0418 \pm 0,0025^d$	$182,3 \pm 5,3^d$
<b>5 %</b>	$154,7 \pm 5,4^a$	$0,1969 \pm 0,0107^c$	$47,5 \pm 8,4^a$	$0,2150 \pm 0,0100^c$	$0,3064 \pm 0,0427^{bc}$	$0,0184 \pm 0,0199^c$	$160,2 \pm 1,3^c$
<b>10 %</b>	$309,0 \pm 15,9^b$	$0,1515 \pm 0,0054^b$	$109,7 \pm 2,1^b$	$0,1570 \pm 0,0008^b$	$0,3556 \pm 0,0247^{bc}$	$0,0055 \pm 0,0045^{bc}$	$122,7 \pm 10,8^b$
<b>15 %</b>	$497,4 \pm 22,5^c$	$0,1215 \pm 0,0001^a$	$160,1 \pm 14,7^b$	$0,1365 \pm 0,0088^b$	$0,3215 \pm 0,0154^c$	$0,0149 \pm 0,0093^c$	$96,3 \pm 16,4^{ab}$
<b>20 %</b>	$1151,0 \pm 84,6^d$	$0,1071 \pm 0,0025^a$	$412,6 \pm 47,9^c$	$0,0939 \pm 0,0017^a$	$0,3582 \pm 0,0153^c$	$-0,0130 \pm 0,0042^{ab}$	$120,5 \pm 1,3^b$
<b>PF</b>	$21570,0 \pm 1576,9^e$	$0,1205 \pm 0,0024^a$	$6362,1 \pm 445,6^d$	$0,0979 \pm 0,0052^a$	$0,2949 \pm 0,0001^b$	$-0,0225 \pm 0,0035^a$	$103,151 \pm 6,4^{ab}$

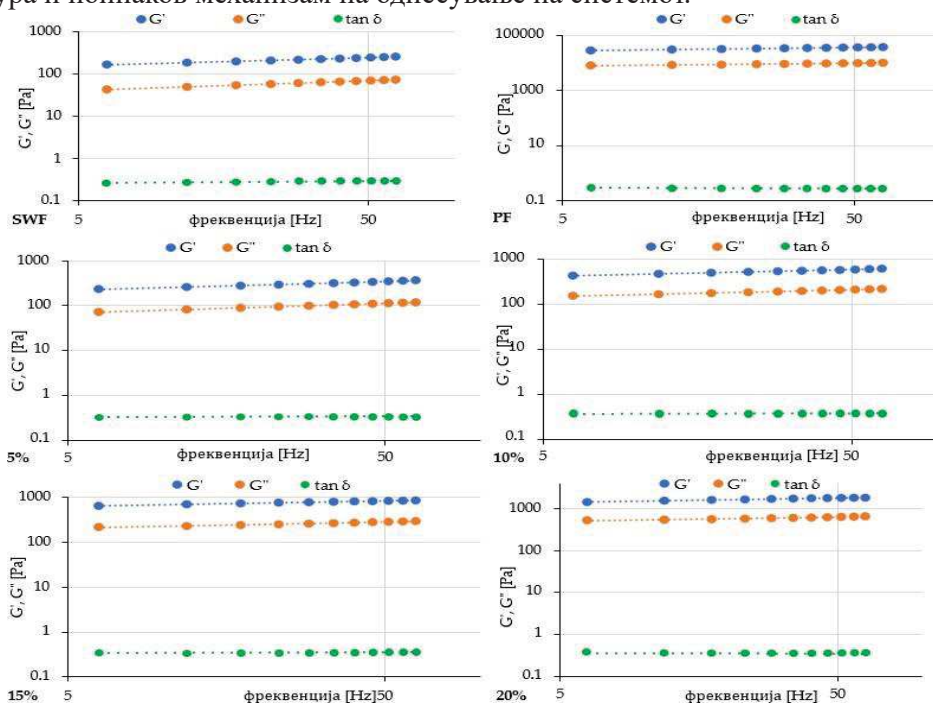
SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква; 5-20 % –мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; средните вредности во колоните со мали букви статистички значајно се разликуваат ( $p = 0,05$ ).

Реолошките податоци презентирани во табелата 12 овозможуваат подетален увид во развојот на вискоеластичните карактеристики на мешавините од SWF-PF. Кај контролниот примерок е регистриран еластичен модул ( $G'$ ) од  $112,7 \pm 11,5$  Pa и вискозен модул ( $G''$ ) од  $26,7 \pm 1,6$  Pa, при што вредноста на тангенс  $\delta$  изнесува  $0,2379 \pm 0,0103$ , што укажува на изразено еластично однесување на системот. Односот меѓу  $G'$  и  $G''$  ( $G' > G''$ ) потврдува дека еластичната компонента доминира над вискозната, што е карактеристично за структурирани гел-системи, додека ниската вредност на тангенс  $\delta$  ( $<1$ ) дополнително укажува на преовладувачки еластичен карактер. Точката при која  $G' = G''$  претставува транзициска состојба во која еластичните и вискозните својства придонесуваат подеднакво, што често се поврзува со граничната точка (gel point) на формирање гел или структурна реорганизација на системот. Умерената фреквенциска зависност е потврдена преку степенските показатели „a“ ( $0,1876 \pm 0,0151$ ) и „b“ ( $0,2298 \pm 0,0125$ ), додека високиот  $G' = G''$  ( $182,3 \pm 5,3$  Pa) дополнително ја нагласува гел-природата на примерокот. Овие резултати се во согласност со претходно опишаното вискоеластично (стабилност на гел-структурите) однесување на геловите од SWF, кое се должи на желатинизацијата на скробот и на интеракциите помеѓу протеините.

Додавањето PF доведе до значајни промени во вискоеластичните својства на мешавините. Со постепено зголемување на PF од 5 % до 20 %, забележан е континуиран пораст на вредностите на  $G'$  и  $G''$ , што укажува на зајакнување на гел-структурата. Намалувањето на степенските експоненти „a“ (од  $0,1969$  на  $0,1071$ ) и „b“ (од  $0,2150$  на  $0,0939$ ) укажува на намалена зависност од фреквенцијата, што имплицира зголемена структурна стабилност и поразвиена гел-структура. Овие наоди се во согласност со резултатите од претходни студии, каде што е покажано дека додавањето компоненти богати со диететски влакна, како PF, придонесува за зацврстување на гел-структурите (Mahmood et al., 2018; Jukić et al., 2018). Релативно стабилните вредности на  $\tan \delta$

укажуваат на тоа дека вискоеластичниот баланс се задржува и покрај зголемувањето на модулите при поцврста структура. Пониската вредност на односот  $G'/G''$  укажува на поместување кон понагласено вискозно однесување на системот, што може директно да се поврзе со зголеменото присуство на PF и е во согласност со резултатите пријавени од Ма и соработниците (Ma et al., 2019). Ваквата промена најверојатно произлегува од зголемената способност на PF да врзува и да апсорбира вода, што влијае врз процесите на хидратација и на отекување на скробните гранули (Badia-Olmos et al., 2023).

Статистичката обработка на добиените резултати за реолошките параметри (табелата 12) потврдува дека примероците се разликуваат значајно по повеќето анализирани показатели, што е прикажано со различни мали букви во рамките на истите колони. Генерално, контролниот SWF и мешавината со 5 % PF честопати припаѓаат на исти статистички групи, што укажува дека при ниска супституција реолошките промени се ограничени. Со зголемување на уделот на PF (10–20 %) најчесто се јавува премин во различни статистички групи, што потврдува дека супституцијата прогресивно и значајно ги менува еластичните и вискозните својства ( $G'$  и  $G''$ ), односно рамнотежата помеѓу еластичното и вискозното однесување ( $\tan \delta$ ). Дополнително, PF како самостоен примерок во повеќето параметри се издвојува во посебни статистички групи во однос на SWF и на композитните системи, што укажува на суштински поинаква реолошка структура и поинаков механизам на однесување на системот.



SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква;  $G'$  - еластичен модул;  $G''$  – вискозен модул; 5-20 % – мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква

Графикон бр. 3: Профилите на скенирање на фреквенција и на амплитуда на мешавините од брашно од тиква/мека пченица.

Скенирањата на фреквенција и на амплитуда прикажани на графиконот бр. 3 обезбедуваат визуелна потврда на квантитативните резултати. Со зголемување на содржината на PF во мешавините, станува сè поочигледно раздвојувањето помеѓу еластичниот и вискозниот модул, што укажува на постепено консолидирање и зајакнување на гел-мрежата. Во рамките на самите профили, забележаното намалување на варијациите меѓу  $G'$  и  $G''$  упатува на постабилна структура, сугерирајќи дека присуството на PF ја редуцира чувствителноста на геловите кон промени во фреквенцијата. Геловите збогатени со PF покажуваат речиси целосна фреквентна независност, изразена преку речиси хоризонтални криви, што е карактеристично за системи со високо организирана и со стабилна мрежна структура. Ваквото однесување најверојатно произлегува од полисахаридните компоненти присутни во PF, кои ја подобруваат способноста за гел-структура и придонесуваат за формирање поцврста мрежа (Litvynchuk et al., 2022). Интегрираната анализа на резултатите прикажани во табелата 12 и на графиконот бр. 3 јасно покажува дека постепеното инкорпорирање PF води кон континуирано структурно зајакнување на гелот, придружено со зголемена стабилност при фреквентни варијации. Овие ефекти можат да се објаснат со специфичниот состав на PF, особено со високата содржина на диететски влакна и со присуството на протеински фракции, кои заеднички ги унапредуваат кохезијата и формирањето поцврста мрежа.

Забележаните реолошки промени имаат директни импликации врз текстурните својства на финалниот производ и претставуваат важен аспект при оптимизација на технолошките параметри во прехранбената индустрија. Во таа насока, резултатите се усогласени со наодите на Ma и соработниците (Ma et al., 2019), кои пријавиле намалување на односот  $G'/G''$  при делумна замена на SWF со PF, што укажува на поместување кон понагласено вискозно однесување. Бидејќи текстурата е клучен критериум за квалитет кај пекарските производи, ваквите промени значајно влијаат врз нивниот структурен интегритет. Дополнително е утврдено дека вклучувањето на PF во опсег од 5 % до 25 % доведува до изразени модификации на реолошките својства на тестото (Ma et al., 2019).

#### 4.1.6 Параметри на боја

Вредностите на параметрите на боја на брашното од тиква и од мека пченица и на нивните мешавини се претставени во табелата 13.

Табела 13: Параметри на боја кај брашната и кај нивните мешавини

Примерок	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h^\circ$
SWF	91,00 ± 0,95 <sup>d</sup>	1,03 ± 0,10 <sup>a</sup>	10,13 ± 0,62 <sup>a</sup>	10,18 ± 0,62 <sup>a</sup>	84,3 ± 0,29 <sup>e</sup>
5 %	89,23 ± 0,59 <sup>d</sup>	1,98 ± 0,30 <sup>b</sup>	14,28 ± 0,39 <sup>b</sup>	14,41 ± 0,42 <sup>b</sup>	82,14 ± 0,95 <sup>d</sup>
10 %	87,00 ± 0,37 <sup>c</sup>	3,43 ± 0,31 <sup>c</sup>	19,98 ± 0,46 <sup>c</sup>	20,27 ± 0,48 <sup>c</sup>	80,27 ± 0,79 <sup>c</sup>
15 %	85,55 ± 0,60 <sup>bc</sup>	4,00 ± 0,12 <sup>d</sup>	22,60 ± 0,47 <sup>a</sup>	22,95 ± 0,48 <sup>d</sup>	79,96 ± 0,15 <sup>c</sup>
20 %	84,28 ± 0,46 <sup>b</sup>	5,68 ± 0,30 <sup>e</sup>	27,13 ± 0,74 <sup>e</sup>	27,71 ± 0,76 <sup>e</sup>	78,18 ± 0,51 <sup>b</sup>
PF	69,50 ± 3,18 <sup>a</sup>	16,05 ± 0,42 <sup>f</sup>	43,50 ± 2,64 <sup>f</sup>	46,37 ± 2,52 <sup>f</sup>	69,71 ± 1,11 <sup>a</sup>

SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква; 5-20 % – мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; средните вредности во колоните со мали букви статистички значајно се разликуваат ( $p = 0,05$ ).

Контролниот примерок на SWF покажа колориметриски параметри типични за рафинирано пченично брашно, при што доминираше висока вредност на светлината ( $L^* = 91,00 \pm 0,95$ ), што ја одразува неговата карактеристична светло-бела појава. Многу ниската вредност на  $a^*$  ( $1,03 \pm 0,10$ ) укажува на речиси незабележливо присуство на црвени тонови, додека умерената вредност на  $b^*$  ( $10,13 \pm 0,62$ ) укажува на блага жолта нијанса, карактеристична за пченичното брашно како резултат на другите каротеноидни соединенија. Ниската вредност на хромата ( $C^* = 10,18 \pm 0,62$ ) дополнително потврдува слаб вкупен интензитет на бојата, додека релативно високиот агол на нијансите ( $h^\circ = 84,3 \pm 0,29$ ) укажува на доминација на жолтата компонента во однос на црвената. Овие наоди се во согласност со претходните истражувања, според кои бојата на пченичното брашно главно е резултат на ниската концентрација на пигментни соединенија (Weldeyohanis Gebremariam et al., 2024).

Инкорпорирањето PF во концентрации од 5 % до 20 % доведе до постепено затемнување на бојата на мешавините, што се рефлектира преку континуирано намалување на  $L^*$  вредностите (од  $89,23 \pm 0,59$  до  $84,28 \pm 0,46$ ). Овој ефект се поврзува со природната содржина на каротеноиди во тиквата. Истовремено, забележаното зголемување на  $a^*$  (од  $1,98 \pm 0,30$  до  $5,68 \pm 0,30$ ) и на  $b^*$  параметрите (од  $14,28 \pm 0,39$  до  $27,13 \pm 0,74$ ) укажува на интензивирање на црвените и на жолтите тонови, што е во согласност со карактеристичната пигментација на тиквата (Davoudi et al., 2020). Како резултат на овие промени, дојде до значително зголемување на заситеноста и на вкупниот интензитет на бојата ( $C^*$  од  $14,41 \pm 0,42$  до  $27,71 \pm 0,76$ ), додека намалувањето на аголот на нијансите (од  $82,14 \pm 0,95$  на  $78,18 \pm 0,51$ ) укажува на поместување кон поизразени црвено-жолти тонови.

Примерокот на PF се одликуваше со значително пониска светлина ( $L^* = 69,50 \pm 3,18$ ), придружена со високи вредности на  $a^*$  ( $16,05 \pm 0,42$ ) и на  $b^*$  ( $43,50 \pm 2,64$ ), што резултираше со изразена заситеност на бојата ( $C^* = 46,37$ ) и со понизок агол на нијансите ( $h^\circ = 69,71 \pm 1,11$ ). Ваквиот колориметриски профил целосно е усогласен со

литературните податоци, кои интензивната боја на PF ја поврзуваат со неговата висока содржина на каротеноиди, особено  $\beta$ -каротен (Davoudi et al., 2020; Aktas & Gerçekaslan, 2024). Забележаното намалување на светлината и изразеното поместување кон жолто-црвени тонови се во согласност со резултатите од претходни истражувања (Aktas & Gerçekaslan, 2024).

Статистичката анализа на вредностите на параметрите на боја кај примероците (табелата 13) покажува дека постојат значајни разлики меѓу примероците во рамките на секој параметар, што е означено со различни мали букви во истите колони. Генерално, со зголемување на уделот на PF во мешавините се забележува постепена и статистички потврдена промена на бојата:  $L^*$  (светлина) опаѓа, што укажува на потемнување, додека  $a^*$  и  $b^*$  најчесто се зголемуваат, што упатува на поизразени црвеникави и жолтеникави тонови. Соодветно,  $C^*$  (хрома/заситеност) покажува тренд на зголемување, што значи поинтензивна боја, а  $h^\circ$  (тонски агол) има тенденција на намалување, што укажува на поместување на нијансата во однос на контролниот примерок. Дополнително, PF како самостоен примерок статистички се издвојува од SWF и од композитните мешавини, што потврдува дека неговата природна пигментација и неговиот состав значајно го менуваат колорниот профил на системот.

#### **4.1.7 Антиоксидативни карактеристики и содржина на редуцирачки шеќери во примероците**

Екстрактите добиени од примероците на пченично брашно, композитните брашна и на брашното од тиква беа подложени на анализа за да се карактеризираат нивниот антиоксидативен потенцијал и содржината на редуцирачки шеќери. Податоците за содржината на редуцирачки шеќери се прикажани во табелата 14, додека резултатите за вкупната содржина на полифеноли, антиоксидантната активност и за оксидативно-редукциските својства на мешавините од мека пченица и од брашно од тиква се сумирани во табелата 15.

Контролниот примерок (SWF) покажа гликозен еквивалент од  $2,60 \pm 0,18$  mg GE/g CM, што е во рамките на очекуваните вредности за пченично брашно и ја одразува неговата природна содржина на редуцирачки шеќери. Оваа вредност главно произлегува од присуството на резидуални количини на малтоза и на гликоза, кои остануваат по процесите на зреење, мелење и на технолошка обработка на пченичните зрна. Како таква, таа претставува соодветна референтна основа за процена на ефектот од додавањето PF врз профилот на редуцирачки шеќери во композитните мешавини.

Табела 14: Содржината на редуцирачките шеќери изразена како еквивалент на гликоза во мешавини од брашно од тиква и од мека пченица

Примерок	Редуцирачки шеќери (mg GE/ g CM)
SWF	2,60 ± 0,18 <sup>a</sup>
5 %	3,51 ± 0,14 <sup>b</sup>
10 %	4,08 ± 0,09 <sup>c</sup>
15 %	5,13 ± 0,07 <sup>d</sup>
20 %	5,85 ± 0,05 <sup>e</sup>
PF	8,55 ± 0,03 <sup>f</sup>

SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква; 5-20 % – мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; GE – еквивалентна вредност на гликоза; CM – сува материја; средните вредности во колоните со мали букви статистички значајно се разликуваат ( $p = 0,05$ ).

Со постепено зголемување на концентрацијата на PF од 5 % до 20 %, беше регистриран јасен, линеарен и статистички значаен пораст на концентрацијата на редуцирачките шеќери (табела 14). При 5 % инкорпорирање, гликозниот еквивалент се зголеми на  $3,51 \pm 0,14$  mg GE/g CM, што укажува на директното влијание на PF врз содржината на редуцирачките шеќери на мешавините. Овој тренд продолжи и при повисоки нивоа на додавање, со вредности од  $4,08 \pm 0,09$  mg GE/g CM,  $5,13 \pm 0,07$  mg GE/ g CM и  $5,85 \pm 0,05$  mg GE/ g CM за 10 %, 15 % и 20 % PF, соодветно. Највисока содржина на редуцирачки шеќери беше забележана кај чистиот PF примерок, со гликозен еквивалент од  $8,55 \pm 0,03$  mg GE/ g CM, што претставува повеќе од трикратно зголемување во споредба со контролниот примерок на SWF. Изразениот пораст на редуцирачките шеќери во композитните мешавини го објаснува забележаниот линеарен тренд и директно ја одразува природната јаглехидратна структура на тиквата, која вклучува присуство на слободни шеќери, како и можни делумно хидролизирани полисахариди како последица на термичката обработка и на сушењето при производството на брашното. Ваквото систематско зголемување има важни технолошки и нутритивни импликации за финалните производи бидејќи може да влијае врз кинетиката на ферментацијата, како и врз интензитетот на Мејлардовата реакција за време на печењето. Претходни истражувања укажуваат на тоа дека природно присутните редуцирачки шеќери во PF придонесуваат за подобрен сензорен профил на печените производи. Сепак, Тедом и соработниците (Tedom et al., 2019) покажале дека инкорпорирањето PF може, во одредени случаи, да резултира со намалена содржина на шеќери во финалниот производ, што укажува на значајната улога на сортата, зрелоста и на составот на тиквата во одредувањето на функционалните својства на композитните формулации.

Табела 15: Вкупна содржина на полифеноли и антиоксидативен потенцијал на примероците брашно

Примерок	TPC (mg GAE/g CM)		DPPH (mg TE/g CM)		ABTS (mg TE /g CM)		FRAP ( $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g CM}$ )	
	H <sub>2</sub> O	EtOH	H <sub>2</sub> O	EtOH	H <sub>2</sub> O	EtOH	H <sub>2</sub> O	EtOH
SWF	0,19 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	76,2 ± 3,3 <sup>a</sup>	205,8 ± 7,5 <sup>a</sup>	3399,8 ± 149,1 <sup>a</sup>	754,8 ± 42,8 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,87 ± 0,12 <sup>a</sup>
5 %	0,28 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>b</sup>	110,0 ± 3,5 <sup>b</sup>	415,6 ± 7,8 <sup>b</sup>	3927,7 ± 17,1 <sup>b</sup>	866,0 ± 26,8 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,54 ± 0,02 <sup>b</sup>
10 %	0,42 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>	166,7 ± 6,9 <sup>c</sup>	457,7 ± 18,5 <sup>c</sup>	4451,3 ± 10,6 <sup>c</sup>	987,5 ± 13,2 <sup>c</sup>	1,85 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,82 ± 0,24 <sup>bc</sup>
15 %	0,48 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>d</sup>	200,3 ± 3,0 <sup>d</sup>	486,5 ± 1,8 <sup>c</sup>	4928,3 ± 72,6 <sup>d</sup>	1176,1 ± 3,1 <sup>d</sup>	2,98 ± 0,29 <sup>b</sup>	7,35 ± 0,02 <sup>cd</sup>
20 %	0,57 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>e</sup>	237,6 ± 7,5 <sup>e</sup>	557,6 ± 7,8 <sup>d</sup>	5158,6 ± 112,6 <sup>d</sup>	1389,5 ± 27,4 <sup>e</sup>	3,69 ± 0,14 <sup>b</sup>	7,69 ± 0,06 <sup>d</sup>
PF	1,22 ± 0,02 <sup>f</sup>	0,98 ± 0,03 <sup>f</sup>	752,9 ± 6,7 <sup>f</sup>	1042,7 ± 23,8 <sup>e</sup>	7685,1 ± 136,3 <sup>e</sup>	2484,4 ± 22,8 <sup>f</sup>	20,24 ± 1,00 <sup>c</sup>	32,42 ± 0,51 <sup>e</sup>
Примерок	***		***		***		***	***
Растворувач	***		***		***		***	***
Примерок x растворувач	***		***		***		***	***

SWF – меко пченично брашно; PF – брашно од тиква; 5-20 % – мешавини брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; CM – сува материја; GAE – гална киселина еквиваленти по грам сува материја; TE – Trolox еквиваленти по грам сува материја; FeSO<sub>4</sub> - еквиваленти по грам сува материја; средните вредности во колоните со мали букви статистички значајно се разликуваат ( $p = 0,05$ ). \*\*\* - статистички значајно ( $p < 0,001$ ).

Контролниот примерок од пченично брашно се одликуваше со биоактивен профил типичен за овој вид суровина (табела 15). Вкупната содржина на фенолни соединенија (TPC) изнесуваше  $0,19 \pm 0,00$  mg GAE/g CM кај водените екстракти и  $0,05 \pm 0,01$  mg GAE/g CM кај етанолните екстракти. Антиоксидантната активност, одредена преку методот DPPH, покажа вредности од  $76,2 \pm 3,3$  mg TE/g CM за водениот и  $205,8 \pm 7,5$  mg TE/g CM за етанолниот екстракт. Дополнително, анализата ABTS регистрираше  $3399,8 \pm 149,1$  mg TE/g CM кај водениот екстракт и  $754,8 \pm 42,8$  mg TE/g CM кај етанолниот екстракт. Оксидативно-редукцискиот капацитет, изразен преку тестот FRAP, достигна  $0,87 \pm 0,03$   $\mu\text{M FeSO}_4$  /g CM кај водените екстракти и  $5,87 \pm 0,12$   $\mu\text{M FeSO}_4$  /g CM кај етанолните екстракти. Овие резултати претставуваат основа за процена на влијанието од инкорпорирањето на PF врз антиоксидантниот потенцијал и врз редукциските својства на композитните мешавини.

Со постепено зголемување на концентрацијата на PF од 5 % до 20 %, беше забележано зголемување на вредностите кај сите испитувани показатели поврзани со биоактивниот профил. Вкупната содржина на фенолни соединенија континуирано се зголемуваше и кај водните и кај етанолните екстракти, достигнувајќи вредности од  $0,57 \pm 0,01$  mg GAE/g CM и  $0,34 \pm 0,01$  mg GAE/g CM, соодветно, кај примероците со највисокото ниво на брашно од тиква (20 %). Паралелно со ова, антиоксидантната активност значително се засили, при што вредностите на DPPH достигнаа  $237,6 \pm 7,5$  mg TE/g CM за водените и  $557,6 \pm 7,8$  mg TE/g CM за етанолните екстракти. Анализата ABTS покажа сличен тренд, со максимални вредности од  $5158,6 \pm 112,6$  mg TE/g CM и  $1389,5 \pm 27,4$  mg TE/g CM за водените и за етанолните екстракти, соодветно. Слично, оксидативно-редукцискиот капацитет (FRAP) значително се зголеми и достигна  $3,69 \pm 0,14$   $\mu\text{M FeSO}_4$  /g CM за водениот и  $7,69 \pm 0,06$   $\mu\text{M FeSO}_4$  /g CM за етанолниот екстракт при 20 % инкорпорација на PF.

Во споредба со композитните мешавини, PF покажа значително повисоки вредности кај сите анализирани параметри. TPC достигна  $1,22 \pm 0,02$  mg GAE/g CM кај водните и  $0,98 \pm 0,03$  mg GAE/g CM кај етанолните екстракти. Антиоксидантната активност беше изразена преку вредности на DPPH од  $752,9 \pm 6,7$  mg TE/g CM за водените и  $1042,7 \pm 23,8$  mg TE/g CM за етанолните екстракти, додека анализата ABTS регистрираше  $7685,1 \pm 136,3$  mg TE/g CM и  $2484,4 \pm 22,8$  mg TE/g CM, соодветно. Оксидативно-редукцискиот потенцијал, одреден со тестот FRAP, покажа изразено високи вредности, достигнувајќи  $20,24 \pm 1,00$   $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> /g CM кај водените и  $32,42 \pm 0,51$   $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> /g CM кај етанолните екстракти, што ја потврдува исклучително високата биоактивност на PF.

За да се процени влијанието на типот на екстракт и на нивото на додавање на PF врз биоактивните својства, беше применета двонасочна анализа на варијанса (ANOVA). Анализата откри статистички значајни разлики кај сите испитувани параметри. Генерално, водените екстракти покажаа повисоки вредности за TPC и за ABTS, додека етанолните екстракти доминираа кај активноста DPPH и кај параметарот FRAP, што укажува на селективната способност на растворувачите за екстракција на различни класи на биоактивни соединенија. Антиоксидантната активност проценета со тестот ABTS, кој ја мери способноста за неутрализација на радикалите ABTS<sup>•+</sup>, беше значително зависна од типот на екстракт и во одредени случаи беше и до 4,5 пати повисока при етанолна екстракција. Дополнително, сите варијанти со PF, без разлика на типот на екстракт, покажаа значително повисока антиоксидантна активност во споредба со контролната суровина.

Овие резултати се усогласени со наодите на Жанг и соработниците (Zhang et al., 2011), кои утврдиле пониска способност на водените екстракти од пченица за неутрализација на радикалите ABTS<sup>•+</sup> во споредба со етанолните екстракти. И Жу и соработниците (Zhu et al., 2011) покажале дека антиоксидантната активност одредена со методот DPPH е приближно 2,7 пати повисока кај етанолни екстракти, со максимална активност при концентрација од 70 % етанол. Во согласност со овие наоди, додавањето PF доведе до значително зголемување на активноста DPPH кај сите мешавини, и кај водените и кај етанолните екстракти, при што поизразен ефект беше забележан кај водените екстракти. Сепак, различен тренд е пријавен од Пина и соработниците (Pinna et al., 2024), кои утврдиле дека највисоките антиоксидантни својства кај тиквата се постигнуваат при водено-етанолна екстракција со концентрација на етанол до 50 %.

Зголемувањето на концентрацијата на PF имаше изразен ефект врз редуktivната активност (FRAP), особено кај примероците добиени со етанолна екстракција, каде што беше регистриран јасен и статистички значаен пораст на вредностите. Кај водените екстракти, значително подобрување на редуцирачката способност беше забележано само кај варијантите со 15 % и 20 % инкорпорација на PF. Спротивно на овие резултати, Пина и соработниците (Pinna et al., 2024) пријавиле дека водено-етанолните екстракти од тиква со содржина на етанол под 50 % покажуваат пониска редуцирачка активност во споредба со екстракти метанол-вода во сооднос 80:20. Овие разлики најверојатно

произлегуваат од варијабилноста на биоактивниот состав, кој е силно зависен од сортата на тиквата, агротехничките услови, типот на фертилизација и од сезоната на одгледување.

Анализата на вкупната содржина на полифенолни соединенија кај SWF, изведена со методот Folin–Ciocâlțeu, покажа дека екстракцискиот медиум има значително влијание врз детерминираниите вредности. И кај водените и кај етанолните екстракти, сите формулации што содржат PF покажаа значително повисока концентрација на полифеноли во споредба со контролниот примерок. Ова однесување може да се објасни преку различната способност на фенолните соединенија да формираат комплекси со јагленхидрати и со протеини, кои се екстрахираат со различна ефикасност во зависност од поларитетот на растворувачот и од сортните карактеристики на анализираната суровина (Bonoli et al., 2004).

Дополнително, резултатите укажуваат на тоа дека водените екстракти генерално содржат поголеми количини на полифенолни соединенија во споредба со етанолните. Овој ефект најверојатно е поврзан со поларната природа на доминантните фенолни киселини во тиквата, како галната и хлорогената киселина, кои покажуваат повисока растворливост во вода отколку во алкохолни растворувачи (Batool et al., 2022), при што зголемувањето на концентрацијата на PF доведува до поизразено зголемување на содржината на полифеноли во водните екстракти. Кулчински и соработниците (Kulczyński et al., 2020) утврдиле дека водните екстракти од тиквата *Cucurbita maxima*, сорта „Melonowa Żółta“ покажале повисоки вредности за содржина на вкупни полифеноли (255,69 mg GAE/100 g сува материја) во однос на екстрактите добиени со примена на комбинација на растворувачите метанол и вода (232,5 mg GAE/100 g сува материја). Овој феномен дополнително се поврзува со присуството на специфични фенолни киселини, вклучувајќи ја сиригинската киселина (Kostecka-Gugała et al., 2020; Stryjecka et al., 2023;).

Покрај зголемената содржина на полифеноли, инкорпорирањето PF значително ја засили и антиоксидантната активност на мешавините, што е потврдено со зголемени вредности на DPPH и со подобрен антиоксидативен потенцијал (Liubych et al., 2023a). Оваа сеопфатна анализа јасно покажува дека додавањето PF доведува до значително унапредување на биоактивниот профил на композитните мешавини на начин зависен од концентрацијата, при што истовремено се забележуваат разлики во ефикасноста на екстракцијата во зависност од поларитетот на користениот растворувач.

Понатаму, воспоставената поврзаност помеѓу колориметриските својства, кои потекнуваат од растителните пигменти на тиквата, содржината на редуцирачки шеќери и биоактивните параметри има значајни технолошки импликации. Овие резултати сугерираат дека визуелните карактеристики на суровината можат да послужат како првичен индикатор за биоактивниот потенцијал, додека контролата на шеќерната содржина претставува клучен фактор при дефинирање на условите за обработка, а со цел оптимизирање и на сензорните својства и на нутритивната вредност на финалните производи.

## 4.2 АНАЛИЗА НА ПРИМЕРОЦИТЕ ЛЕБ

Втората експериментална фаза опфаќа анализа на произведените лебови со различен процент на брашно од тиква (5 %, 10 %, 15 % и 20 %) и со различно времетраење на ферментација (1Н и 2Н) за да се процени влијанието на овие фактори врз квалитетните, физичко-хемиските, текстурните и врз функционалните својства на готовиот производ.

Во оваа фаза се извршени мерења на специфичната маса, волуменот, загубата на маса при печење, активноста на вода, бојата, порозноста и текстурата, а направени се и анализи на антиоксидантниот профил, редуцирачките шеќери (DNS) и на акриламидот. Дел од анализите, особено оние поврзани со физичко-хемиските својства, текстурата и со бојата, беа изведени веднаш по печењето (0 ден) и по 7 дена складирање, за да се следат стабилноста и промените на производот со текот на времето. Од друга страна, анализите на антиоксидантна активност, редуцирачките шеќери и на акриламидот беа спроведени кај лебовите со едночасовна (1Н) и со двочасовна (2Н) ферментација, за да се оцени влијанието на процесните услови врз антиоксидативниот потенцијал и врз формирањето акриламид.

Целта на оваа фаза беше да се утврди синергетскиот ефект од реформулирањето на рецептурата (замена на дел од пченичното брашно со брашно од тиква) и од приспособувањето на технолошкиот процес (времметраење на ферментацијата) врз структурата и врз безбедноста на лебот, особено во контекст на намалување на содржината на акриламид. Резултатите добиени во оваа фаза претставуваат основа за дискусија на технолошките и на здравствените аспекти на иновативниот производ и овозможуваат подлабоко разбирање на заемната поврзаност меѓу составот, ферментацијата и квалитетот на лебот.

### 4.2.1 Волумен и површина на примероците леб

Во текот на ферментацијата, квасецот создава меури од јаглерод диоксид ( $\text{CO}_2$ ) кои се задржуваат во глутенската мрежа на тестото. Паралелно со тоа, ензимските реакции ги менуваат структурата на протеините и функционалните својства на скробот, па затоа следењето на волуменот и површината е клучно за да се разбере како се развива тестото. Во табелата 16 се прикажани промените на волуменот и на површината кај примероците од леб во две временски точки на мерење (0 – ден на печење; 7 – по 7 дена од печењето), како и при различни времиња на ферментација, односно при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација на тестото.

Табела 16: Волумен и површина на лебот добиен при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, определени веднаш по печењето и по 7 дена складирање

Ферментација	Волумен (cm <sup>3</sup> )				Површина (cm <sup>2</sup> )			
	1Н		2Н		1Н		2Н	
	0	7	0	7	0	7	0	7
Примерок								
SWF	189,9±0,7 <sup>d</sup>	195,5±1,0 <sup>d</sup>	178,5±1,4 <sup>d</sup>	195,1±1,4 <sup>c</sup>	18,16±0,10 <sup>d</sup>	17,81±42,8 <sup>a</sup>	17,16±0,11 <sup>d</sup>	18,5±0,05 <sup>d</sup>
5 %	168,8±2,7 <sup>c</sup>	171,9±2,2 <sup>c</sup>	172,1±0,4 <sup>c</sup>	181,8±1,6 <sup>d</sup>	16,91±0,09 <sup>c</sup>	16,78±26,8 <sup>b</sup>	16,9±0,04 <sup>a</sup>	17,58±0,13 <sup>c</sup>
10 %	182,1±1,4 <sup>d</sup>	176,9±3,8 <sup>c</sup>	169,9±1,4 <sup>c</sup>	172,7±3,3 <sup>c</sup>	17,73±0,06 <sup>d</sup>	17,2±13,2 <sup>c</sup>	16,51±0,28 <sup>cd</sup>	17,01±0,25 <sup>b</sup>
15 %	156,5±9,2 <sup>b</sup>	154,9±2,0 <sup>b</sup>	151,5±0,1 <sup>b</sup>	162,3±2,5 <sup>b</sup>	16,02±0,59 <sup>b</sup>	15,86±3,1 <sup>d</sup>	15,62±0,06 <sup>c</sup>	16,46±0,11 <sup>a</sup>
20 %	135,5±0,1 <sup>a</sup>	140,5±1,5 <sup>a</sup>	137,3±3,2 <sup>a</sup>	145,4±0,8 <sup>a</sup>	14,63±0,80 <sup>a</sup>	14,82±0,04 <sup>a</sup>	14,51±0,48 <sup>b</sup>	16,31±0,11 <sup>a</sup>
Примерок (П)	***		***		***		***	
Старење Ден (Д)	***		***		***		***	
Ферментација (Ф)	ns		ns		ns		ns	
П x Ф	ns		ns		ns		ns	
Д x Ф	***		***		***		***	
П x Д	***		***		***		***	
П x Ф x Д	***		***		***		***	

SWF (контрола) – леб добиен од меко пченично брашно; 5–20 % – леб добиен од мешавина брашно со соодветен процент на додадено брашно од тиква; 1Н едночасовна, 2Н двочасовна – време на ферментација; 0, 7 – временски точки на мерење (0 – ден на печење; 7 – по 7 дена); малите букви означуваат дека вредностите во дадената колона статистички се различни ( $p = 0,05$ ); \*\*\* – статистички значајна разлика при  $p < 0,001$ ; ns – без статистички значајна разлика при  $p = 0,05$

Контролниот леб (SWF) и во двата режима на ферментација се издвојува со стабилни и високи вредности на волумен: при двочасовна ферментација изнесува  $178,5 \pm 1,4 \text{ cm}^3$  на ден 0 и по складирање достигнува  $195,1 \pm 1,4 \text{ cm}^3$ , додека по едночасовна ферментација почетниот волумен е  $189,9 \pm 0,7 \text{ cm}^3$  и по седум дена се зголемува на  $195,5 \pm 1,0 \text{ cm}^3$ . Овие промени упатуваат на добра способност за задржување гас и на стабилност на матрицата и по печењето, односно дека складирањето кај контролата не доведува до деградација на структурата во мерените параметри.

Кај примероците со додаток на брашно од тиква (PF), најповолниот резултат за волумен најчесто се појавува при умерено збогатување. По едночасовна ферментација, највисок волумен меѓу експерименталните е забележан кај 10 % PF ( $182,1 \pm 1,4 \text{ cm}^3$ ), што може да се толкува како функционална граница каде што се подобрува хидратацијата и се поддржува развојот на тестото без изразено нарушување на глутенската мрежа. Наспроти тоа, со понатамошно зголемување на PF над 10 % се јавува прогресивно намалување на волуменот, најизразено кај 20 % PF ( $135,5 \pm 0,1 \text{ cm}^3$ ), најверојатно поради разредување на глутенската матрица и поради зголемена густина на тестото.

Истовремено, трендовите кај површината се усогласени со промените во волуменот и се слични при двата режима на ферментација: највисоки вредности се регистрирани кај контролниот и кај примерокот со 10 % PF (приближно  $17\text{--}18 \text{ cm}^2$ ), додека со пораст на процентот на PF, вредностите постепено опаѓаат. Ова намалување може да се поврзе со редукција на бројот/големината на гасните ќелии и со нивна понеенеднаква распределба во тестото, што резултира со поцврста и помалку еластична структура. Најниските површински вредности се измерени кај 20 % PF ( $14,63 \pm 0,8 \text{ cm}^2$ ),

што дополнително укажува дека високите концентрации на PF ја ограничуваат експанзијата и го нарушуваат интегритетот на глутенската матрица.

Од примероците збогатени со PF остануваат пониски во споредба со контролата и покажуваат јасен тренд на намалување на волуменот со зголемување на PF. Овој ефект најверојатно е поврзан со слабеење на глутенската мрежа поради намалената застапеност на глутенин и на глиадин, кои се клучни за ефикасно задржување CO<sub>2</sub>, особено кога ферментацијата е продолжена. Како што наведуваат Ружиљо и соработниците (Różyło et al., 2014) и Давуди и соработниците (Davoudi et al., 2020), при повисоки нивоа на PF (особено над 20 %) се очекуваат поголема компактноста на тестото и намалена еластичност, што директно се одразува со помал волумен на векната.

Статистичката обработка потврди високо значајни разлики ( $p < 0,001$ ) меѓу различните типови примероци, како и значајни интеракции меѓу факторите „примерок (П)“ и „староста на лебот (денови после печењето, Д)“, што укажува дека составот и складирањето делуваат заеднички врз физичките параметри. Спротивно на тоа, времетраењето на ферментацијата како самостоен фактор не покажа статистички значаен ефект, што сугерира дека формулацијата (уделот на PF во брашното) има поголема улога од продолжената ферментација во определувањето на волуменот и на површината.

Во литературата се среќаваат и варијации во однесувањето на збогатените лебови со PF. Љубич и соработниците (Liubych et al., 2023b) пријавуваат дека по едночасовна ферментација лебовите со PF може да имаат и повисок почетен волумен од контролата, што го објаснуваат со поинтензивна ензимска активност и со подобрена хидратација на одредени диететски влакна, присутни како компоненти во PF. Сепак, при двочасовна ферментација и тие забележуваат ослабување на глутенската мрежа и намалено задржување гас, со последователен пад на волуменот. Дополнително, Си и соработниците (See et al., 2007) и Ашраф и соработниците (Ashraf et al., 2020) потврдуваат дека умерено збогатување (до 5 %) најчесто дава најповолен волумен на векна, додека понатамошното зголемување има обратен ефект поради структурни и хидратациски ограничувања на тестото.

Севкупно, добиените резултати најконзистентно упатуваат на тоа дека оптималната концентрација на брашно од тиква во формулацијата е приближно 5–10 %, бидејќи во тој опсег се поддржува порамномерна микроструктура со подобра експанзија и со постабилна матрица. Со зголемување на PF над овој опсег се засилува негативното влијание врз глутенската мрежа, што се рефлектира преку намалување и на волуменот и на површината, односно преку пониска специфична волуменска способност на лебот.

## 4.2.2 Специфичен волумен на примероците леб

Според податоците прикажани во табелата 17, специфичниот волумен ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) се менува забележливо во зависност од концентрацијата на брашно од тиква во формулацијата и од времетраењето на ферментацијата, при што се забележуваат јасни варијации меѓу примероците.

Во резултатите со едночасовна ферментација (1Н), контролниот леб (SWF) постигнува највисок специфичен волумен на ден 0 ( $2,25 \pm 0,01 \text{ cm}^3/\text{g}$ ), а по 7 дена складирање вредноста дополнително се зголемува на  $2,35 \pm 0,03 \text{ cm}^3/\text{g}$ , што упатува на добра структурна стабилност и на одржливо задржување на гасните ќелии со текот на времето. Слично, при двочасовна ферментација (2Н), контролниот примерок повторно доминира со највисоки вредности ( $2,40 \pm 0,01 \text{ cm}^3/\text{g}$  на ден 0 и  $2,32 \pm 0,00 \text{ cm}^3/\text{g}$  по 7 дена), што потврдува дека контролата задржува поволна микроструктура независно од времетраење на ферментација.

Табела 17: Специфичен волумен на леб добиен при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, определени веднаш по печењето и по 7 дена складирање

Ферментација	Специфичен Волумен ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )			
	1Н		2Н	
Примерок	0	7	0	7
SWF	$2,25 \pm 0,01^d$	$2,35 \pm 0,03^e$	$2,40 \pm 0,01^d$	$2,32 \pm 0,00^e$
5 %	$2,13 \pm 0,01^c$	$2,25 \pm 0,02^d$	$2,07 \pm 0,03^c$	$2,03 \pm 0,01^c$
10 %	$2,12 \pm 0,03^c$	$2,15 \pm 0,04^c$	$2,12 \pm 0,06^c$	$2,17 \pm 0,01^d$
15 %	$1,87 \pm 0,01^b$	$2,01 \pm 0,01^b$	$1,88 \pm 0,02^b$	$1,89 \pm 0,12^b$
20 %	$1,69 \pm 0,03^a$	$1,80 \pm 0,00^a$	$1,69 \pm 0,02^a$	$1,61 \pm 0,00^a$
Примерок (П)		***		***
Старење (Д)		***		***
Ферментација (Ф)		***		***
П x Ф		***		***
Д x Ф		ns		ns
П x Д		***		***
П x Ф x Д		ns		ns

SWF (контрола) – меко пченично брашно; 5–20 % – додавање брашно од тиква; 1Н едночасовна, 2Н двочасовна – време на ферментација; 0, 7 – временски точки на мерење (0 – ден на печење; 7 – по 7 дена); малите букви означуваат дека вредностите во дадената колона статистички се различни ( $p = 0,05$ ); \*\*\* – статистички значајна разлика при  $p < 0,001$ ; ns – без статистички значајна разлика при  $p = 0,05$

Во различни истражување честопати се наведува дека додавањето брашно од тиква води кон намалување на специфичниот волумен, при што најизразени разлики се забележуваат меѓу контролата и лебовите збогатени до 10 % PF (Hussain et al., 2022b; El-Demery, 2011). Овој ефект најчесто се поврзува со разредување на глутенската мрежа, што ја ограничува способноста на тестото да задржи  $\text{CO}_2$  за време на ферментацијата и на печењето, а дополнително може да биде засилен и од високата содржина на диететски влакна во PF, кои преку физичка интерференција и апсорпција на вода ја нарушуваат

стабилноста на гасните меури и ја зголемуваат веројатноста за колапс на клеточната структура при печење (See et al., 2007; Escalada et al., 2011).

Овој механизам е конзистентен со трендовите добиени во тековната анализа: кај сите примероци збогатени со PF се забележуваат пониски вредности во споредба со контролата, со јасен пад на специфичниот волумен како што расте концентрацијата на PF. Најниските вредности повторно се јавуваат кај 20 % PF – во 1Н ферментација ( $1,69 \pm 0,03 \text{ cm}^3/\text{g}$  на ден 0 и  $1,80 \pm 0,00 \text{ cm}^3/\text{g}$  по 7 дена), како и во услови на 2Н ферментација ( $1,69 \pm 0,02 \text{ cm}^3/\text{g}$  на ден 0 и  $1,61 \pm 0,00 \text{ cm}^3/\text{g}$  на ден 7), што укажува на тоа дека високите нивоа на PF носат изразени структурни ограничувања.

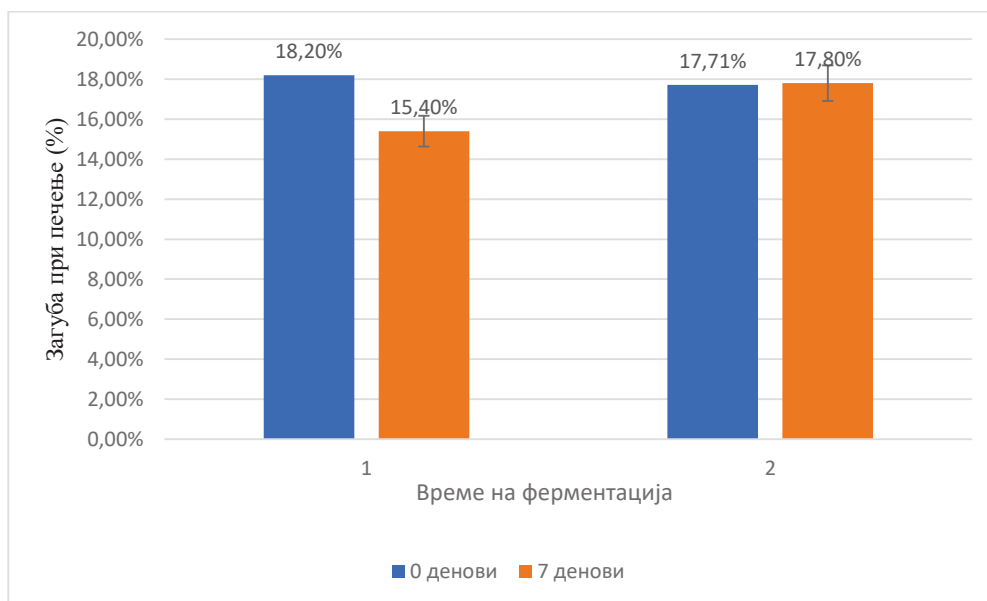
Сепак, литературата укажува на тоа дека ефектот може да биде зависен од формата и од нивото на збогатување, при што умерените концентрации понекогаш имаат најповолен исход. Си и соработниците (See et al., 2007) наведуваат дека лебот со 5 % PF покажал највисок специфичен волумен во споредба со контролата и со примероците со 10 % и со 15 % PF, а и Хоца и соработниците (Hoxha et al., 2023) потврдуваат дека 5 % PF дава најдобар волумен во однос на 10 %, 15 % и 25 %, што ја засилува тезата за „оптимум“ при умерено збогатување. Паралелно со овие наоди, постојат и истражување со спротивен тренд: Љубич и соработниците (Liubych et al., 2023b) забележуваат пораст на специфичниот волумен при додавање 5–20 % паста од тиква во пченични лебови, што го објаснуваат со тоа дека во тој опсег не се зголемила значајно масата на векната, па тестото можело да се прошири без изразено нарушување на структурата. Ова укажува на тоа дека не само процентот, туку и матрицата/формата на тиквениот додаток може да ги модифицира реологијата и специфичниот волумен.

Статистичката обработка дополнително ја потврди варијабилноста на специфичниот волумен на повеќе фактори: утврдени се високо значајни ефекти ( $p < 0,001$ ) помеѓу староста на лебот (денови после печењето, Д), времетраењето на ферментацијата (Ф) и видот на примерок (П), како и за интеракциите  $П \times Ф$  и  $П \times Д$ . Сепак, интеракциите  $Д \times Ф$  и  $П \times Ф \times Д$  не покажаа статистички значајни разлики (ns), што укажува на тоа дека влијанието на староста на лебот (денови после печењето, Д), врз специфичниот волумен не е зависно од времето на ферментација (Ф). Дополнително, нестатистичката значајност на интеракцијата  $П \times Ф \times Д$  покажува дека нема значајна заемна интеракција помеѓу составот на примерокот (П), времето на ферментација (Ф) и староста на лебот (денови после печењето, Д), односно дека овие параметри не дејствуваат синергетски за да предизвикаат промени во специфичниот волумен, напротив тие дејствуваат независно еден од друг во однос на специфичниот волумен.

Севкупно, и добиените податоци и споредбата со претходни студии упатуваат на тоа дека концентрации од околу 5–10 % PF најчесто обезбедуваат најдобар баланс помеѓу хидратацијата, формирањето/одржувањето на структурата и задржувањето на гас. Со зголемување на PF над овој опсег, ефектот на разредување на гутенската мрежа и влијанието на диететските влакна стануваат доминантни, што резултира со систематско намалување на специфичниот волумен.

### 4.2.3 Загуба при печење на примероците леб

Резултатите прикажани на графиконот и во спроведените анализи (графикони бр. 4 и 5) јасно покажуваат дека времетраењето на ферментацијата и процентот на додадено брашно од тиква (PF) имаат значително влијание врз задржувањето на влагата, структурата и врз стабилноста на лебот при складирање.



Графикон бр. 4: Просечна загуба при печење на примероците леб

Во графиконот бр. 4 е прикажана просечната загуба при печење (%) на примероците леб во однос на времето на ферментација (1Н и 2Н), при што синиот столб го претставува просекот од сите свежо печени примероци (0 ден) – контролниот пченичен леб (SWF) и композитните лебови со 5 %, 10 %, 15 % и 20 % додаток на брашно од тиква, ферментирани 1Н и 2Н, додека портокаловиот столб го претставува просекот од истите тие примероци по 7 дена складирање, повторно за двете времиња на ферментација. Кај примероците со едночасовна ферментација (1Н), веднаш по печењето е измерена просечна загуба при печење од 18,20 %, што претставува типична вредност за пченичен леб со стандардна влажност на тестото. По седум дена складирање, загубата при печење се намалила на приближно 15,40 %, што укажува на постепено испарување на површинската влага и на стабилизирање на влагата во внатрешен дел од лебот. Овој процес укажува на тоа дека при пократка ферментација, тестото задржува поголема компактноста, но воедно губи поголем дел од влагата во почетната фаза на складирање.

Кај лебовите со двочасовна ферментација (2Н), почетната загуба при печење (веднаш по печење) изнесувала околу 17,71 %, а по седум дена складирање се задржала на 17,80 %, што укажува на подобра способност за задржување влага и на порамномерна распределба на влагата во структурата. Подолгото време на ферментација овозможува

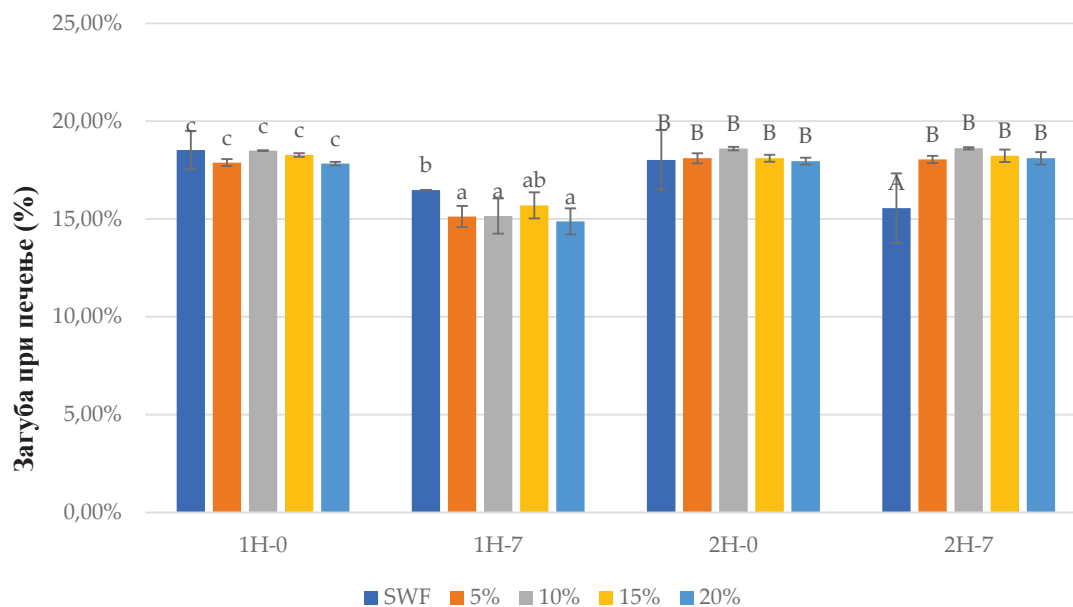
формирање поразвиена и поотворена структура на внатрешен дел од лебот, со подобра порозност и рамнотежа меѓу површинската и внатрешната влажност.

Како што нагласуваат Ружио и соработниците (Różyło et al., 2014) и Љубич и соработниците (Liubych et al., 2023b), овие разлики произлегуваат од структурните промени во глутенската мрежа што настануваат при подолга ферментација, при што ензимските активности ги модифицираат скробот и протеините, создавајќи поеластична матрица која овозможува подобро задржување вода во тестото. Ова резултира со постабилен модел на губење тежина кај двочасовно ферментирани примероци, во споредба со едночасовните, кај кои се забележува поинтензивно намалување на влагата во првите денови на складирање.

Овој ефект е од суштинско значење за одржување на свежината и на мекоста на лебот, бидејќи поголемото задржување влага го одложува процесот на стврднување (анг. retrogradation) и позитивно влијае врз текстуралните својства во подолг период на складирање (Hoxha et al., 2023). Со други зборови, оптимизацијата на времето на ферментација претставува клучен технолошки параметар за управување со влажноста, свежината и со стабилноста на лебовите произведени со додаток на брашно од тиква (Chikrah et al., 2023).

Дополнителните резултати од графиконот бр. 5, при што се прикажани поединечните резултати за сите формулации (SWF, 5 %, 10 %, 15 % и 20 % додаток на брашно од тиква) за секое време на ферментација и на складирање, покажуваат дека лебот од чисто пченично брашно (SWF) губи поголема количина вода при печење, што се должи на поотворената глутенска структура, но, сепак, одржува релативно стабилна влажност во текот на складирањето.

Со додавање 5 % брашно од тиква (5 % PF) се постигнува подобра рамнотежа меѓу хидрофилните компоненти и структурната компактност на тестото. Мало количество влакна и пектини од тиквата ја зголемуваат способноста на тестото да ја задржи влагата, без значително нарушување на глутенската мрежа, што резултира со добра влажност, стабилна структура и со задржана свежина при складирање.



SWF (контрола) – меко пченично брашно; 5–20 % – додавање брашно од тиква; 1H едночасовна, 2H двочасовна – време на ферментација; 0, 7 – временски точки на мерење (0 – ден на печење; 7 – по 7 дена); малите букви означуваат статистички значајни разлики помеѓу примероците со едночасовна ферментација при  $p = 0,05$ ; големите букви означуваат статистички значајни разлики помеѓу примероците со двочасовна ферментација при  $p = 0,05$

Графикон бр. 5: Загуба при печење на лебот

На графиконот бр. 5 е прикажана загубата при печење поединечно за секој примерок, каде што при 10 % PF, се забележува оптимален компромис меѓу волуменот, загубата на тежина и текстурната стабилност. Зголемената содржина на пектин и на диететски влакна овозможува поефикасно врзување вода, но повисокиот удел на растителни компоненти благо ја ограничува еластичноста на глутенската мрежа.

При 15 % PF, се создава погуста и покрута структура на тестото со намалена порозност, што ја ограничува почетната загуба на вода. Меѓутоа, поради зголемената содржина на диететски влакна и поради намалената еластичност на матрицата, влагата се распределува нерамномерно, што може да доведе до понабиена внатрешност и до помека кора.

Највисокиот процент, 20 % PF, резултира со најмала загуба на вода во услови на едночасовна ферментација, што се должи на високата содржина на диететски влакна кои дејствуваат како хидроколоиди, ја врзуваат слободната вода и ја намалуваат испарливоста. Сепак, ова истовремено доведува до поцврста и помалку еластична структура на внатрешниот дел од лебот. При двочасовна ферментација, глутенската мрежа дополнително се ослабува, што ограничува рамномерно задржување на влагата.

Добиените резултати јасно потврдуваат дека додавањето брашно од тиква ја намалува загубата на тежина при печење и при складирање, благодарение на хидрофилните својства на диететски влакна и на полисахаридите што ја стабилизираат

влажната во лебот. Најповолен технолошки и сензорен ефект се постигнува при 5–10 % додаток, кога лебот ги задржува свежината, еластичноста и влажноста без нарушување на структурата.

Повисоките концентрации (15–20 % PF) овозможуваат подобро задржување влага, но создаваат погуста текстура и намален волумен, што ги прави помалку пожелни од пекарски аспект. Овие резултати укажуваат на тоа дека контролираното збогатување со брашно од тиква и оптимизацијата на времето на ферментација се клучни параметри за оптимизација на свежината, структурата и на функционалните својства на лебот, со потенцијал да придонесат и за намалување на формирањето акриламида во финалниот производ.

Статистичката обработка на резултатите (графиконот бр. 5) покажува дека разликите меѓу примероците се оценувани одделно за секое време на ферментација, при што малите букви означуваат статистички значајни разлики меѓу формулациите кај едночасовна (1Н), а големите букви означуваат статистички значајни разлики меѓу примероците кај двочасовната ферментација (2Н); во рамките на истата група (1Н или 2Н) примероците што ја делат истата буква не се разликуваат значајно, додека примероците со различни букви се разликуваат значајно, со што се потврдува дали промените во загуба при печење (%) се должат на составот (процентот PF) во рамките на дадено време на ферментација и дали по складирање (0-7 дена) се менува статистичкиот однос меѓу примероците.

Генерално се забележува дека веднаш по печење нема статистички значајни разлики во загубата при печење меѓу контролниот леб (SWF) и мешавините со PF, бидејќи кај 1Н-0 сите примероци припаѓаат на истата група „с“, а кај 2Н-0 на истата група „В“, додека по 7 дена складирање разликите стануваат поизразени: кај 1Н-7 контролата SWF е во група „b“, а 5 %, 10 % и 20% се во група „a“, што укажува на тоа дека SWF има статистички повисока загуба при печење во однос на повеќето примероци со PF, при што примерокот со 15 % (ab) има меѓупозиција и не се разликува значајно ниту од „a“ ниту од „b“. Кај 2Н-7 контролата SWF е означена со „А“, додека сите мешавини со PF се „В“, што потврдува дека по двочасовна ферментација (2Н) и по 7 дена складирање SWF статистички значајно се разликува од сите композитни лебови, додека композитните примероци меѓусебно не покажуваат значајни разлики.

#### 4.2.4 Активност на вода ( $a_w$ ) и порозност на примероците леб

Резултатите за активноста на водата ( $a_w$ ) и за порозноста на примероците леб во зависност од времетраењето на ферментацијата и од периодот на складирање се прикажани во табелата 18. Овие параметри претставуваат клучни индикатори за свежината, структурната стабилност и за текстурните својства на лебот, бидејќи директно се поврзани со задржувањето влага и со развојот на внатрешната матрица.

Табела 18: Водна активност и порозност на лебот при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, веднаш по печењето и по 7 дена

Примерок	Времетраење Денови	Активност на вода, $a_w$		Порозност (%)	
		Ферментација 1Н	Ферментација 2Н	Ферментација 1Н	Ферментација 2Н
SWF	0	0,954±0,002 <sup>b</sup>	0,966±0,002 <sup>c</sup>	55,7±11,6 <sup>a</sup>	87,8±3,8 <sup>d</sup>
	7	0,958±0,006 <sup>c</sup>	0,962±0,004 <sup>c</sup>	91,6±3,6 <sup>c</sup>	90,4±4,8 <sup>c</sup>
5 %	0	0,958±0,003 <sup>b</sup>	0,962±0,003 <sup>c</sup>	53,7±7,8 <sup>a</sup>	63,3±6,2 <sup>c</sup>
	7	0,953±0,002 <sup>b</sup>	0,955±0,003 <sup>b</sup>	84,1±6,1 <sup>b</sup>	80,9±4,3 <sup>a</sup>
10 %	0	0,956±0,002 <sup>b</sup>	0,957±0,003 <sup>b</sup>	55,8±6,7 <sup>a</sup>	62,9±5,4 <sup>c</sup>
	7	0,954±0,001 <sup>bc</sup>	0,956±0,002 <sup>b</sup>	74,3±9,6 <sup>a</sup>	80,8±9,0 <sup>ab</sup>
15 %	0	0,943±0,003 <sup>a</sup>	0,953±0,003 <sup>b</sup>	54,6±5,1 <sup>a</sup>	59,0±6,1 <sup>b</sup>
	7	0,945±0,002 <sup>a</sup>	0,953±0,003 <sup>b</sup>	86,0±5,3 <sup>b</sup>	78,9±9,2 <sup>ab</sup>
20 %	0	0,945±0,002 <sup>a</sup>	0,945±0,004 <sup>a</sup>	58,5±6,1 <sup>a</sup>	49,4±6,1 <sup>a</sup>
	7	0,941±0,002 <sup>a</sup>	0,945±0,004 <sup>a</sup>	75,7±6,0 <sup>a</sup>	84,0±5,4 <sup>b</sup>
Примерок (П)			***		***
Старење (Д)			***		***
Ферментација (Ф)			ns		x
П x Ф			ns		***
Д x Ф			***		x
П x Д			***		x
П x Ф x Д			***		x

SWF (контрола) – меко пченично брашно; 5–20 % – додавање брашно од тиква; 1Н едночасовна, 2Н двочасовна – време на ферментација; 0, 7 – временски точки на мерење (0 – ден на печење; 7 – по 7 дена); малите букви означуваат дека вредностите во дадената колона статистички се различни ( $p = 0,05$ ); \*\*\* — статистички значајна разлика при  $p < 0,001$ ; ns – без статистички значајна разлика при  $p = 0,05$ ; x – нема податоци

Кај лебовите со едночасовна ферментација (1Н), контролниот примерок (SWF) започнува со активност на водата од  $0,954 \pm 0,002$ , а по седум дена складирање бележи мало зголемување до  $0,958 \pm 0,006$ . Со пораст на процентот на брашно од тиква, вредноста на  $a_w$  покажува опаѓачки тренд, при што најниски вредности се измерени кај 20 % PF ( $0,945 \pm 0,002$  на ден 0 и  $0,941 \pm 0,002$  на ден 7). Ваквото намалување е во согласност со Чикпа и соработниците (Chikpah et al., 2023) и Вонсгагонсуп и соработниците (Wongsagonsup et al., 2015), кои посочуваат дека диететските влакна и природните шеќери во брашното од тиква ја „врзуваат“ слободната вода и ја намалуваат

нејзината достапност во матрицата, што резултира со пониска вредност на  $a_w$  и со потенцијално подобра микробиолошка стабилност и свежина.

Истовремено, порозноста кај примероците добиени со едночасовна ферментација (1Н) значително се менува со складирањето. Контролниот леб има почетна порозност од  $55,7 \pm 11,6 \%$ , но по 7 дена достигнува  $91,6 \pm 3,6 \%$ , што упатува на изразени внатрешни структурни трансформации при складирањето. Кај примероците збогатени со PF, почетната порозност се движи приближно меѓу  $53 \%$  и  $58 \%$ , а по складирање сите примероци генерално покажуваат зголемување (од  $75,7 \pm 6,0 \%$  до  $91,6 \pm 3,6 \%$ ). Ова се вклопува со согледувањата дека тиквените додатоци можат да создадат поцврста и погуста структура: Паучеан и Ман (Păucean & Man, 2014) наведуваат намалување на порозноста при додавање  $15 \%$  и  $30 \%$  од месестиот дел на тиквата поради ограничена експанзија на гасот, а Ружио и соработниците (Rózyło et al., 2014) опишуваат погуста структура, помали и покомпактни пори кај лебови со тиква.

Во групата со двочасовна ферментација (2Н), контролниот леб покажува повисока почетна активност на водата ( $0,966 \pm 0,002$ ), која по седум дена се намалува на  $0,962 \pm 0,004$ . И тука, зголемувањето на концентрацијата на PF доведува до континуирано намалување на вредност на  $a_w$ , со најниска вредност кај  $20 \%$  PF ( $0,945 \pm 0,004$ ). Овие резултати може да се интерпретираат така што подолгата ферментација придонесува за порамномерна распределба на влагата и за постабилна внатрешна структура, додека присуството на диететски влакна и на шеќери од тиквата дополнително ја редуцира достапната вода преку врзување на слободната фаза.

Кај порозноста, двочасовна ферментација (2Н) генерално обезбедува повисоки почетни вредности во споредба со 1Н, при што контролниот примерок се издвојува со  $87,8 \pm 3,8 \%$ . Сепак, со секое зголемување на процентот на PF се забележува јасен пад на порозноста, а најниска почетна вредност има  $20 \%$  PF ( $49,4 \pm 6,1\%$ ). По 7 дена складирање, кај повеќето примероци порозноста повторно расте, што може да се објасни со внатрешно сушење и со појава на микропукнатини во клеточните видови, кои ја менуваат морфологијата на порите.

Поврзаноста помеѓу порозноста и волуменот останува очигледна низ складирањето. Кај примероците со едночасовната (1Н) ферментација, порастот на порозноста кај контролата ( $55,7 \pm 11,6 \%$  →  $91,6 \pm 3,6 \%$ ) се јавува паралелно со зголемувањето на волуменот ( $189,9 \pm 0,7 \text{ cm}^3$  →  $195,5 \pm 1,0 \text{ cm}^3$ ), а споредливи тенденции се забележуваат и кај другите концентрации на PF. Дополнително, примероците со двочасовна ферментација (2Н) вообичаено имаат повисоки почетни вредности на порозност и покажуваат поголема стабилност, што ја засилува тезата дека микроструктурните параметри (порозност) тесно се поврзани со макроскопските карактеристики како волуменот на лебот.

Статистичката анализа покажа високо значајни ефекти ( $p < 0,001$ ) за повеќето параметри и за нивните интеракции, што потврдува дека и времето на ферментација и концентрацијата на брашно од тиква значително влијаат врз активноста на водата и врз порозноста на лебот. Во согласност со овие наоди, микроструктурната анализа (прилог

1) откри дека при складирањето внатрешната структура се менува преку внатрешно сушење, контракција на клеточните ѕидови и преку формирање микропукнатини, кои создаваат внатрешни напрегања и се поврзуваат со проширување на волуменот. Овие структурни промени се поизразени кај примероците со повисок процент на брашно од тиква, што укажува на тоа дека диететските влакна од тиквата ја модифицираат динамиката на стареење на лебот. Следствено, резултатите ја потврдуваат хипотезата дека контролираната оптимизација на технолошките параметри (ферментација и рецептура) може да се примени како ефикасна стратегија за подобрување на структурните и сензорните својства на функционалните лебови, како и за намалување на формирањето акриламид преку регулирање на влажноста и на активноста на водата во матрицата на производот.

#### **4.2.5 Текстурен профил на примероците леб**

Профилот на текстурата на лебовите со додаток на брашно од тиква, во зависност од времето на ферментација (1Н, 2Н), на денот на печење и по седум дена складирање, е прикажан во табелата 19. Овој дел од анализата се однесува на промените во цврстината (hardness), кохезивноста (cohesiveness), еластичноста (springiness), цвакливоста (chewiness) и во стабилноста (resilience), кои се клучни индикатори за структурната стабилност и за свежината на лебот.

Табела 19: Текстурен профил на лебовите при едночасовна (1Н) и при двочасовна (2Н) ферментација, веднаш по печењето и по 7 дена.

Ферментација 1Н						
Примерок	Ден	Цврстина (анг. Hardness) [N]	Кохезивност	Еластичност (анг. Springiness)	Цвакливост (анг. Chewiness) [N]	Стабилност (анг. Resilience)
SWF	0	6,8±1,50 <sup>a</sup>	0,83±0,06 <sup>c</sup>	0,82±0,10 <sup>b</sup>	4,66±1,25 <sup>ab</sup>	0,45±0,03 <sup>ab</sup>
	7	32,3±7,01 <sup>bc</sup>	0,56±0,10 <sup>a</sup>	0,74±0,03 <sup>b</sup>	13,39±3,28 <sup>b</sup>	0,33±0,06 <sup>a</sup>
5 %	0	9,1±0,60 <sup>b</sup>	0,77±0,02 <sup>abc</sup>	0,76±0,04 <sup>ab</sup>	5,40±0,29 <sup>b</sup>	0,47±0,03 <sup>b</sup>
	7	31,8±6,90 <sup>abc</sup>	0,50±0,05 <sup>a</sup>	0,71±0,01 <sup>ab</sup>	11,32±2,88 <sup>ab</sup>	0,30±0,04 <sup>a</sup>
10 %	0	6,6±1,50 <sup>a</sup>	0,78±0,08 <sup>bc</sup>	0,72±0,03 <sup>a</sup>	3,63±0,72 <sup>a</sup>	0,44±0,04 <sup>ab</sup>
	7	24,1±4,10 <sup>a</sup>	0,50±0,05 <sup>a</sup>	0,66±0,05 <sup>ab</sup>	8,46±2,03 <sup>a</sup>	0,31±0,02 <sup>a</sup>
15 %	0	9,8±2,00 <sup>b</sup>	0,74±0,01 <sup>ab</sup>	0,69±0,04 <sup>a</sup>	4,98±1,25 <sup>ab</sup>	0,42±0,01 <sup>a</sup>
	7	31,1±6,50 <sup>ab</sup>	0,51±0,05 <sup>a</sup>	0,66±0,07 <sup>a</sup>	10,24±1,95 <sup>ab</sup>	0,32±0,04 <sup>a</sup>
20%	0	14,3±1,50 <sup>c</sup>	0,71±0,02 <sup>a</sup>	0,71±0,06 <sup>a</sup>	7,27±1,42 <sup>c</sup>	0,43±0,03 <sup>ab</sup>
	7	40,4±3,50 <sup>c</sup>	0,49±0,04 <sup>a</sup>	0,72±0,02 <sup>a</sup>	12,8±1,05 <sup>b</sup>	0,33±0,03 <sup>a</sup>
Старење (Д)		***	***	*	***	***
Ферментација (Ф)		***	ns	ns	***	ns
Примерок (П)		***	*	***	***	ns
Д x Ф		ns	ns	ns	*	ns
Д x П		ns	ns	ns	ns	ns
Ф x П		ns	ns	ns	ns	ns
Д x Ф x П		ns	ns	ns	ns	ns
Ферментација 2Н						
Примерок	Ден	Цврстина (анг. Hardness) [N]	Кохезивност	Еластичност (анг. Springiness)	Цвакливост (анг. Chewiness) [N]	Стабилност (анг. Resilience)
SWF	0	10,3±2,70 <sup>ab</sup>	0,78±0,03 <sup>a</sup>	0,78±0,07 <sup>a</sup>	6,26±1,95 <sup>a</sup>	0,47±0,03 <sup>b</sup>
	7	35,8±2,60 <sup>a</sup>	0,56±0,03 <sup>a</sup>	0,76±0,07 <sup>b</sup>	15,10±1,59 <sup>b</sup>	0,33±0,02 <sup>a</sup>
5 %	0	10,2±0,80 <sup>ab</sup>	0,74±0,01 <sup>a</sup>	0,78±0,05 <sup>a</sup>	5,91±0,66 <sup>a</sup>	0,45±0,02 <sup>ab</sup>
	7	34,3±1,80 <sup>a</sup>	0,53±0,01 <sup>a</sup>	0,75±0,04 <sup>ab</sup>	13,53±0,83 <sup>ab</sup>	0,32±0,02 <sup>a</sup>
10 %	0	9,9±1,50 <sup>a</sup>	0,72±0,02 <sup>a</sup>	0,76±0,04 <sup>a</sup>	5,37±0,75 <sup>a</sup>	0,40±0,04 <sup>a</sup>
	7	35,5±8,10 <sup>a</sup>	0,55±0,17 <sup>a</sup>	0,70±0,05 <sup>ab</sup>	13,05±1,55 <sup>ab</sup>	0,33±0,10 <sup>a</sup>
15 %	0	11,6±1,90 <sup>ab</sup>	0,72±0,04 <sup>a</sup>	0,69±0,08 <sup>a</sup>	5,70±1,17 <sup>a</sup>	0,48±0,05 <sup>b</sup>
	7	38,0±2,30 <sup>a</sup>	0,44±0,06 <sup>a</sup>	0,72±0,05 <sup>ab</sup>	11,85±1,02 <sup>a</sup>	0,29±0,04 <sup>a</sup>
20 %	0	12,9±2,00 <sup>b</sup>	0,73±0,11 <sup>a</sup>	0,71±0,07 <sup>a</sup>	6,64±1,23 <sup>a</sup>	0,44±0,06 <sup>ab</sup>
	7	41,9±8,10 <sup>a</sup>	0,53±0,21 <sup>a</sup>	0,68±0,05 <sup>a</sup>	14,32±2,37 <sup>b</sup>	0,37±0,15 <sup>a</sup>
Старење (Д)		***	***	*	***	***
Ферментација (Ф)		***	ns	ns	***	ns
Примерок (П)		***	*	***	***	ns
Д x Ф		ns	ns	ns	*	ns
Д x П		ns	ns	ns	ns	ns
Ф x П		ns	ns	ns	ns	ns
Д x Ф x П		ns	ns	ns	ns	ns

SWF (контрола) – меко пченично брашно; 5–20 % – додавање брашно од тиква; 1Н едночасовна, 2Н двочасовна – време на ферментација; 0, 7 – временски точки на мерење (0 – ден на печење; 7 – по 7 дена); малите букви означуваат дека вредностите во дадената колона статистички се различни ( $p = 0,05$ ); \*\*\* – статистички значајна разлика при  $p < 0,001$ ; \* – статистички значајна разлика за  $p < 0,05$ ; ns – без статистички значајна разлика при  $p > 0,05$ ;

Статистичката анализа потврди дека текстурните својства имаат високо значајни ефекти од времето на староста на лебот (денови после печењето, Д) и примерокот (П). Кај двата режима на ферментација (1Н и 2Н) беа утврдени високо значајни ефекти ( $p < 0,001$ ) за денот на складирање (Д) и за типот на примерок (П) врз цврстината и врз цвакливоста. Значајни промени се забележаа и кај кохезивноста и кај еластичноста, додека стабилноста покажуваше послаба зависност од составот. Воедно, интеракцијата Д×Ф беше значајна само за цвакливоста (\*), што укажува на тоа дека ефектот на складирањето врз цвакливоста делумно се менува со времето на ферментација, додека за другите параметри Д×Ф не беше значајна (ns).

Најконзистентниот тренд кај двата режима на ферментација (1Н и 2Н) е зголемување на цврстината со денот на складирање и со повисоката концентрација на PF. По 1Н ферментација, SWF се зголеми од  $6,8 \pm 1,50$  N (ден 0) на  $32,3 \pm 7,10$  N (ден 7), додека 20 % PF започнува со значително повисока почетна цврстина ( $14,3 \pm 1,50$  N) и достигнува  $40,4 \pm 3,50$  N по 7 дена. Кај 2Н, контролата има повисоки вредности ( $10,3 \pm 2,70$  N) и се зголемува до  $35,8 \pm 2,60$  N, а 20 % PF се движи од  $12,9 \pm 2,00$  N до  $41,9 \pm 8,10$  N. Ваквото „задебелување“ на текстурата со додавање тиква е во линија со наодите дека зголемувањето на брашно од тиква (0–20 %) води кон линеарно зголемување на цврстината (Morreale et al., 2018; Нохћа et al., 2023;), најчесто објаснето преку разредување на глутенот и преку ослабување на еластичната мрежа која го поддржува задржувањето на гасните меури (Ma et al., 2020a). Кампусе и соработниците (Kampuse et al., 2015) дополнително забележуваат дека при пониски нивоа месестиот дел на тиквата (свежа) може иницијално да ја намали цврстината, но при повисоки концентрации (40–50 %) ефектот се менува и цврстината расте.

Кохезивноста во текот на складирањето опаѓаше кај сите формулации, што е видливо и при 1Н и при 2Н ферментација. При 1Н ферментација, кај контролата (SWF) кохезивноста се намали од  $0,83 \pm 0,06$  (ден 0) на  $0,56 \pm 0,10$  (ден 7), а кај 20 % PF од  $0,71 \pm 0,02$  (ден 0) на  $0,49 \pm 0,04$  (ден 7); слично и кај 2Н, кај SWF се движи од  $0,78 \pm 0,03$  (ден 0) на  $0,56 \pm 0,03$  (ден 7), додека 15 % PF од  $0,72 \pm 0,04$  (ден 0) на  $0,44 \pm 0,06$  (ден 7). Овој пад се поврзува со нарушување на интеракциите меѓу скробот и глутенот за време на складирањето, при што диететските влакна од брашното од тиква можат дополнително да интерферираат со овие врски и да ја намалат кохезивноста на внатрешниот дел од лебот (Sridhar & Charles, 2019; Hwang & Park, 2022; Chikpah et al., 2023).

Еластичноста останува релативно стабилна, но се забележува тенденција на пониски вредности при повисоки концентрации на PF. При 1Н ферментација, еластичноста кај SWF се менува од  $0,82 \pm 0,10$  на  $0,74 \pm 0,03$ , додека кај 10–15 % PF по 7 дена вредностите се околу  $0,66 \pm 0,05$  и  $0,66 \pm 0,07$ . При 2Н, SWF останува близу  $0,78 \pm 0,07$  на ден 0 и  $0,76 \pm 0,07$  на ден 7, а кај 20 % PF се намалува од  $0,71 \pm 0,07$  на  $0,68 \pm 0,05$ . Овој тренд е во согласност со ставовите и на други автори кои утврдиле дека зголемувањето на брашното од тиква ја намалува глутенската фракција што ја дефинира еластичноста на лебот (Różyło et al., 2014; El-Demery, 2011; Ma et al., 2020a).

Како комбиниран параметар (цврстина  $\times$  кохезивност  $\times$  еластичност), цвакливоста очекувано се зголемува по складирањето, а зголемувањето е поизразено кај контролата и кај високите нивоа на PF. При 1Н ферментација, цвакливоста кај SWF се зголемува од  $4,66 \pm 1,25$  N на ден 0 до  $13,39 \pm 3,28$  N на ден 7, а кај 20 % PF од  $7,27 \pm 1,42$  N на ден 0 до  $12,8 \pm 1,05$  N на ден 7. При 2Н ферментација, кај SWF се зголемува од  $6,26 \pm 1,95$  N на ден 0 до  $15,10 \pm 1,59$  N на ден 7, додека кај 20 % PF од  $6,64 \pm 1,23$  N на ден 0 до  $14,32 \pm 2,37$  N на ден 7. Ова е во согласност со истражувањето од Ружио и соработниците (Różyło et al., 2014) и Давуди и соработниците (Davoudi et al., 2020), кои утврдиле дека цвакливоста добро корелира со текстуралните промени предизвикани од тиквените додатоци и со процесот на складирање.

Стабилноста (анг. resilience) се намалува кај сите примероци, што укажува на послаба способност за враќање на првичната форма по компресија. При 1Н ферментација, стабилноста кај SWF се намалува од  $0,45 \pm 0,03$  (ден 0) на  $0,33 \pm 0,06$  (ден 7), а кај 20 % PF од  $0,43 \pm 0,03$  (ден 0) на  $0,33 \pm 0,03$  (ден 7). При 2Н, кај SWF се намалува од  $0,47 \pm 0,03$  (ден 0) на  $0,33 \pm 0,02$  (ден 7), а 15 % PF од  $0,48 \pm 0,05$  (ден 0) на  $0,29 \pm 0,04$  (ден 7). Ова дополнително сугерира ослабување на глутенската мрежа, особено со повисоки концентрации на PF (El-Demery, 2011).

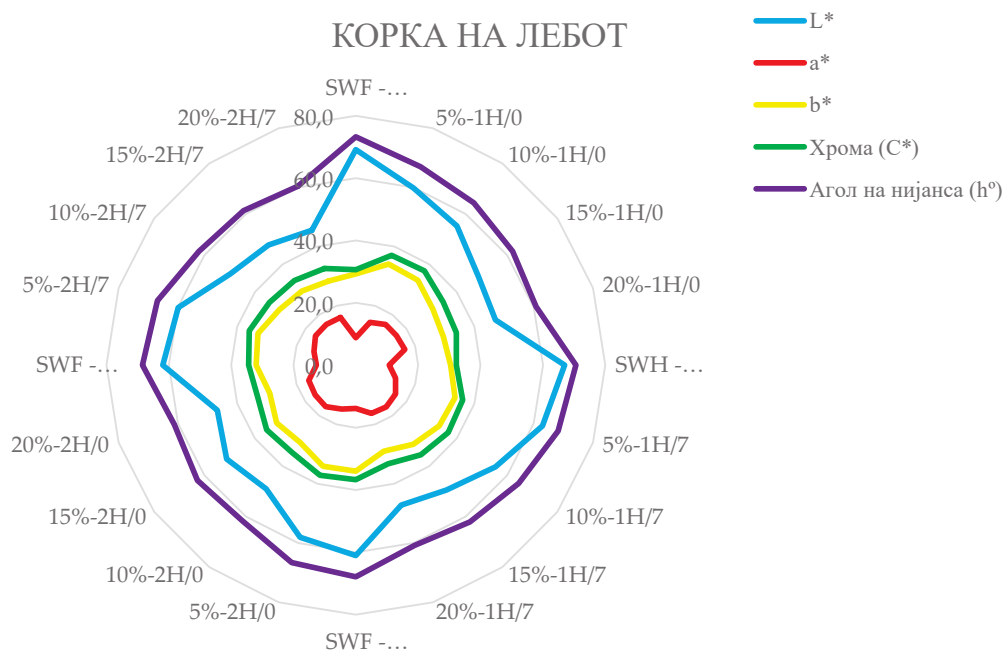
Литературните податоци дополнително укажуваат на тоа дека инкорпорирањето брашно од тиква ја менува порозноста, создавајќи помали и погусти пори, што се совпаѓа со истражувањето на Ружио и соработниците (Różyło et al., 2014) за зголемување на индексот на порозност според Далман (Dallmann), како и со нивните наоди дека диететските влакна од тиква можат да го забават стареењето преку задржување на влагата (El-Demery, 2011; Różyło et al., 2014;). И покрај овие промени во текстурата, повеќе студии покажуваат дека сензорната прифатливост на лебови збогатени со тиква останува висока и дека потрошувачите генерално ја прифаќаат модифицираната текстура (See et al., 2007; Que et al., 2008; Jeevitha & Bhuvana, 2019; Ge et al., 2021). Дополнително, Шевченко и соработниците (Shevchenko et al., 2023) наведуваат дека подолгата ферментација може да ја подобри структурната интегритетност и да ги поттикне физичко-хемиските процеси, што е релевантно за објаснување на разликите меѓу 1Н и 2Н, иако специфичните ефекти врз текстурата не се разработени детално.

#### 4.2.6 Профил на бојата кај примероците леб

Профилот на промените на боја ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  – хрома и  $h^\circ$  – агол на нијанса) на корката и на внатрешниот дел од лебот при различни концентрации на брашно од тиква (контрола, 5 %, 10 %, 15 % и 20 %), како и при различни времиња на ферментација (1Н и 2Н) и периоди на складирање (0 и 7 дена), се прикажани на графиконот бр. 6 (корка) и на графиконот бр. 7 (внатрешен дел), кои покажуваат неколку карактеристични модели. Резултатите од колориметриската анализа јасно покажуваат дека времетраењето на ферментацијата (1Н и 2Н), процентот на брашно од тиква (PF) и периодот на складирање (ден 0 и ден 7) имаат комбиниран и изразен ефект врз бојата и на корката и на

внатрешниот дел од лебот, при што на графиконот бр. 6 се прикажани промените на корката, а на графиконот бр. 7 на внатрешниот дел.

Кај корката (графикон бр. 6), при едночасовна ферментација (1Н), контролниот леб и примерокот со 5 % PF покажуваат највисоки вредности на  $L^*$ , што упатува на посветла и визуелно поатрактивна корка. Со зголемување на PF на 10–20 %,  $L^*$  постепено опаѓа и корката станува потемна со изразен жолтеникаво-кафеав тон, што е во согласност и со други студии кои утврдиле дека присуството на каротеноиди во брашното од тиква ја намалува светлината на корката (See et al., 2007; Kampuse et al., 2015; Chikrah et al., 2023). Истовремено, при двочасовна ферментација (2Н), корката во целина се перципира како поинтензивна/потемна, што може да се поврзе со продолжена ензимска активност и со поголема достапност на реактивни супстрати за Мејлардовата реакција при печење.



Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1Н и 2Н го означуваат времето на ферментација; 0 и 7 ги означуваат временските точки во денови

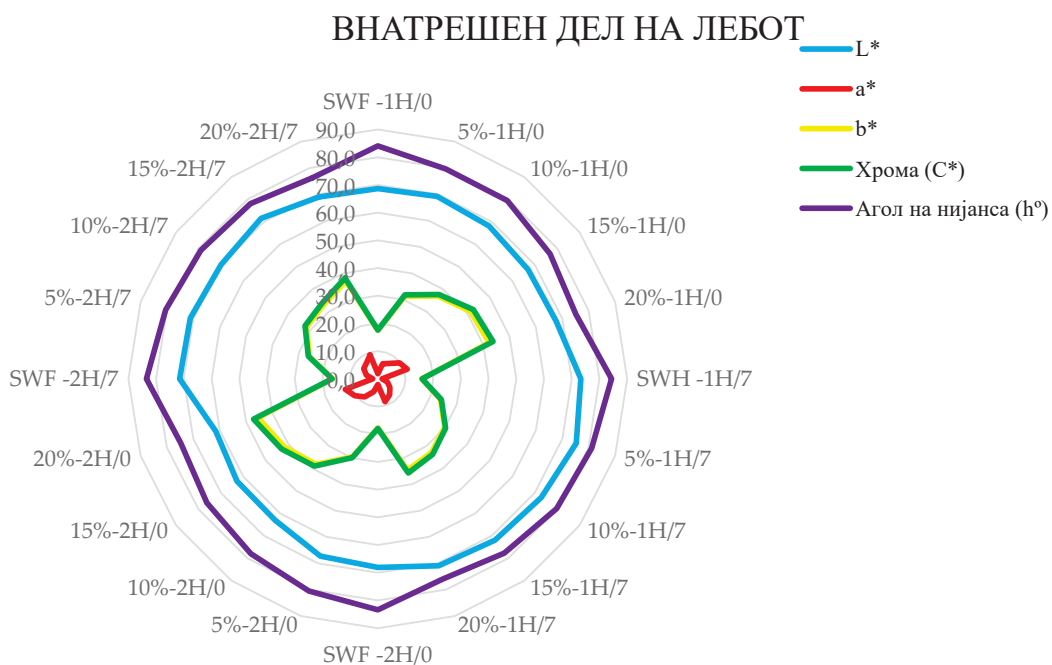
Графикон бр. 6: Параметри на бојата ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ) на корката на лебот

Параметарот  $a^*$  (црвенило) кај корката останува релативно низок, но покажува тенденција на благ пораст со зголемување на PF, најизразено кај 15–20 %, при што при 2Н овој пораст се интерпретира како развој на портокалови нијанси. Ова е во согласност со податоците дека параметарот  $a^*$  зависи од условите на печење и може да варира. Чикпа и соработниците (Chikrah et al., 2023) пријавуваат зголемување на  $a^*$  при пониски температури, но намалување при повисоки, додека Си и соработниците (See et al., 2007)

покажуваат дека тиквата може да ја засили компонентата  $a^*$  во зависност од матрицата и од процесот.

Кај  $b^*$  (жолтило) и кај хромата ( $C^*$ ) на корката се забележува појасен и посистематски тренд: со зголемување на PF вредностите растат, што ги рефлектира природната жолта пигментација на тиквата и нејзиниот доминантен придонес кон заситеноста на бојата (Kampuse et al., 2015; Raksejeva et al., 2011; Chikpah et al., 2023; See et al., 2007). Наодите на Батиста и соработниците (Batista et al., 2018) дополнително поддржуваат дека и при намалување на  $L^*$ , брашното од тиква ја засилува заситеноста на бојата.

Аголот на нијанса  $h^\circ$  на корката покажува високи вредности и варијации во зависност од PF и од ферментацијата, што упатува на промени во доминантниот тон, додека по складирањето, промените генерално се умерени, со впечаток дека умерените концентрации (5–10 % PF) обезбедуваат порамномерна и технолошки попривлечна корка, а повисоките нивоа ја насочуваат бојата кон потемна кафеава (See et al., 2007).



Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1H и 2H го означуваат времето на ферментација; 0 и 7 ги означуваат временските точки во денови

Графикон бр. 7: Параметри на бојата ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ) на внатрешниот дел на лебот

Во внатрешниот дел (графикон бр. 7), очекувано поради помалата изложеност на директна висока температура,  $L^*$  е повисок отколку кај корката, но и тука се забележува постепено намалување со зголемување на PF, што укажува дека поголема количина на брашно од тиква доведува до потемна и побојно заситена внатрешност на лебот (Kampuse et al., 2015; Chikpah et al., 2023). Најповолен визуелен баланс во внатрешниот

дел се забележува кај 5–10 % PF, каде што се добива светложолтеникава, хомогена боја со релативно високи  $b^*$  и  $C^*$ , што ја одразува природната боја на тиквата без прекумерно потемнување, додека при  $\geq 15$  % PF внатрешноста станува поинтензивно обоена и потемна, што може да се одрази и врз перцепцијата на структурата.

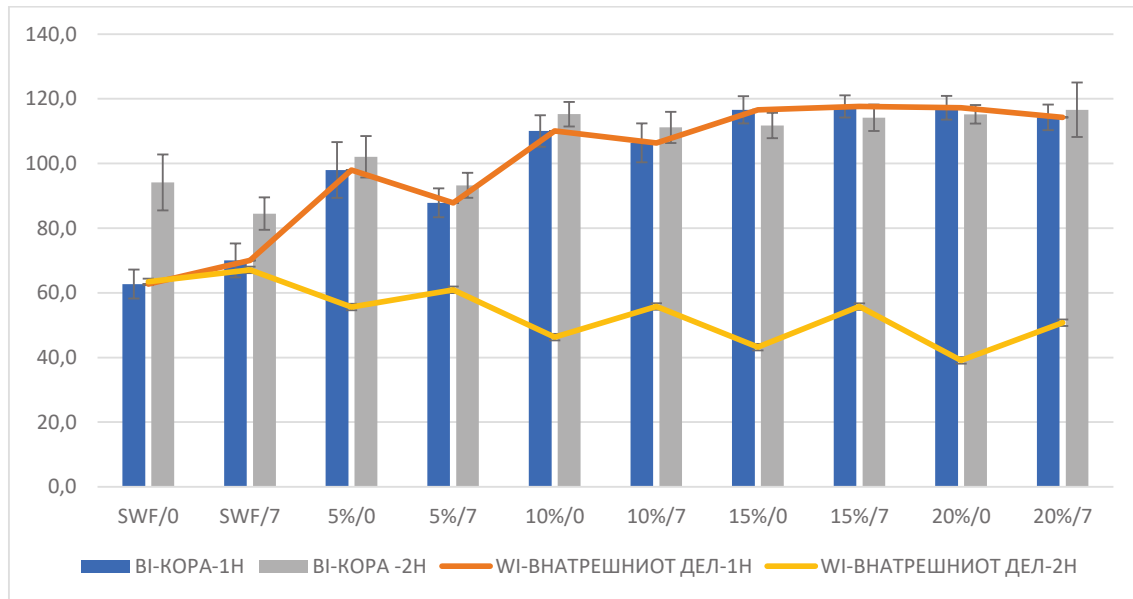
Параметарот  $a^*$  во внатрешниот дел останува низок и покажува ограничени промени со зголемување на PF, што повторно упатува на тоа дека тиквата најсилно се манифестира преку жолтата компонента ( $b^*$ ) и преку интензитетот на бојата ( $C^*$ ). Ова е потврдено и од Ракчејева и соработниците (Rakcejeva et al., 2011), кои пријавиле дека  $b^*$  кај внатрешниот дел со сушено тиквено брашно може да биде околу 1,23 пати повисок од контролата, како и од Чикпа и соработниците (Chikpah et al., 2023), кои потврдуваат дека PF ги зголемува  $b^*$  и кај корката и кај внатрешноста.

Аголот на нијанса  $h^\circ$  во внатрешноста има постабилен модел од корката, што укажува на поуниформна распределба на бојата во внатрешноста на лебот, а по седум дена складирање промените во параметрите се минимални, што сугерира релативна стабилност на визуелните својства во текот на стареењето.

Севкупно, комбинираната интерпретација прикажана на графиконот бр. 6 и на графиконот бр. 7 покажува дека PF најчесто ја намалува светлината ( $L^*$ ) и ги зголемува жолтата компонента ( $b^*$ ) и интензитетот на бојата ( $C^*$ ) и на корката и на внатрешниот дел, при што 2Н ферментација води кон поинтензивна/потемна корка и кон посилено изразени топли нијанси кај повисоки нивоа на PF, додека 5–10 % PF се издвојува како оптимален технолошки компромис што обезбедува атрактивна, рамномерна корка и светол, хомоген внатрешен дел со природно жолтеникав тон и со висока сензорна прифатливост.

#### **4.2.7 Индекси на потемнување (BI) и на белина (WI) на примероците леб**

Индексите на потемнување (BI) и на белина (WI) на примероците леб во зависност од времето на ферментација, на денот на печење (0 ден) и по 7 дена складирање, се прикажани на графиконот бр. 8.



Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1Н и 2Н го означуваат времето на ферментација; 0 и 7 – временски точки на мерење;

Графикон бр. 8: Индекс на потемнување (BI) и индекс на избелување (WI) на корката и на внатрешниот дел од лебот на 0 и на 7 дена

Резултатите (графикон бр. 8) укажуваат на „двоен ефект“ на PF: брашното од тиква истовремено ја интензивира бојата на кората (BI), но кај внатрешниот дел (WI) создава ферментациски зависен одговор. Оттука, PF не влијае униформно врз кората и врз внатрешниот дел на лебот, туку генерира изразен визуелен контраст што може да се интерпретира како технолошки поволна карактеристика.

Кај BI во корката (сини столбови) се регистрира растечки тренд со зголемување на PF и при 1Н и при 2Н ферментација. Вредностите се движат од ~60 кај контролата до ~115 кај 20 % PF. Притоа, 2Н има повисок „старт“, особено кај SWF, што упатува на тоа дека подолгата ферментација може да придонесе за поинтензивно потемнување на кората и без дополнителен внес на PF (веројатно преку промени во достапноста на реактивни соединенија за Мејлардовата реакција).

Механистичка интерпретација за потемнување на кората би била дека растот на BI со PF се поврзува со природните шеќери и со каротеноидите од тиквата, кои ја засилуваат Мејлардовата реакција и/или карамелизацијата за време на печењето, резултирајќи со потемна кора. Во прилог на ова, Ербаш и соработниците (Erbaş et al., 2011) посочуваат дека повисоките температури го интензивираат потемнувањето од Мејлардов тип, додека Чанвал и Анантарамакришнан (Chhanwal & Anandharamakrishnan, 2014) наведуваат дека индексот на потемнување значително расте кога површинската температура надминува 120 °C, што е конзистентно со поизразените вредности на BI при повисоки концентрации на PF.

Ефектот на складирање (ден 7) врз BI во корката е ограничен и нерегуларен. Разликите меѓу ден 0 и ден 7 кај BI релативно се мали и не следат униформен правец низ

сите концентрации. Ова сугерира дека бојата на кората примарно е „заклучена“ со термичката обработка, додека складирањето има секундарно, варијабилно влијание, веројатно преку промени во површинската влага и во сензорните својства.

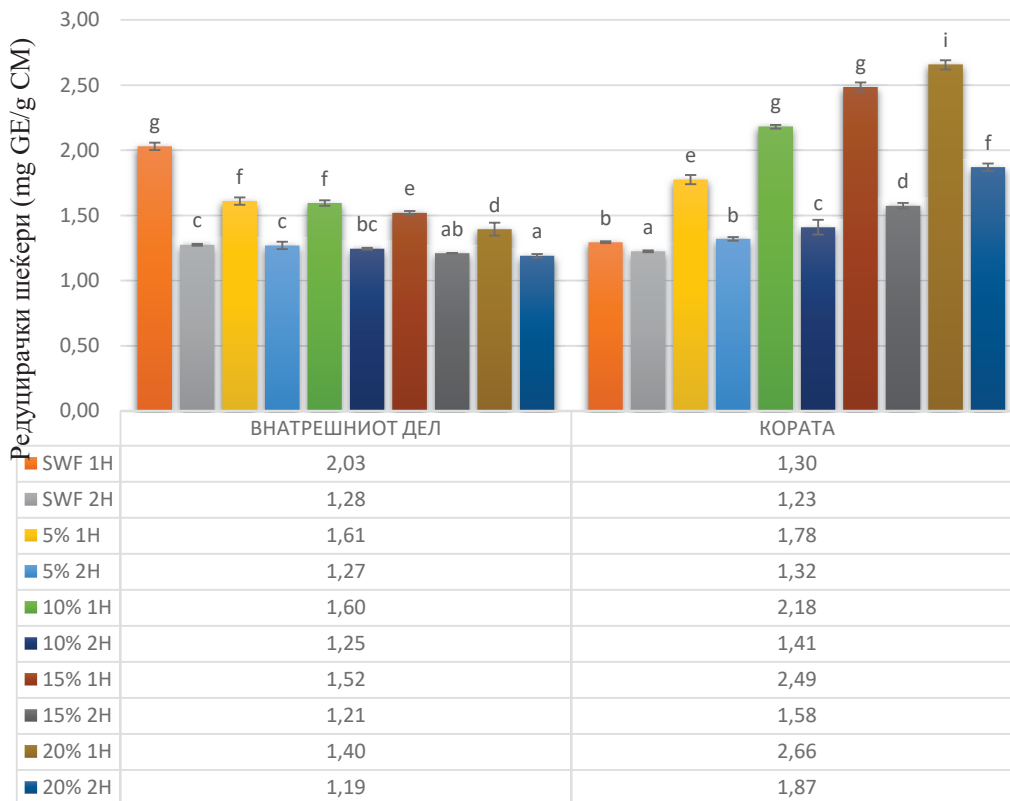
Кај WI на внатрешниот дел има раздвојување на трендовите меѓу 1Н и 2Н, за разлика од кората, внатрешниот дел реагира различно во зависност од режимот на ферментација. Кај 1Н ферментација (портокалова линија) WI покажува јасен пораст со зголемување на PF (од ~65 кај контролата до ~120 кај 15–20 % PF), што упатува на посветол/поизразено златножолт внатрешен дел при пократка ферментација. Наспроти тоа, кај 2Н ферментација (жолта линија) се забележува опаѓачки тренд (од ~65 кај контролата до ~45 кај 20 % PF), што сугерира дека подолгата ферментација може да придонесе за поизразено ензимско потемнување и/или да поттикне поголема дисперзија/ослободување пигменти од PF, со што внатрешноста станува помалку светла.

Ефектот на складирање (ден 7) врз WI се опишува со делумно „поместување“ кај 2Н ферментација при повисоки концентрации на PF. Од добиените резултати (графикон бр. 8) се забележува дека кај 2Н ферментација, особено при 10–20 % PF, WI на ден 7 е повисок отколку на ден 0. Овој ефект веројатно е поврзан со процесите на стареење (внатрешно сушење, промени во микроструктурата и расејувањето на светлината), кои можат да ја изменат перцепцијата на светлината без да имплицираат промена во пигментниот состав

Комбинацијата од зголемен WI со пораст на концентрацијата на PF и зависноста на WI од времетраењето на ферментацијата дава карактеристичен визуелен профил на производот: потемна и визуелно поатрактивна кора, проследена со златножолта/посветла внатрешност кај 1Н ферментација, или умерено потемна внатрешност кај 2Н ферментација. Ваквиот контраст меѓу надворешниот и внатрешниот дел може да ја засили перцепцијата на „фурнациски“ изглед на лебот, а од технолошки аспект има практична вредност бидејќи овозможува насочена оптимизација на рецептурата и избор на режим на ферментација при развој на функционални лебови.

#### 4.2.8 Содржина на редуцирачки шеќери во примероците леб

Содржината на редуцирачки шеќери во композитниот леб во зависност од различното времетраење на ферментацијата (1 час и 2 часа) на денот на печење (0 ден) е прикажана на графиконот бр. 9.



Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1H едночасовна, 2H двочасовна – време на ферментација; CM – сува материја; GE - гликозен еквивалент по грам сува материја; Малите букви означуваат статистички значајни разлики меѓу примероците во групите на внатрешниот дел и кората при ниво на значајност  $p = 0,05$

Графикон бр. 9: Содржина на редуцирачки шеќери во кората и во внатрешниот дел на примероците леб

Резултатите покажуваат дека концентрацијата на редуцирачки шеќери значително варира во зависност од процентот на брашно од тиква и од времето на ферментација, при што се забележуваат две јасно дефинирани различни тенденции кај внатрешниот дел и една кај кората.

**Внатрешен дел** – кај внатрешниот дел, содржината на редуцирачки шеќери покажува опаѓачки тренд со зголемување на процентот на брашно од тиква. Највисока вредност е измерена кај контролниот леб со едночасовна ферментација (SWF 1H: 2,03 mg GE/g CM), а најниска кај примерокот со 20 % брашно од тиква и со двочасовна ферментација (20 % 2H: 1,19 mg GE/g CM). Со зголемување на процентот на брашно од тиква, редуцирачките шеќери во внатрешниот дел постепено се намалуваат – од 1,61 mg

GE/g CM (5 % PF, 1H) до 1,40 mg GE/g CM (20% PF, 1H). Ист тренд се забележува и кај примероците со двочасовна ферментација, каде што содржината на редуцирачки шеќери е пониска отколку кај едночасовната ферментација. Ваквото однесување може да се објасни со фактот дека подолгата ферментација ја засилува метаболичката активност на квасецот, кој троши дел од достапните шеќери за време на ферментацијата, намалувајќи ја количината на редуцирачки шеќери присутни пред печењето. Овие резултати сугерираат дека пократката ферментација (1H) овозможува поголема количина на неискористени шеќери кои, за време на печењето, учествуваат во Мејлардовата реакцијата и во карамелизацијата, што резултира со поинтензивно потемнување и со посилен ароматичен профил на лебот.

**Корка на лебот** – кај корката на примероците, се забележува спротивен тренд – содржината на редуцирачки шеќери се зголемува со зголемување на концентрацијата на брашно од тиква. Контролниот примерок (SWF 1H) има вредност од 1,30 mg GE/g CM, а највисоката вредност е измерена кај примерокот со 20 % брашно од тиква и со едночасовна ферментација (2,66 mg GE/g CM). Вредностите кај примероците со двочасовна ферментација нешто се пониски, но следат сличен тренд на зголемување со концентрацијата на брашно од тиква (од 1,23 mg GE/g CM кај контролата до 1,87 mg GE/g CM кај 20 % PF). Ова укажува на тоа дека брашното од тиква придонесува за зголемена акумулација на редуцирачки шеќери во кората, особено при пократка ферментација, кога активноста на хидролитичките ензими и термичката разградба на полисахаридите и пектините создава повеќе нискомолекуларни шеќери достапни за Мејлардовата реакцијата.

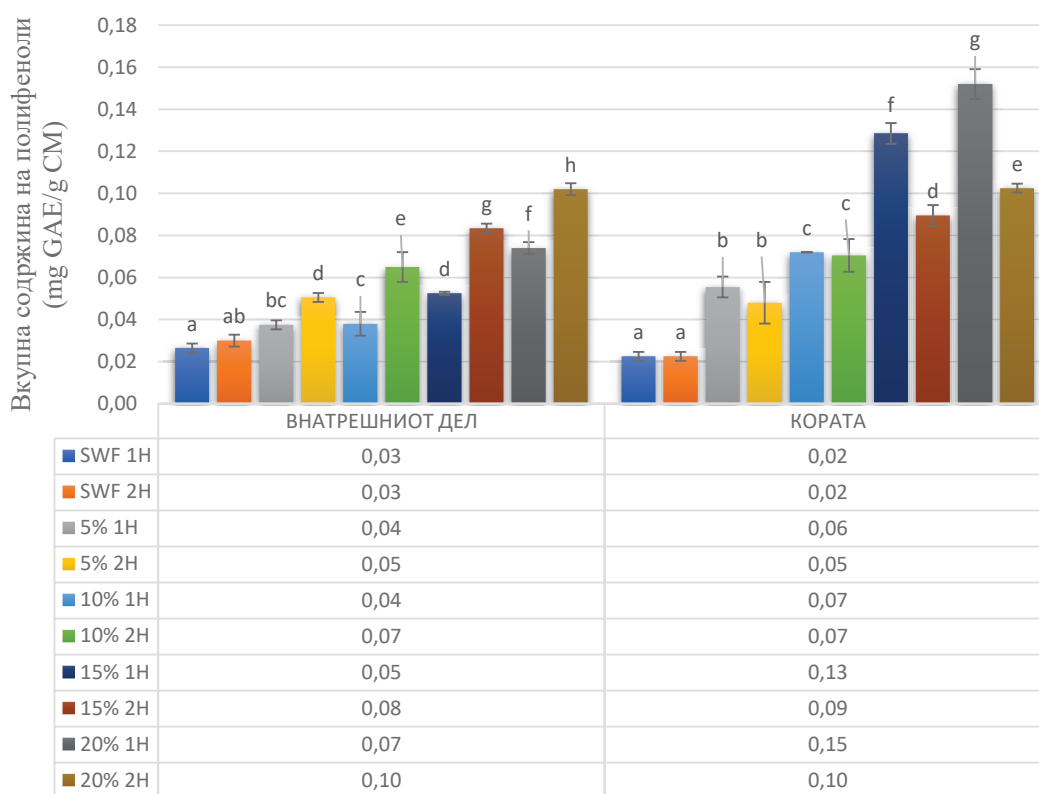
Ју и соработниците (Yu et al., 2021) потврдуваат дека деградацијата на тиквените полисахариди за време на процесирањето резултира со ослободување мали молекули редуцирачки шеќери, кои ги зголемуваат степенот на потемнување и сладоста на готовиот производ. Слично, Ма и соработниците (Ma et al., 2020b) утврдиле дека хидролизата на сложените јаглехидрати во брашното од тиква при печење доведува до зголемена концентрација на редуцирачки шеќери, што позитивно влијае врз бојата и врз аромата на лебот. Корелацијата меѓу содржината на редуцирачки шеќери и параметрите на боја ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) прикажани на графиконите бр. 6, 7 и 8 е очигледна. Кај примероците со повисока концентрација на редуцирачки шеќери во кората, вредностите на  $L^*$  се намалуваат (потемнување), додека вредностите на  $a^*$  се зголемуваат (интензивирање црвено-кафеави тонови), што потврдува дека редуцирачките шеќери се клучен фактор во развојот на бојата преку реакциите според Мејлард и карамелизацијата. Во внатрешниот дел, пак, повисоката содржина на редуцирачки шеќери придонесува за побогат и пожолтеникав тон (зголемени  $b^*$  и  $C^*$  вредности), што создава визуелен контраст меѓу кората и внатрешниот мек дел – карактеристичен за лебови со повисок удел на брашно од тиква.

Вкупната анализа покажува дека пократката ферментација (1H) доведува до поголема концентрација на редуцирачки шеќери во кората, што овозможува поинтензивна реакција на потемнување и развој на аромата, додека подолгата

ферментација (2H) овозможува подобра дистрибуција и стабилност на шеќерите во внатрешноста на лебот. Најповолен технолошки ефект се постигнува при 10–15 % додаток на брашно од тиква, каде што се постигнува оптимален баланс меѓу боја, вкус, структура и содржина на редуцирачки шеќери.

#### 4.2.9 Вкупна содржина на полифеноли и антиоксидативен потенцијал на внатрешниот дел и на корката на примероците леб

Вкупната содржина на полифеноли (TPC), антиоксидативната активност определена со методите DPPH и ABTS, како и редуциската моќ (FRAP) во внатрешниот дел и во кората на композитниот леб, во зависност од времето на ферментација (1H и 2H), се прикажани на графиконите бр. 10, 11, 12 и 13.



Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1H едночасовна, 2H двочасовна — време на ферментација; CM – сува материја; GAE – гална киселина еквиваленти по грам сува материја; Малите букви означуваат статистички значајни разлики меѓу примероците во групите на внатрешниот дел и во кората при ниво на значајност  $p = 0,05$

Графикон бр. 10: Вкупна содржина на полифеноли во кората и во внатрешниот дел на примероците леб

Како што е прикажано на графиконот бр. 10, зголемувањето на концентрацијата на брашно од тиква резултира со повисока содржина на полифенолни соединенија (TPC)

во внатрешниот дел (трошките) и во кората на лебот. Во внатрешниот дел, трендот јасно е изразен, односно од 0,03 mg GAE/g CM кај контролата (SWF), вредностите кај примероците со ознаки 1H и 2H, се зголемуваат до 0,07 mg GAE/g CM кај лебот со 20 % PF (1H) и 0,10 mg GAE/g CM кај лебот со 20 % PF (2H). Дополнително, при иста концентрација на брашно од тиква, кај примероците со двочасовна ферментација (2H) се добиени повисоки вредности во однос на примероците леб добиени со едночасовна ферментација на тестото (1H) - (на пр. 10 % PF: 0,04 mg GAE/g CM → 0,07 mg GAE/g CM; 15 % PF: 0,05 mg GAE/g CM → 0,08 mg GAE/g CM; 20% PF: 0,07 mg GAE/g CM → 0,10 mg GAE/g CM), што укажува на повисока екстрактивност и стабилност на полифенолите во внатрешниот дел за време на процесот на ферментација и на печење.

Во кората, се забележува и пораст во содржината на полифеноли со зголемување на концентрацијата на PF, но со поинаков однос кон времето на ферментација: од 0,02 mg GAE/g CM кај SWF (1H/2H) до 0,15 mg GAE/g CM (20 % PF, 1H). При ист процент на PF, примероците 2H имаат еднакви или пониски вредности од примероците 1H (5 %: 0,06 mg GAE/g CM → 0,05 mg GAE/g CM; 10 %: 0,07 mg GAE/g CM → 0,07 mg GAE/g CM; 15 %: 0,13 mg GAE/g CM → 0,09 mg GAE/g CM; 20 %: 0,15 mg GAE/g CM → 0,10 mg GAE/g CM), што сугерира делумна деградација на фенолните фракции во површинскиот слој при продолжена ферментација и при изложеност на повисоки температури на печење. Овој тренд, кој покажува зголемена концентрација на полифеноли во внатрешниот (мекиот) дел при двочасовна ферментација, а намалување во кората под истите услови, укажува на различна динамика на стабилност и на достапност на фенолните соединенија во зависност од позицијата во матрицата на лебот. Во внатрешниот дел, двочасовната ферментација (2H) веројатно овозможува подолга ензимска активност и хидролитичка конверзија на врзаните полифеноли во послободни форми, што резултира со нивно поголемо акумулирање. Наспроти тоа, во кората, каде што температурите при печење значително се повисоки и изложеноста на кислород е поголема, се забележува делумна деградација или оксидација на фенолните соединенија, што доведува до пониски вредности при 2H ферментација во споредба со 1H.

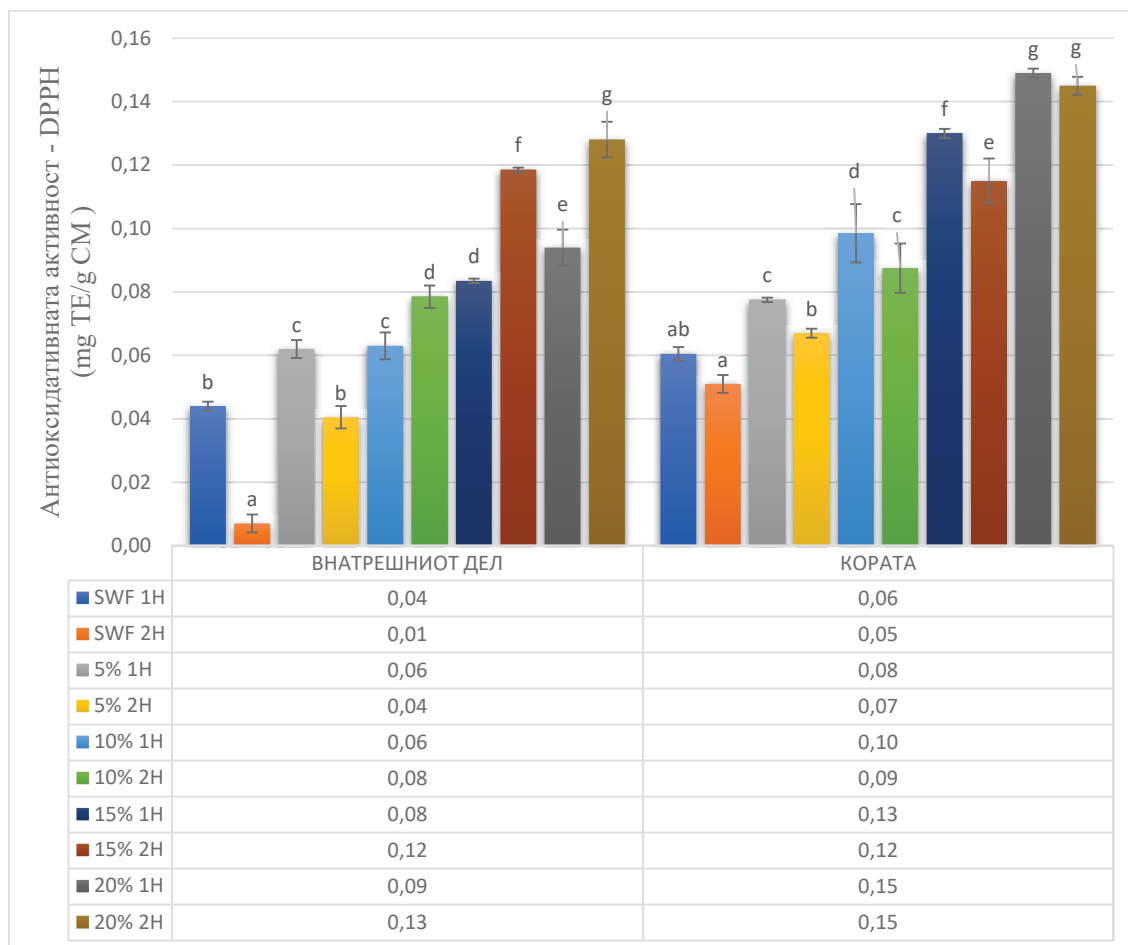
Овие резултати се во согласност со литературата која покажува дека инкорпорирањето брашно од тиква значително ја зголемува вкупната содржина на фенолни соединенија. Вахјоно и соработниците (Wahyono et al., 2020) пријавуваат значаен пораст со максимум кај 20 % PF, а Акбаш и Килмаоглу (Akbaş & Kılmaoğlu, 2022) потврдуваат зголемување на фенолната содржина при 10 % PF. Во производи од *Cucurbita moschata* е потврдено дека 10–15 % PF ги зголемува вкупната содржина на полифеноли (TPC) и антирадикалната активност измерена со методот DPPH (Aljahani, 2022). Нашите резултати покажуваат дека кај лебот со 15 % и со 20 % брашно од тиква, продолжената ферментација (2H) резултира со поголемо намалување на полифенолната содржина во кората, за разлика од примероците со 5 % PF, кај кои таа деградација е помала.

Овој феномен може да се објасни со тоа што флавоноидите, како дел од полифенолната група, се поосетливи на оксидација и на деградација при повисоки

температури и при подолга изложеност на кислород (Alashi et al., 2018; Fam et al., 2023). Кај примероците со понизок процент на PF, флавоноидите подобро се заштитени од присутните полисахариди (скроб и диететски влакна), додека кај примероците со повисок PF (15–20 %), заштитната матрица е помала, што ги зголемува нивната изложеност и нивната загуба.

Дополнително, брашното од тиква е богато со шеќери и со аминокиселини (серин, метионин), кои при печење учествуваат во Мејлардовите реакции (Platzer et al., 2021). Притоа се формираат меланоидини (со ниска и со висока молекулска маса), кои можат да реагираат со реагенсот Folin–Ciocalteu (Loi & Paciolla, 2021) и да предизвикаат преценета вредност на вкупните полифеноли, особено во внатрешниот дел (каде што нашите вредности се највисоки) и делумно кај примероците со 2Н ферментација во истиот состав. Ова толкување е конзистентно и со забележаното намалување на редуцирачките шеќери (графикон бр. 9), што укажува на нивна потрошувачка во Мејлардовите реакции и на формирање антиоксидативни меланоидински структури.

Сумирано, овие резултати укажуваат на двокомпонентна природа на процесот: (i) внатрешна концентрација и термичка стабилизација на полифенолни и меланоидински структури во внатрешноста, односно мекиот дел, и (ii) поголема деградација на фенолните соединенија во корката при продолжена ферментација. Овие наоди се во согласност со претходните истражувања за зголемена полифенолна содржина и антиоксидативна активност по додавање брашно од тиква (Wahyono et al., 2020; Yu et al., 2021; Akbaş & Kilmaoğlu, 2022; Mrázková et al., 2023; Karaš et al., 2024), но истовремено ја нагласуваат потребата од прецизна оптимизација на времетраењето на ферментацијата во функција на посакуваниот фенолен и антиоксидативен профил на готовиот производ.

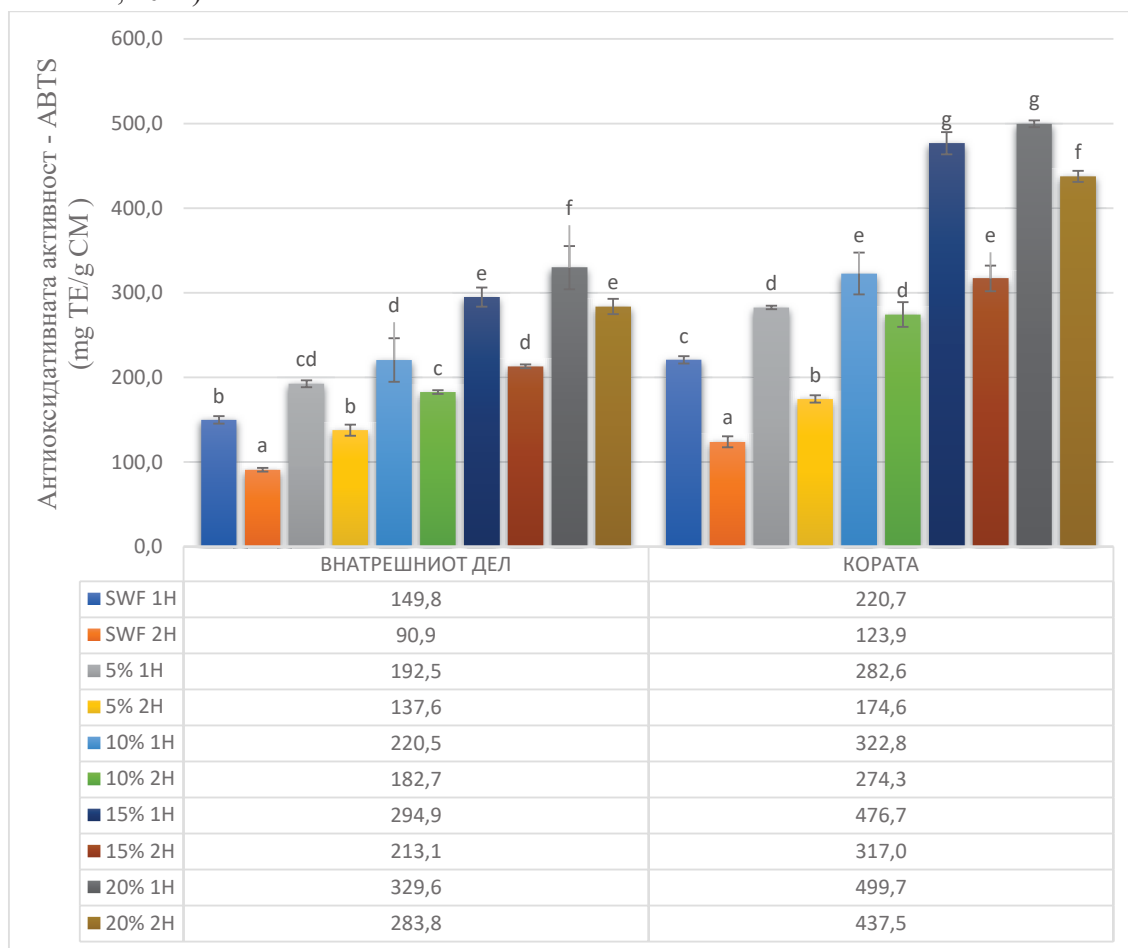


Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1H едночасовна, 2H двочасовна – време на ферментација; CM – сува материја; TE – Trolox еквиваленти по грам сува материја; Малите букви означуваат статистички значајни разлики меѓу примероците во групите на внатрешниот дел и во кората при ниво на значајност  $p = 0,05$

Графикон бр. 11: Антиоксидативната активност определена со методот DPPH во кората и во внатрешниот дел на примероците леб

На графиконот бр. 11, каде што е прикажана вкупната антиоксидативна активност определена со методот DPPH во кората и во внатрешниот дел на примероците леб, се забележува дека добиените резултати покажуваат јасен пораст на вредностите со зголемувањето на процентот на брашно од тиква, како во внатрешниот дел така и во кората. Според методот DPPH, антиоксидативната активност во внатрешниот дел се зголемува од 0,04 mg TE/g CM кај контролниот примерок (SWF 1H) на 0,09 mg TE/g CM кај 20% PF (1H), а уште повисоки вредности се забележуваат по двочасовна ферментација (2H), достигнувајќи 0,13 mg TE/g CM при 20 % PF. Во кората, вредностите растат од 0,06 mg TE/g CM кај SWF (1H) до 0,15 mg TE/g CM кај 20 % PF (1H), но по 2H ферментација тие остануваат константни или бележат благо намалување (0,15 mg TE/g CM → 0,15 mg TE/g CM). Овој резултат укажува на тоа дека внатрешниот дел реагира посилно на продолжената ферментација, додека кај кората антиоксидативните

соединенија се стабилизираат и нивниот дополнителен пораст е ограничен. Овие податоци потврдуваат дека антиоксидативната активност DPPH најмногу се засилува при концентрации над 10 % PF, особено во внатрешниот дел, каде што ферментацијата овозможува подобра мобилизација на фенолни и на антиоксидативни компоненти. Алџобаир (Aljobaïr, 2024) потврдува сличен тренд, лебот со додаток на сушени кори од тиква, лубеница и од краставица покажал значително повисока антирадикална активност DPPH во однос на контролниот примерок. Овој феномен може да се објасни со фактот дека соединенијата како  $\beta$ -каротен и  $\alpha$ -токоферол се ослободуваат најинтензивно во првиот час на ферментација, кога ензимските процеси ја олеснуваат нивната дифузија во тестото, додека во подоцнежната фаза нивната стабилност опаѓа поради оксидативни и ензимски реакции кои ја намалуваат нивната биолошка активност (Mokhtar et al., 2021; Lin et al., 2024).



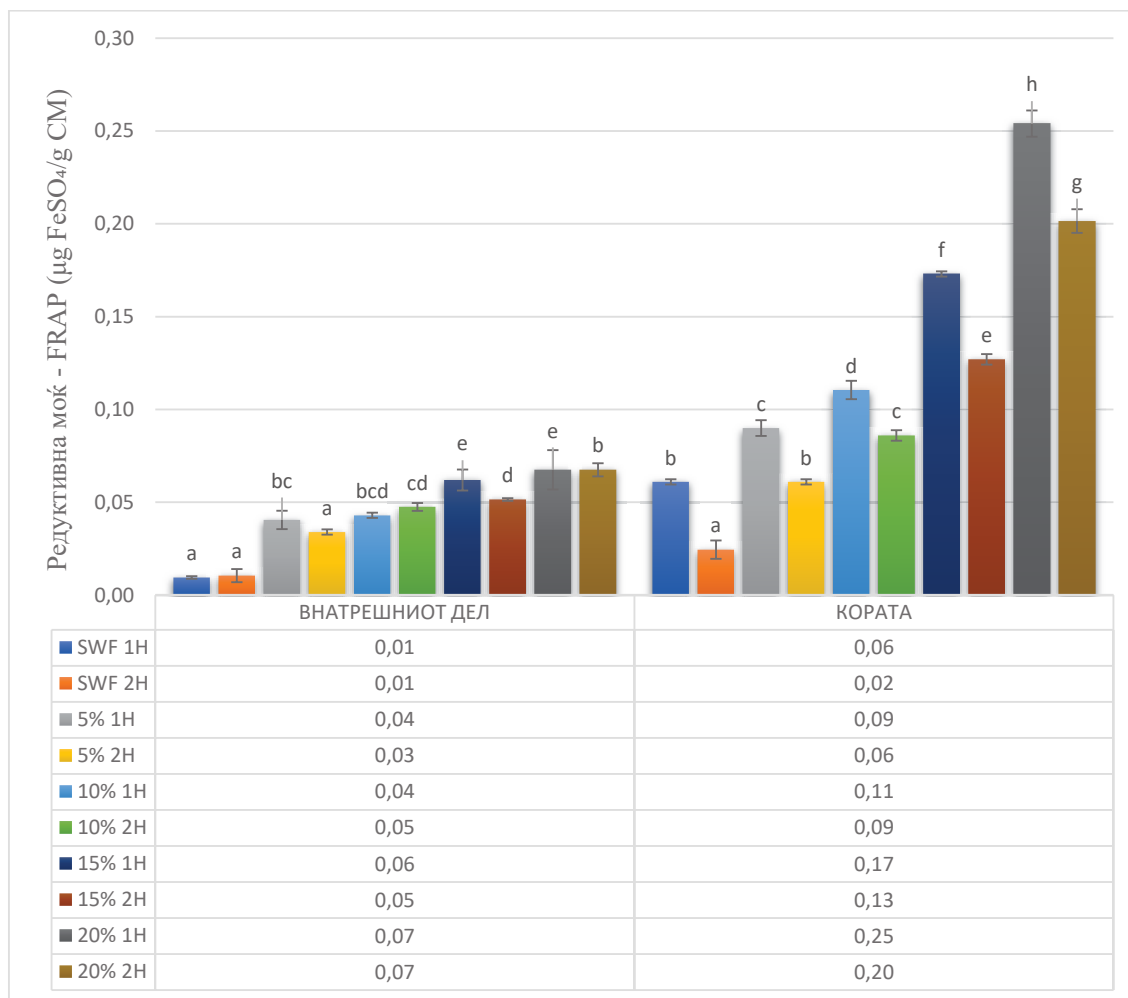
Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1H едночасовна, 2H двочасовна – време на ферментација; CM – сува материја; TE – Тролох еквиваленти по грам сува материја; Малите букви означуваат статистички значајни разлики меѓу примероците во групите на внатрешниот дел и во кората при ниво на значајност  $p = 0,05$

Графикон бр. 12: Антиоксидативната активност определена со методот ABTS во кората и во внатрешниот дел на примероците леб

Според методот ABTS, како што е прикажано на графиконот бр. 12 (вкупната антиоксидативна активност определена во кората и во внатрешниот дел на примероците леб), антиоксидативната активност покажува уште поизразен тренд. Во внатрешниот дел, вредностите растат од 149,8 mg TE/g CM кај контролниот примерок (SWF 1H) до 329,6 mg TE/g CM кај 20% PF (1H), а по 2H ферментација благо опаѓаат на 283,8 mg TE/g CM. Сличен тренд се забележува и кај кората, каде што активноста расте од 220,7 mg TE/g CM кај SWF (1H) до 499,7 mg TE/g CM при 20 % PF (1H), но по двочасовна ферментација опаѓа на 437,5 mg TE/g CM. Овој јасен пораст во опсегот од 5–20 % PF укажува на тоа дека брашното од тиква значително ја засилува антиоксидативната активност, со највисоки вредности постигнати кај 15–20 % PF и пократка ферментација (1H).

Повисоката активност на DPPH во внатрешниот дел по двочасовна ферментација (2H) кај 10–20 % PF најверојатно произлегува од зголеменото создавање антиоксидативни меланоидини во подлабоките слоеви на лебот за време на печењето, каде што температурата е доволна за иницирање на Мејлардовата реакција, но без преголема деградација на фенолните соединенија. Наспроти тоа, кај кората, каде што температурата и оксидацијата се поинтензивни, дел од природните антиоксиданти може да се разложат, што резултира со благо намалување на активноста при 2H.

Резултатите добиени и од двата метода за определување на антиоксидативниот потенцијал (DPPH и ABTS) потврдуваат дека додавањето на 15–20 % брашно од тиква значително ја зголемува антиоксидативната активност на композитниот леб, при што внатрешниот дел демонстрира поизразен пораст по продолжена ферментација, а кората задржува повисока апсолутна активност поради термички произведените антиоксидативни соединенија. Сепак, методот DPPH покажува повисока антиоксидативна активност во внатрешниот дел по 2H ферментација, што сугерира дека дел од активните соединенија не потекнуваат само од природните феноли, туку и од соединенија формирани при термичката обработка (меланоидини и други редукциски производи). DPPH е особено чувствителен на вакви термички генерирани структури, додека ABTS во поголема мера ги детектира хидрофилните антиоксиданти поврзани со природните фенолни фракции на тиквата. Оттука, зголемената активност на DPPH по 2H ферментација најверојатно одразува формирање нови антиоксидативни структури во матрицата на лебот, додека вредностите на ABTS повеќе зависат од зачуваноста на природните антиоксиданти, што е поизразено при пократка ферментација (1H).



Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1H едночасовна, 2H двочасовна – време на ферментација; CM – сува материја; FeSO<sub>4</sub> – железо (II) сулфат еквиваленти по грам сува материја; Малите букви означуваат статистички значајни разлики меѓу примероците во групите на внатрешниот дел и во кората при ниво на значајност  $p = 0,05$

Графикон бр. 13: Редуктивна моќ определена со методот FRAP во кората и во внатрешниот дел на композитните лебови

Како што е прикажано на графиконот бр. 13, додавањето брашно од тиква во композитниот леб од мека пченица доведува до значително зголемување на редуктивната моќ (FRAP), што е во согласност со податоците од литературата кои укажуваат на тоа дека тиквата претставува богат извор на минерали како што се калиум, магнезиум, железо и селен, кои можат да придонесат и за редукциската моќ на финалниот производ (Wahyono et al., 2020).

Резултатите покажаа дека редукциската активност пропорционално се зголемува со зголемување на процентот на брашно од тиква, и тоа и во внатрешниот дел и во кората на лебот. Кај внатрешниот дел, вредностите се движат од 0,01 µg FeSO<sub>4</sub>/g CM кај контролниот примерок (SWF, 1H и 2H) до 0,07 µg FeSO<sub>4</sub>/g CM кај 20 % PF (и за 1H и 2H

ферментација). Кај кората, вредностите значително се повисоки: од 0,06  $\mu\text{g FeSO}_4/\text{g CM}$  кај SWF (1H) до 0,25  $\mu\text{g FeSO}_4/\text{g CM}$  при 20 % PF (1H), со благо намалување на 0,20  $\mu\text{g FeSO}_4/\text{g CM}$  по двочасовна ферментација (2H). Овие податоци јасно укажуваат на тоа дека кората има повисока редукциска активност во споредба со внатрешниот дел, што се должи на повисоката концентрација на соединенија со редукциски својства во површинскиот слој на лебот, каде што термичките процеси се најинтензивни.

Зголемувањето на редукциската активност во корката е најизразено во опсегот 10–20 % PF, особено при пократка ферментација (1H), кога биохемиските и термичките реакции се балансираани. Овој ефект може да се објасни со високата концентрација на фенолни киселини во брашното од тиква, како што се сиригична киселина, циметна киселина и протокатехуична киселина, како и полифеноли како р-кумароилхексозид, кверцетин-гликозид и ванилин, кои се познати по својата силна антиоксидативна и редукциска активност (Mokhtar et al., 2021). Овие соединенија се ослободуваат во поголема мера од кората на лебот, бидејќи термичката обработка и пониската содржина на вода овозможуваат поголема концентрација и полесна екстракција. Наспроти тоа, во внатрешниот дел, каде што влагата е повисока и температурата пониска, концентрацијата на овие соединенија е помала, што резултира со пониска редукциска активност.

И ферментацијата има значајно влијание врз редукциската моќ. При двочасовна ферментација (2H) се забележува намалување на редукциската активност, особено во кората (на пр. од 0,25  $\mu\text{g FeSO}_4/\text{g CM}$   $\rightarrow$  0,20  $\mu\text{g FeSO}_4/\text{g CM}$  кај 20 % PF). Овој пад може да се припише на делумна деградација на фенолните соединенија и на антиоксидативните пигменти при продолжена ензимска активност пред печење, како и на заситување на Мејлардовата реакција, кои инаку придонесуваат за формирање редукциски активни меланоидини.

Поголемата антиоксидативна активност регистрирана во кората во однос на внатрешниот дел упатува на значајна улога на термичката обработка, која доведува до концентрација на соединенијата на површината и до формирање Мејлардови производи (меланоидини) со изразени редукциски и антиоксидативни својства. Овој ефект е особено јасен кај FRAP, каде што резултатите за кората конзистентно се повисоки, што потврдува дека печењето не само што ги модифицира постоечките биоактивни компоненти, туку и создава нови антиоксидативни структури кои го зголемуваат редукцискиот капацитет на површината.

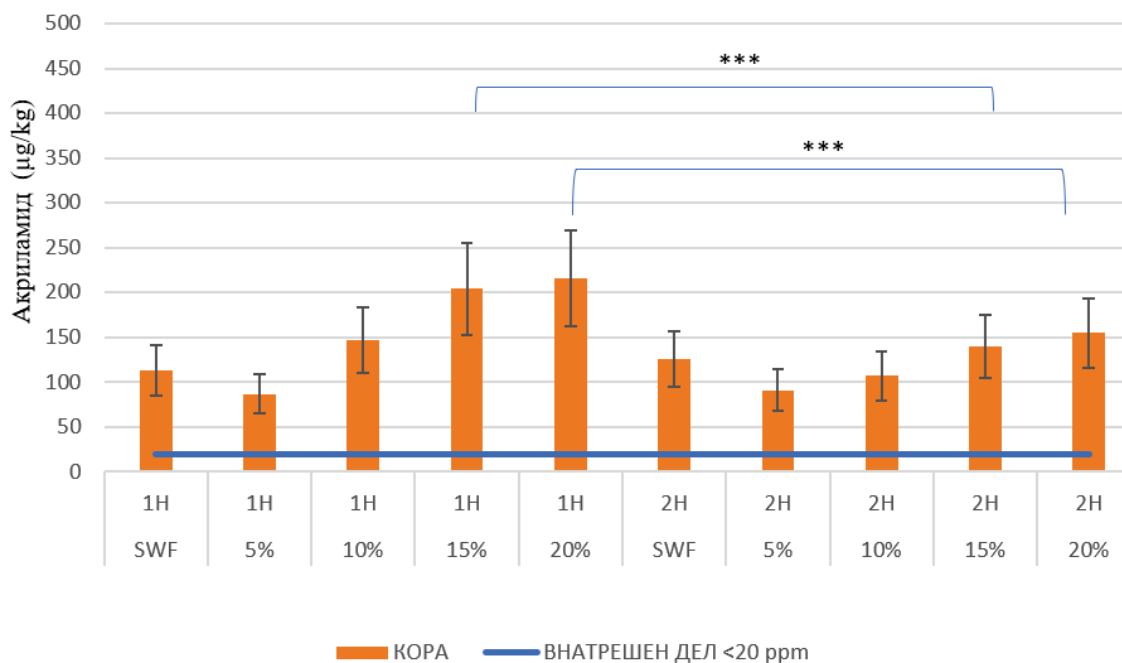
Во исто време, споредбата на резултатите добиени со методите FRAP, DPPH и ABTS покажува дека антиоксидативната активност на композитниот леб тесно е поврзана со полифенолната содржина. Примероците со повисока концентрација на брашно од тиква, особено 15–20 % PF, доследно демонстрираат повисоки вредности и во антиоксидативната и во редукциската способност, што укажува на функционална поврзаност помеѓу полифенолите, фенолните киселини и меланоидините и нивниот синергетски придонес во формирањето на вкупниот антиоксидативен потенцијал на финалниот производ.

Ефектот на технолошкиот режим дополнително се рефлектира преку ферментацијата: подолгата ферментација (2Н) генерално е асоцирана со малку пониска антиоксидативна активност во споредба со 1Н, при што истиот образец се забележува кај сите три метода и е во согласност со трендовите во полифенолната содржина. Најверојатно ова намалување произлегува од делумна деградација на биоактивните фракции (феноли, каротеноиди и токофероли) при продолжено ферментирање, што ги редуцира нивната достапност и нивната функционална активност во финалната матрица.

Добиените резултати се поткрепени и со наоди од литературата. Давуди и соработниците (Davoudi et al., 2020) известуваат дека додавањето брашно од тиква паралелно ја подобрува сензорната прифатливост и ги засилува антиоксидативните својства на лебот, што имплицира позитивна зависност помеѓу нивото на брашно од тиква и антиоксидативната активност. Дополнително, Кампусе и соработниците (Kampuse et al., 2015) покажуваат дека инкорпорирањето нуспроизводи од тиква во пченичен леб значително ја зголемува вкупната содржина на каротеноиди, при што  $\beta$ -каротенот има особено значајна способност да ги неутрализира слободните радикали, со што се подобрува вкупниот антиоксидативен профил на производот.

#### 4.2.10 Содржина на акриламид во внатрешниот дел и во кората на примероците леб

Содржината на акриламид во композитниот леб при различно време на ферментација е претставен на графиконот бр. 14.



Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1H и 2H го означуваат времето на ферментација; \*\*\* - статистички значајна разлика при  $p < 0,001$ .

Графикон бр. 14: Содржина на акриламид во кората и во внатрешниот дел на композитниот леб

Кај примероците подложени на едночасовна ферментација (1H), содржината на акриламид во кората покажува јасно изразен тренд на зголемување со порастот на концентрацијата на брашно од тиква (PF). Контролните примероци се карактеризираат со вредности од приближно 110  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , по што следува намалување при додавање 5 % PF (околу 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), а потоа значително зголемување кај примероците со 10 % PF (околу 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Највисоки концентрации на акриламид се детектирани кај варијантите со 15 % и 20 % PF, при што вредностите достигнуваат 200–220  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , а забележаните разлики статистички се значајни (\*\*\*).

Наспроти тоа, примероците подложени на двочасовна ферментација (2H) генерално покажуваат пониски нивоа на акриламид во кората. Контролните примероци имаат вредности од околу 130  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , додека зголемувањето на акриламидот со додавање PF е поумерено во споредба со 1H ферментацијата. Особено, примероците со 15 % и 20 % PF по двочасовна ферментација покажуваат значително пониски концентрации (140–150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) во однос на соодветните варијанти со едночасовна ферментација, при што

статистичката значајност (\*\*\*) укажува на висока сигурност на утврдените разлики. Во внатрешноста на лебот, концентрацијата на акриламид останува исклучително ниска (<20 µg/kg) кај сите испитувани примероци, независно од времетраењето на ферментацијата и од уделот на PF, што укажува на тоа дека формирањето акриламид е ограничено првенствено на кората како резултат на интензивните термички процеси.

Анализата на корелацијата помеѓу содржината на акриламид и параметрите на бојата ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), индексот на потемнување (Browning Index, BI) и содржината на редуцирачки шеќери открива јасна и конзистентна зависност меѓу интензитетот на термичките реакции и формирањето акриламид. Примероците со повисоки концентрации на акриламид, особено оние со 15–20 % PF и со едновременна ферментација, се карактеризираат со пониски вредности на  $L^*$  (намалена светлина) и повисоки вредности на  $a^*$  (интензивно црвенило), што укажува на тоа дека потемната кора е индикатор за поинтензивна Мејлардова реакција и за засилено формирање акриламид. Дополнително, индексот на потемнување значително се зголемува со повисоки концентрации на PF, при што оваа зависност е поизразена кај примероците со 1Н ферментација, што ја потврдува директната поврзаност помеѓу визуелните промени и хемиските процеси што се одвиваат при печењето.

Резултатите за содржината на редуцирачките шеќери дополнително ја потврдуваат оваа поврзаност, при што примероците со повисоки концентрации на брашно од тиква покажуваат повисоки концентрации на редуцирачки шеќери, кои се во согласност со зголеменото формирање акриламид, особено во кората. Овие шеќери претставуваат клучни прекурсори во Мејлардовите реакции, бидејќи реагираат со слободниот аспарагин при високи температури, што резултира со формирање акриламид. Следствено, повисоката содржина на редуцирачки шеќери кај примероците со 15 % и 20 % PF, во комбинација со поинтензивната боја и со зголемениот BI, е во согласност со детектираните повисоки нивоа на акриламид.

Сепак, продолжената ферментација (2Н) доведува до значително намалување на формирањето акриламид, што може да се објасни преку неколку меѓусебно поврзани фактори; (1) Зголемената потрошувачка на слободниот аспарагин, кој претставува клучен прекурсор за формирање акриламид, од клетките на квасецот за време на подолгата ферментација, резултира со намалена достапност за Мејлардовата реакција за време на печењето. При двочасовната ферментација, *Saccharomyces cerevisiae* активно го метаболизира аспарагинот како извор на азот, што се рефлектира во значително пониски концентрации на акриламид (околу 150 µg/kg) кај лебот со 20 % PF, во споредба со вредностите од околу 220 µg/kg забележани по едновременна ферментација.

Дополнително, (2) ензимската активност на аспарагиназата, присутна во *S. cerevisiae*, го хидролизира аспарагинот до аспарагинска киселина и амонијак, со што се намалува количеството достапно за синтеза на акриламид. Овој процес временски е зависен и станува поизразен со продолжувањето на ферментацијата. И (3) концентрацијата на редуцирачките шеќери се намалува, бидејќи квасецот ги користи како примарен извор на енергија за време на долготрајниот ферментациски период.

Намалувањето на овие шеќери го ограничува и вториот клучен прекурсор за формирање акриламид, што е во согласност со претходните резултати кои покажуваат значително намалување на редуцирачките шеќери по продолжена ферментација, особено кај примероците со висок удел на PF.

Покрај овие биохемиски фактори, и физичките услови во тестото влијаат врз формирањето акриламид. Повисоката влажност и активност на водата забележани кај примероците со 2Н ферментација ( $a_w = 0,966 \pm 0,002$ ) во споредба со контролата ( $a_w = 0,954 \pm 0,002$ ) доведуваат до променета кинетика на Мејлардовата реакцијата за време на печењето. Со зголемена содржина на влага, температурата на површината на лебот се зголемува побавно, што го ограничува формирањето акриламид.

Овие наоди сугерираат дека оптимизацијата на времето на ферментација претставува ефикасна и природна стратегија за намалување на акриламидот во леб со брашно од тиква, без потреба од адитиви. Со други зборови, едновремената ферментација обезбедува поинтензивна боја и поинтензивен вкус, но со повисок ризик од зголемено формирање акриламид, додека двочасовната ферментација води кон поповолен баланс меѓу безбедноста и сензорните карактеристики на финалниот производ.

Продолжената ферментација (2Н) резултира со пониски нивоа на акриламид во кората преку биохемиски и физички механизми – потрошувачка на аспарагин, редукција на редуцирачките шеќери и повисока влажност која ги забавува Мејлардовите реакции. Истовремено, повисоките концентрации на брашното од тиква (15–20 %) ги засилуваат визуелниот ефект и бојата, но и ја зголемуваат почетната предиспозиција за формирање акриламид, што ја потврдува потребата за прецизна контрола на ферментацијата како критичен технолошки параметар.

Слични студии укажуваат на тоа дека акриламидот во леб се формира главно преку Мејлардовите реакции меѓу редуцирачките шеќери и слободниот аспарагин за време на печењето (Melini et al., 2024), при што неговото ниво зависи од прекурсорите, динамиката и времетраењето на ферментацијата, додадените состојки и од условите на печење (Surdyk et al., 2004; Fredriksson et al., 2004; Açar & Gökmen, 2009; Caruano et al., 2010). Бидејќи корката достигнува повисоки површински температури и е поподложна на промени настанати како резултат на Мејлардовите реакции од внатрешноста на производот, акриламидот претежно се концентрира во корката на лебот (Shen et al., 2019; Crawford & Wang, 2019; Wächter et al., 2023; Klupšaitė et al., 2023). Вклучувањето брашно од тиква (5–20 %) може да го помести нивото на акриламид нагоре или надолу преку спротивставени механизми: шеќерите и слободните аминокиселини од тиквата можат да го зголемат нивото на прекурсори, додека диететските влакна и фенолните соединенија можат да ги изменат активноста на водата, топлотниот пренос и присуството на радикали, што би резултирало со потенцијално намалено формирање акриламид (Rózyło et al., 2014; Kampuse et al., 2015; Hoxha et al., 2023). Емпириските истражувања за композитни лебови покажуваат и зголемувања и намалувања, зависно од рамнотежата меѓу снабдувањето со прекурсори и ферментациските/антиоксидативните ефекти или

матрикс-индуцираните термални промени (Fredriksson et al., 2004; Capuano et al., 2010; Ma et al., 2020b), а специфични студии за лебови збогатени со тиква пријавуваат нутритивно збогатување и промени во реологијата/бојата што веројатно влијаат врз акриламидот (Rózyło et al., 2014; Jourden et al., 2017; Ge et al., 2021; Нохха et al., 2023). Продолжувањето на ферментацијата на тестото од 1Н на 2Н генерално го намалува акриламидот преку микробна потрошувачка на слободниот аспарагин и на ферментабилни шеќери, со значителни намалувања пријавени за квасни и за кисели теста и со дополнителни ефекти со избрани соеви LAB или аспарагиназа (Fredriksson et al., 2004; Tuncel et al., 2010; Ciesarová et al., 2014; Urbanaviciute et al., 2025).

Квантитативно, содржината на акриламид во корката варира широко според рецептурата и според процесот – за бели тост-лебови (анг. pan) се пријавени ~42,6–347,2 µg/kg, а за стандардните лебови може да биде ~200–600 µg/kg или >900 µg/kg—што ја нагласува силната улога на составот и на процесирањето (Shen et al., 2019; Jesus et al., 2018). Оттука, кај лебови со брашно од тиква и со различно времетраење на ферментација, се очекува кората секогаш да има повисоко ниво на акриламид од внатрешниот дел од лебот (Shen et al., 2019; Crawford & Wang, 2019). Конзистентни намалувања на нивото на акриламид се очекувани и поради продолженото времетраење на ферментацијата (Fredriksson et al., 2004; Ciesarová et al., 2014), но и поради ефектите од количеството на додадена тиква, бидејќи тиквата истовремено може да ја зголеми достапноста на прекурсорите за акриламид (редуцирачки шеќери и/или аспарагин), но и да придонесе со компоненти и со матрични ефекти што го ограничуваат неговото формирање – како диететски влакна и фенолни соединенија, како и промени во структурата и во термичкото однесување на кората при печење (Capuano et al., 2010; Rózyło et al., 2014; Ma et al., 2020b).

#### 4.2.11 Сензорна анализа

Резултатите од сензорната анализа се прикажани во табелата 20, на сликата бр. 11 и на графиконот бр. 15, при што беше применет коефициент на релевантност за да се квантифицираат различните сензорни карактеристики на лебот и да се оцени нивното значење во вкупната перцепција на квалитетот. Овој пристап овозможува поурамнотежена и попрецизна процена, со оглед на тоа дека сите атрибути не придонесуваат подеднакво за севкупната оценка на производот.

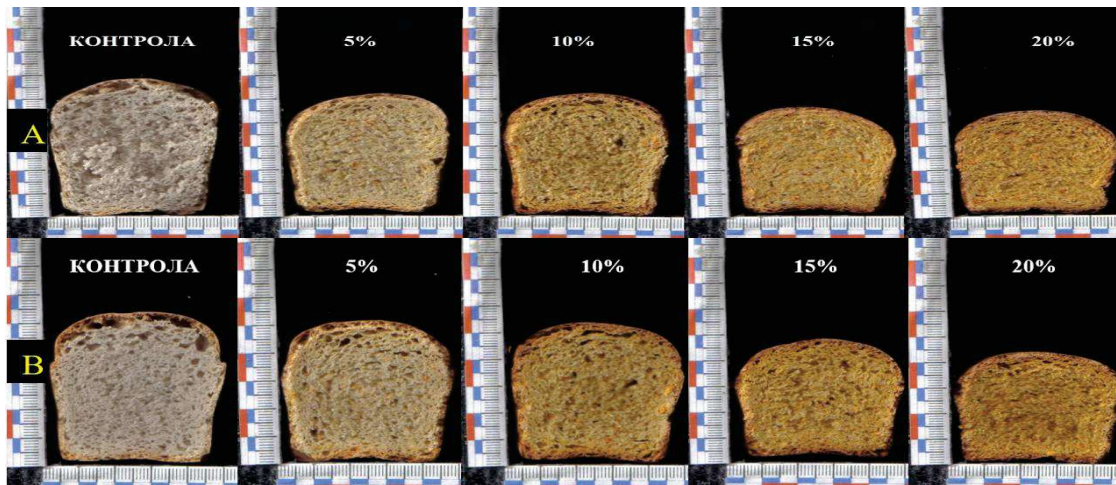
Табела 20: Сензорни карактеристики на примероците леб

Ферментација 1Н						
Примерок	Волумен	Надворешниот изглед	Изгледот на внатрешниот дел	Аромата на кората и внатрешниот дел	Вкусот на кората и внатрешниот дел	Вкупно поени
	*k=4	*k=3	*k=5	*k=3	*k=5	
SWF	4,71±0,49 <sup>a</sup>	4,43±0,53 <sup>a</sup>	4,29±0,76 <sup>a</sup>	4,57±0,53 <sup>a</sup>	4,43±0,53 <sup>a</sup>	<b>89,43</b>
5 %	4,29±0,49 <sup>a</sup>	4,71±0,49 <sup>a</sup>	4,43±0,53 <sup>a</sup>	4,29±0,49 <sup>a</sup>	4,71±0,49 <sup>a</sup>	<b>89,86</b>
10 %	4,14±0,38 <sup>b</sup>	4,14±0,38 <sup>a</sup>	4,14±0,38 <sup>a</sup>	4,29±0,76 <sup>a</sup>	4,43±0,53 <sup>a</sup>	<b>84,71</b>
15 %	3,14±0,38 <sup>c</sup>	3,86±0,38 <sup>a</sup>	3,57±0,53 <sup>a</sup>	3,29±0,49 <sup>b</sup>	3,14±0,38 <sup>b</sup>	<b>67,57</b>
20 %	2,43±0,53 <sup>d</sup>	3,43±0,53 <sup>b</sup>	2,57±0,53 <sup>b</sup>	3,00±0,58 <sup>b</sup>	2,57±0,53 <sup>c</sup>	<b>54,71</b>
Ферментација 2Н						
Примерок	Волумен	Надворешниот изглед	Изгледот на внатрешниот дел	Аромата на кората и внатрешниот дел	Вкусот на кората и внатрешниот дел	Вкупно поени
	*k=4	*k=3	*k=5	*k=3	*k=5	
SWF	5,00±0,41 <sup>a</sup>	5,00±0,51 <sup>a</sup>	5,00±0,72 <sup>a</sup>	4,65±0,50 <sup>a</sup>	4,49±0,51 <sup>a</sup>	<b>96,43</b>
5 %	4,44±0,43 <sup>a</sup>	4,97±0,42 <sup>a</sup>	5,00±0,54 <sup>a</sup>	4,32±0,48 <sup>a</sup>	4,73±0,48 <sup>a</sup>	<b>94,25</b>
10 %	4,30±0,31 <sup>a</sup>	4,35±0,34 <sup>a</sup>	4,67±0,50 <sup>a</sup>	4,30±0,72 <sup>a</sup>	4,44±0,56 <sup>a</sup>	<b>88,64</b>
15 %	3,23±0,33 <sup>b</sup>	4,00±0,33 <sup>b</sup>	3,86±0,51 <sup>b</sup>	3,34±0,52 <sup>b</sup>	3,18±0,34 <sup>b</sup>	<b>70,10</b>
20 %	2,32±0,49 <sup>c</sup>	3,22±0,45 <sup>c</sup>	2,17±0,52 <sup>c</sup>	3,00±0,55 <sup>b</sup>	2,57±0,51 <sup>b</sup>	<b>51,62</b>

\* коефициентот на релевантност (k); Контрола – SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква; 1Н едночасовна, 2Н двочасовна – време на ферментација; Различни букви во истата колона значат статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ).

Податоците од двете табели (1Н и 2Н ферментација) покажуваат јасен модел на зависност меѓу процентот на брашно од тиква и сензорната прифатливост на лебот. При 1Н, контролата (SWF) и варијантата со 5 % брашно од тиква се позиционираат на врвот според вкупните поени, со 89,43 и 89,86, соодветно, што укажува на тоа дека ниска супституција не ја нарушува, а во дел од атрибутите дури и ја подобрува сензорната перцепција. Кај 5 % беа добиени највисоки средни оценки за надворешниот изглед и вкусот на кората и за внатрешниот дел ( $4,71 \pm 0,49$ ), додека контролата задржа предност во волумен ( $4,71 \pm 0,49$ ) и во арома ( $4,57 \pm 0,53$ ); разликите меѓу SWF и 5 % поединечно не достигнаа статистичка значајност на  $p < 0,05$  (двострано), што имплицира сензорна еквиваленција на овие две формулации. На 10 % супституција, падот е најизразен во волуменот ( $4,14 \pm 0,38$ ), додека другите атрибути се во опсег 4,14–4,43 без значајна

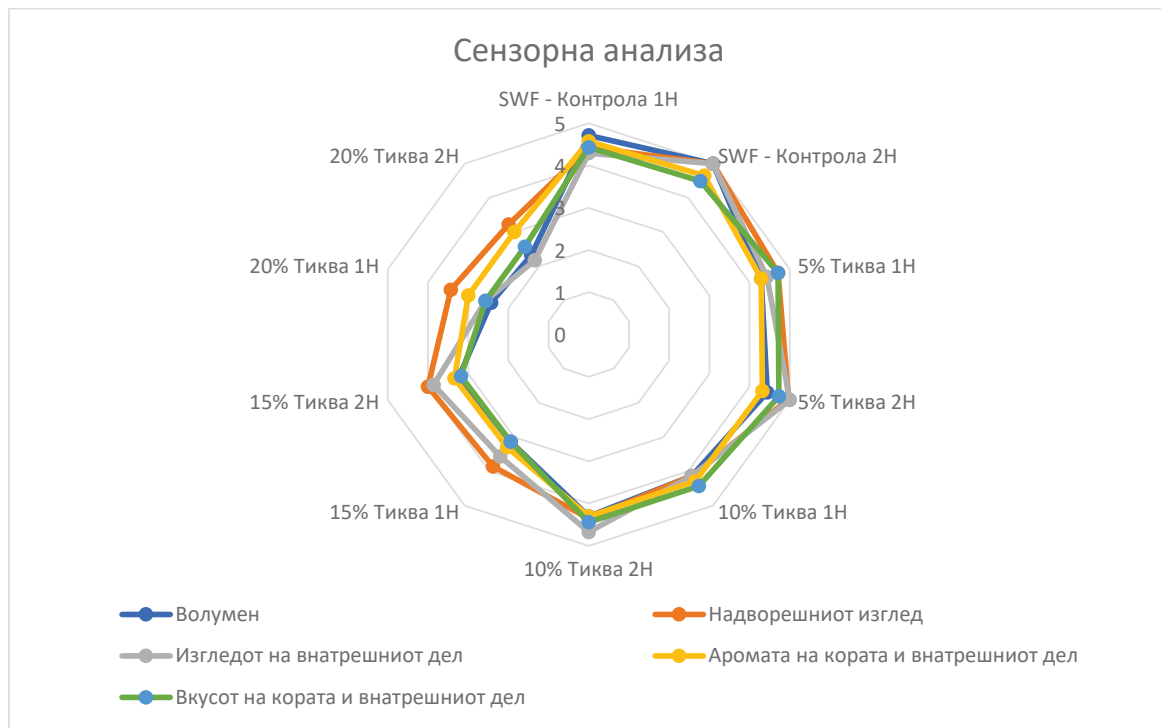
разлика од контролата, што покажува дека умерената супституција најнапред ја компромитира структурната димензија (волумен), а визуелните и хедоничките димензии остануваат релативно сочувани. Понатамошното зголемување на брашното од тиква на 15 % и 20 % резултира со систематско и статистички значајно намалување на сите сензорни атрибути во споредба со контролата: на 15 % волуменот се намалува на  $3,14 \pm 0,38$ , а вкусот и аромата на  $3,14 \pm 0,38$  и  $3,29 \pm 0,49$ , додека на 20 % ефектот е уште поизразен (волумен  $2,43 \pm 0,53$ ; вкус  $2,57 \pm 0,53$ ; внатрешен изглед  $2,57 \pm 0,53$ ); вкупните поени ја рефлектираат истата тенденција  $84,71 \rightarrow 67,57 \rightarrow 54,71$ . На сликата бр. 11 е илустрирана внатрешната структура за 1Н и за 2Н, при што деградацијата на порозноста и симетријата на алвеолите особено е видлива на 15–20 %.



(А – 1Н Ферментација; В – 2Н Ферментација); Контрола - SWF – брашно од мека пченица; 5 %, 10 %, 15 % и 20 % го означуваат процентот на брашно од тиква

Слика бр. 11: Изглед на напречен пресек на примероците леб

Двочасовната ферментација (2Н) ја менува сензорната слика во корист на формулациите со пониска супституција. Вкупните поени на SWF растат на 96,43, а на 5 % на 94,25. Средните оценки за волумен, за надворешен и внатрешен изглед кај двете формулации достигнуваат или се доближуваат до максималните вредности (на пр., SWF: волумен  $5,00 \pm 0,41$ ; надворешен изглед  $5,00 \pm 0,51$ ; внатрешен изглед  $5,00 \pm 0,72$ ; 5 %: внатрешен изглед  $5,00 \pm 0,54$ ; надворешен изглед  $4,97 \pm 0,42$ ). Клучен наод е дека на 10 % продолжената ферментација 2Н ја компензира разликата во волумен забележан на 1Н. Волуменот расте на  $4,30 \pm 0,31$  и статистички се израмнува со контролата ( $p < 0.005$ ), внатрешниот изглед се подобрува на  $4,67 \pm 0,50$ ; вкупните поени се зголемува на 88,64. И покрај ова, на 15 % останува јасна инфериорност по сите атрибути (волумен  $3,23 \pm 0,33$ ; внатрешен изглед  $3,86 \pm 0,51$ ; вкупно 70,10), додека на 20 % се забележува дополнително влошување на структурните индикатори во однос на 1Н (внатрешен изглед  $2,17 \pm 0,52$ ; волумен  $2,32 \pm 0,49$ ) со пад на вкупните поени на 51,62; аромата и вкусот на 20 % остануваат ниски и покрај малиот релативен поместувачки ефект на 2Н (арома  $3,00 \pm 0,55$ ; вкус  $2,57 \pm 0,51$ ).



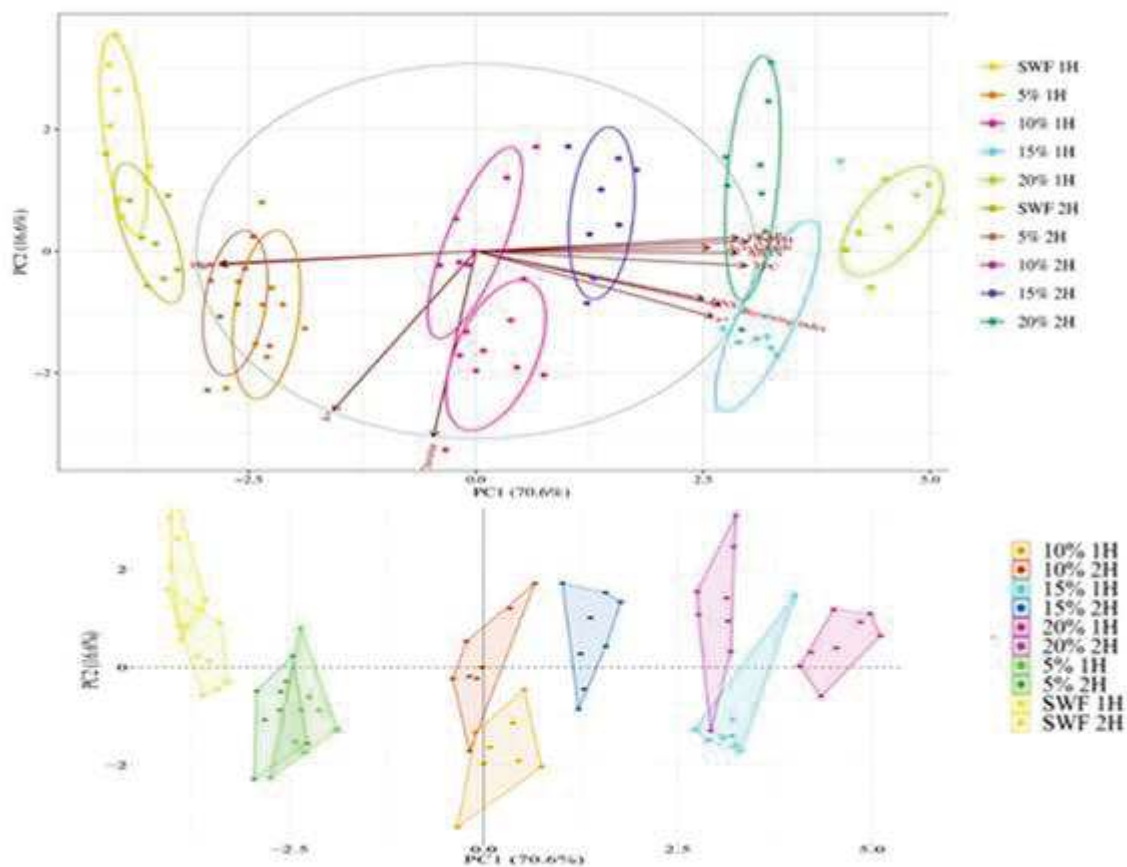
Графикон бр. 15: Сензорните карактеристики на лебот

Интеграцијата на резултатите за 1Н и за 2Н (графикон бр. 15) укажува на оптимален ферментациски опсег во кој низок до умерен степен на супституција (5–10 %) дозволува одржување или подобрување на перцептивните квалитети, додека високата супституција ( $\geq 15$  %) води кон кумулативен негативен ефект врз структурната стабилност и врз сензорниот профил. Можна технолошка интерпретација е дека диететските влакна и пектински компоненти од брашното од тиква ја зголемуваат апсорпцијата на вода и ја ослабуваат глутенската мрежа, што редуцира гасодржување и симетрична порозност; паралелно, пигментите и фенолните соединенија влијаат врз изгледот, аромата и врз вкусот. На 5–10 % овие ефекти се позитивни или неутрални, особено при двочасовна ферментација која промовира поцелосен развој на аромата и оптимално гасно полнење, додека над 10 % доминира негативното влијание врз структурата што двочасовната ферментација (2Н) не може да го компензира целосно; сликата бр. 11 и графиконот бр. 15 ги илустрираат овие разлики кај примероците леб.

Во согласност со литературата (Kampuse et al., 2015; Dabash et al., 2017; Pourmohammadi et al., 2020; Joy et al., 2021), резултатите поддржуваат препорака 5 % брашно од тиква како оптимален сензорен компромис независно од ферментацискиот режим, и најмногу 10 % како ниво при кое перцепираниот квалитет не се нарушува значајно доколку се обезбеди подолга ферментација; формулациите од 15–20 % бараат процесни адаптации (подесување на хидратацијата, засилување на глутенската мрежа, употреба на ензими/емулгатори и контрола на активноста на вода) за да се амортизира падот на квалитетот.

#### 4.2.12 Анализа PCA (Principal Component Analysis)

Графичкиот приказ на анализата PCA (главни компоненти – Principal Component Analysis) прикажан на графиконот бр. 16 претставува варијанса на податоците од 87,2 %, објаснета преку две главни компоненти – PC1 (70,6 %) и PC2 (16,6 %).



Компонентите PC1 и PC2 претставуваат првата и втората главна компонента, со вкупно објаснета варијанса од 87,2%, што го опишуваат делот од варијабилноста во податоците што најмногу придонесува за разликите меѓу примероците; Точките ги претставуваат индивидуалните примероци, а различните бои означуваат различни групи примероци; Елипсите означуваат 68 % доверливи интервали околу централните региони на групите; Стрелките ги претставуваат оригиналните варијабли, при што насоката на стрелките ја покажува корелацијата меѓу оригиналната променлива и главните компоненти, додека должината на стрелките го прикажува нејзиниот придонес кон PC1/PC2; Факторската мапа на анализата PCA е изведена врз основа на 80 примероци и на 12 варијабли, при што беа идентификувани десет кластер-групи, кои кореспондираат со специфични состави и услови на примероците.

Графикон бр. 16: Двослоен приказ на анализата на главни компоненти (PCA – Principal Component Analysis), кој се состои од биplot (горе) и факторска мапа (долу), дефинирани преку компонентите PC1 и PC2, со вкупна варијанса на податоците од 87,2 %.

Најголемиот дел од примероците се карактеризирани преку факторот PC1, кој е дефиниран со следнава формула:

$$\begin{aligned}
PC1 = & 0.291665 \times a + 0.322008 \times ABTS + 0.28763 \times \text{акриламид} \\
& -0,175328 \times b + 0.3000789 \times BI - 0.0520891 \times C + 0.280108 \times DNS \\
& + 0.335046 \times DPPH + 0.323021 \times FRAP - 0.31507 \times Hue \\
& - 0.315064 \times L + 0.315064 \times TPC
\end{aligned}$$

Резултатите од PCA укажуваат на тоа дека првата главна компонента (PC1) ги опфаќа речиси сите испитувани примероци, со исклучок на примерокот со 10 % PF (1H), кој се издвојува од другите. Околу PC1 се групирани најголемиот дел од активните варијабли, вклучително и содржина на акриламид, редуцирачки шеќери (DNS), вкупна содржина на полифеноли (TPC), антиоксидативната активност измерена со ABTS/FRAP/DPPH, индексот на потемнување (Browning Index), параметарот на боја  $a^*$  и нијансата (Hue). Просторната близина на варијаблите имплицира висока меѓусебна корелација, при што биоактивните индикатори (TPC, ABTS, FRAP и DPPH) се групираат заедно, а нивната позиција во однос на акриламидот укажува на тоа дека овие параметри се движат во слична насока. Паралелно, редуцирачките шеќери, BI и  $a^*$  се ориентирани кон интензитетот на потемнувањето и кон формирањето Мејлардови производи, што ја потврдува поврзаноста меѓу составот, колориметријата и термички индуцираните реакции. Наспроти нив, параметрите Hue,  $b^*$  и Chroma се позиционирани во спротивна насока, што сугерира негативна корелација со претходните променливи и укажува на обратно влијание врз визуелните карактеристики и врз антиоксидативниот профил.

Во согласност со ова групирање, кај композитниот леб со највисока концентрација на брашно од тиква (20 % PF) е регистрирана висока вкупна содржина на полифенолни соединенија и во внатрешноста на лебот, а уште поизразено во кората, при што TPC се појавува во позитивна корелација со содржината на акриламид, особено во кората. Овој наод е во линија со Гавлик-Џики (Gawlik-Dziki, 2009), кој укажува дека формирањето поголеми количини производи од Мејлардовите реакции може да ја зголеми *in vitro* „измерливоста“ на фенолните соединенија и со тоа да придонесе за повисока вкупна биоактивност, и кај традиционални и кај композитни лебови.

Истовремено, распределбата на акриламидот по фракции на лебот претставува клучен аспект во интерпретацијата. Претходни истражувања укажуваат на тоа дека највисоката концентрација на акриламид се акумулира во кората, каде што може да се содржи приближно 99 % од вкупниот акриламид, додека во внатрешниот дел се присутни само занемарливи количества (Liu et al., 2018). Во тој контекст, времетраењето на ферментацијата се идентификува како еден од регулаторите на нивото на акриламид. Продолжувањето на ферментацијата од 1H на 2H најчесто се поврзува со намалување на акриламидот, што е утврдено и од Рвубатсе и соработниците (Rwubatse et al., 2023), кои покажуваат дека подолга ферментација во комбинација со соодветни додатоци резултира со пониски нивоа на акриламид. Механистички, овој ефект се објаснува преку метаболизам на аспарагинот од квасецот и/или од млечнокиселите бактерии (LAB), со што се намалува достапноста на клучниот прекурсор за формирање акриламид во текот на печењето (Ciesarová et al., 2014).

Сепак, достапните студии укажуваат на тоа дека влијанието на тиквата врз акриламидот не е еднозначно. Јаворска и соработниците (Jaworska et al., 2019) пријавуваат дека, иако одредени растителни додатоци го намалуваат формирањето акриламид, тиквата може да предизвика зголемување на акриламидот во житни грицки, во одредени случаи и над безбедносните граници, паралелно со зголемување на антиоксидативната активност. Оттука, податоците упатуваат на комплексна, „двојна“ зависност меѓу концентрацијата на брашно од тиква, времетраењето на ферментацијата и формирањето акриламид. Практично, ова значи дека оптимизацијата на композитниот леб бара внимателно балансирање на функционалните придобивки (повисок ТРС и антиоксидативна активност) со потенцијалниот ризик од повисоки нивоа на акриламид, особено при повисоки концентрации на РФ и при пократка ферментација.

## ЗАКЛУЧОК

Систематското истражување на инкорпорирањето брашно од тиква (PF) во меко пченично брашно (SWF) откри мултифакторски ефекти врз технолошко-функционалните и врз нутритивните својства на лебот. Зголемената содржина на фини честички во брашното од тиква значително влијае врз интеракциите со водата и врз функционалните параметри на тестото. Поголемата способност за апсорпција на вода придонесува за подобрена формација на тестото и за задржување на свежината на лебот, додека измените во вискозноста, печењето и во формирањето на глутенската мрежа бараат прецизна оптимизација за индустриска примена.

Реолошките и текстуралните анализи укажуваат на тоа дека оптимално ниво на инкорпорација на брашно од тиква е 5–10 %, при што се задржуваат адекватни вискоеластични својства и истовремено се збогатува нутритивниот профил преку зголемена содржина на биоактивни соединенија и преку антиоксидативна активност. При повисоки нивоа на инкорпорација (15–20 %) се забележуваат намалување на стабилноста на гелот и пониска вискозност на пастата, што може да доведе до компромис на волуменот и структурата на внатрешниот дел и на лебот. Сепак, овие концентрации можат да бидат погодни за други пекарски производи кај кои развиената глутенска мрежа не е критична, како на пример колачи, кекси или мафини.

Промените во бојата предизвикани од додавањето брашно од тиква се сметаат за позитивна карактеристика кај производите со тип на интегрално брашно, каде што потрошувачите ја асоцираат потемната боја на внатрешниот дел како природен и здрав производ. Зголемената содржина на редуцирачки шеќери и засилената антиоксидативна активност истовремено ги подобруваат ферментациониот процес и трајноста на производот, придонесувајќи за неговата функционална и нутритивна вредност.

Разликите меѓу водните и етанолните екстракти укажуваат на различна растворливост на биоактивните соединенија и потреба од оптимизирани технолошки услови за нивно максимално искористување. Со зголемување на уделот на брашно од тиква се зголемуваат TPC и антиоксидативната активност (DPPH, ABTS и FRAP), што потврдува повисок функционален потенцијал на композитниот леб; затоа и кај лебовите се забележува раст на TPC и на антиоксидативните својства. Стабилното зголемување на антиоксидативната активност измерено преку DPPH, ABTS и FRAP укажува дека технолошката/термичката обработка не ги нарушува значајно нутритивните придобивки на композитниот леб.

Резултатите од втората експериментална фаза покажаа дека двочасовната ферментација во комбинација со 5–10 % замена со брашно од тиква обезбедува оптимален баланс помеѓу нутритивната вредност и технолошките својства, додека истовремено значително го намалува формирањето акриламид. Концентрациите на брашно од тиква над 15 % негативно влијаат врз специфичниот волумен и ја зголемуваат цврстината на внатрешниот дел на лебот, но не ја нарушуваат антиоксидативната стабилност на производот.

Двочасовната ферментација резултира со поповолен ефект врз одржувањето на волуменот при складирање, особено кај примероците со повисока содржина на брашно од тиква (15–20%), што може да придонесе за подобри сензорни својства и стабилност на производот. Додавањето брашно од тиква предизвикува потемна кора и изразито жолта нијанса во внатрешниот дел, што е во согласност со зголемените вредности на индексот на потемнување (BI) и на редуцирачките шеќери, кои истовремено влијаат врз развојот на бојата, вкусот и на аромата.

Продолженото време на ферментација ја намалува содржината на акриламид, најверојатно поради намалената достапност на аспарагин и на редуцирачки шеќери, но ги задржува биоактивните придобивки. Збогатувањето со брашно од тиква значително ја подобрува функционалната вредност на лебот преку зголемување на вкупните полифенолни соединенија (TPC) и на антиоксидативната активност, како што е потврдено преку методите DPPH, ABTS и FRAP. Затоа, се препорачува стандардизација на индустриски процес со двочасовна ферментација и 5–10 % замена со брашно од тиква, со строго следење на параметрите за боја и за содржина на редуцирачки шеќери како клучни показатели за квалитет и за безбедност.

Сензорната анализа (панел n=10) покажува дека ниската супституција со брашно од тиква (5 %) сензорно е еквивалентна или благо подобра од контролата (SWF), со највисоки/рамноправни оценки по изглед и по вкус и со високи вкупни поени во двата режима. При 10 % супституција се јавува пад главно во волуменот на 1Н, кој се компензира при 2Н, па вкупниот профил останува прифатлив. Формулациите со  $\geq 15$  % статистички се инфериорни по повеќето атрибути (особено волумен и внатрешен изглед) и покрај 2-часовна ферментација, со значаен пад на вкупните поени. Практично, 5 % се препорачува како оптимален сензорен компромис, а 10 % како горна граница што бара подолга ферментација; нивоата 15–20 % би барале дополнителни технолошки интервенции.

Во идни истражувања се препорачува да се насочи вниманието кон методи за продолжување на рокот на трајност, кон автоматизација на индустрискиот процес и кон процена на потрошувачката прифатливост. Дополнително, треба да се истражат комбинации со други видови растителни брашна за да се засилат антиакриламидните ефекти, како и да се развијат соодветни решенија за пакување кои ќе овозможат задржување на биоактивните својства и на стабилноста на производот.

Сумирано, ова истражување на докторската дисертација потврдува дека инкорпорацијата на брашно од тиква во пченично брашно претставува ефикасна стратегија за подобрување на нутритивниот профил на лебот, притоа задржувајќи ги технолошка функционалност и сензорна прифатливост, а истовремено намалувајќи ги потенцијалните ризици поврзани со формирањето акриламид. Овие наоди имаат висока применлива вредност за пекарската индустрија и претставуваат основа за понатамошен развој на функционални и безбедни производи од житни култури.

## KOPICTENA JIITEPATYPA

1. AACC International. (2011). *Method 55-60.01: Guideline for determination of particle size distribution*. St. Paul, Minn.: AACC International. AACC International.
2. AACC International. (2018). *Moisture—air-oven method, drying at 135 °C* (Method 44-19.01). In *AACC approved methods of analysis* (11th ed.). AACC International, St. Paul, MN, United States.
3. AOAC INTERNATIONAL. (2023). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (22nd ed.). AOAC INTERNATIONAL.
4. AOAC INTERNATIONAL. (2023). *Official Method 979.09: Protein in grains (Kjeldahl method)*. In *Official Methods of Analysis of AOAC International* (23rd ed.). AOAC INTERNATIONAL.
5. AOAC INTERNATIONAL. (2023). *Official Method 2022.01: Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods and Food Ingredients: Rapid Integrated Enzymatic-Gravimetric-Liquid Chromatography*. In *Official Methods of Analysis of AOAC International* (22nd ed.). AOAC INTERNATIONAL.
6. AOAC INTERNATIONAL. (2023). *Official Method 923.03: Ash of Flour — Direct Method*. In *Official Methods of Analysis of AOAC International* (22nd ed.). AOAC INTERNATIONAL.
7. AOAC INTERNATIONAL. (2019). *Carbohydrates (by difference)*. In *Official Methods of Analysis of AOAC International* (21st ed.). AOAC INTERNATIONAL.
8. Abdeen, Z., Ramlawi, A., Qaswari, R., Alrub, A. A., Dary, O., Rambelosen, Z., & Dkeidek, S. (2014). Predicted efficacy of the palestinian wheat flour fortification programme: complementary analysis of biochemical and dietary data. *Public Health Nutrition*, 18(8), 1358-1368. <https://doi.org/10.1017/s1368980014001554>
9. Abdel-Aal, E. M. & Rabalski, I. (2022a). Changes in phenolic acids and antioxidant properties during baking of bread and muffin made from blends of hairless canary seed, wheat, and corn. *Antioxidants*, 11(6), 1059. <https://doi.org/10.3390/antiox11061059>
10. Abdel-Aal, E. M., Mats, L., & Rabalski, I. (2022b). Identification of carotenoids in hairless canary seed and the effect of baking on their composition in bread and muffin products. *Molecules*, 27(4), 1307. <https://doi.org/10.3390/molecules27041307>
11. Açar, Ö. Ç. & Gökmen, V. (2009). Investigation of acrylamide formation on bakery products using a crust-like model. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(12), 1521-1525. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800585>
12. Adubofuor, J., Anomah, J. W., & Amoah, I. (2018). Anti-nutritional factors and mineral composition of pumpkin pulp and functional properties of pumpkin–wheat composite flour for bread preparation. *International Journal of Innovative Food Science and Technology*, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.25218/ijifst.2018.01.001.01>
13. Akbaş, M. & Kılmaoğlu, H. (2022). Evaluation of the effects of the use of vegetable and fruit extracts on bread quality properties. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(9), 1838–1844.

- <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i10.1838-1844.5168>
14. Akintade, A. O., Awolu, O. O., & Ifesan, B. O. T. (2019). Nutritional evaluation of fermented, germinated and roasted pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed flour. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 23(2), 179-186. <https://doi.org/10.2478/aucft-2019-0021>
  15. Aktas, N. & Gerçekaslan, K. E. (2024). Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) pulp flour as a source of dietary fiber: Chemical, physicochemical and technological properties. *Akademik Gıda*, 22(1), 14–22. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.1460957>
  16. Alashi, A. M., Taiwo, K. A., Oyedele, D. J., Adebooye, O. C., & Aluko, R. E. (2018). Polyphenol composition and antioxidant properties of vegetable leaf-fortified bread. *Journal of Food Biochemistry*, 43(6), e12625. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12625>
  17. Aldawood, N., Alrezaki, A., Alanazi, S., Amor, N., Alwasel, S., & Sirotkin, A. (2020). Acrylamide impairs ovarian function by promoting apoptosis and affecting reproductive hormone release, steroidogenesis and autophagy-related genes: An *in vivo* study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110595. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110595>
  18. Aljahani A. H. (2022). Wheat-yellow pumpkin composite flour: Physico-functional, rheological, antioxidant potential and quality properties of pan and flat bread. *Saudi journal of biological sciences*, 29(5), 3432–3439. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.040>
  19. Aljobair, M. O. (2024). Enrichment of bread with green pumpkin, watermelon and cucumber peels: Physicochemical, pasting, rheological, antioxidant and organoleptic properties. *Journal of Food Quality*, 2024, 6649325. <https://doi.org/10.1155/2024/6649325>
  20. Alviola, J. N. & Monterde, V. G. (2018). Physicochemical and functional properties of wheat (*Triticum aestivum*) and selected local flours in the Philippines. *Philippine Journal of Science*, 147(3), 419-430.
  21. Amrein, T., Andres, L., Escher, F., & Amadò, R. (2007). Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food Additives and Contaminants*, 24(1), 13–25. <https://doi.org/10.1080/02652030701242558>
  22. Amrein, T., Schönbachler, B., Rohner, F., Lukac, H., Schneider, H., Keiser, A., & Amadò, R. (2004). Potential for acrylamide formation in potatoes: Data from the 2003 harvest. *European Food Research and Technology*, 219(6), 572–578. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1025-z>
  23. An, L., Li, G., Si, J., Zhang, C., Han, X., & Wang, S.(2016). Acrylamide retards the slow axonal transport of neurofilaments in rat cultured dorsal root ganglia neurons and the corresponding mechanisms. *Neurochemical Research*, 41, 1000–1009. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1782-z>
  24. Anitha, S., Ramya, H. N., & Ashwini, A. (2020). Effect of mixing pumpkin powder with wheat flour on physical, nutritional and sensory characteristics of cookies.

- International Journal of Chemical Studies*, 8(4), 1030–1035. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i4g.9737>
25. Ashraf, W., Shehzad, A., Sharif, H. R., Aadil, R. M., Khan, M. R., & Zhang, L. (2020). Influence of selected hydrocolloids on the rheological, functional, and textural properties of wheat-pumpkin flour bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14777>
26. Aukkanit, N. & Sirichokworraki, S. (2016). Effect of dried pumpkin powder on physical, chemical, and sensory properties of noodle. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, 5(1), 14-18.
27. Ayaz, Q., Naik, H. R., Jan, N., Hussain, S. Z., Amin, T., Bashir, O., & Jabeen, A. (2022). Employing statistical approach to explore the possibility of replacing wheat flour with rice flour for development of gluten-free indian flatbread- is full replacement possible?. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(6), e16505. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16505>
28. Aziz, A., Noreen, S., Khalid, W., Ejaz, A., Faiz Ul Rasool, I., Maham, Munir, A., Farwa, Javed, M., Ercisli, S., Okcu, Z., Marc, R. A., Nayik, G. A., Ramniwas, S., & Uddin, J. (2023). Pumpkin and Pumpkin Byproducts: Phytochemical Constitutes, Food Application and Health Benefits. *ACS omega*, 8(26), 23346–23357. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02176>
29. Badia-Olmos, C., Laguna, L., Haros, C. M., & Tárrega, A. (2023). Techno-functional and rheological properties of alternative plant-based flours. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1411. <https://doi.org/10.3390/foods12071411>
30. Bai, Y., Zhang, M., Atluri, S. C., Chen, J., & Gilbert, R. G. (2020). Relations between digestibility and structures of pumpkin starches and pectins. *Food Hydrocolloids*, 106, 105894. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105894>
31. Bakare, A. H., Osundahunsi, O. F., & Olusanya, J. O. (2015). Rheological, baking, and sensory properties of composite bread dough with breadfruit (*Artocarpus communis* Forst) and wheat flours. *Food science & nutrition*, 4(4), 573–587. <https://doi.org/10.1002/fsn3.321>
32. Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: A perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60(3), 430–440. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>
33. Bartkienė, E., Bartkevičs, V., Pugajeva, I., Krunglevičiūtė, V., Mayrhofer, S., & Domig, K. J. (2017). Parameters of rye, wheat, barley, and oat sourdoughs fermented with *lactobacillus plantarum*luhs135 that influence the quality of mixed rye–wheat bread, including acrylamide formation. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(6), 1473-1482. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13412>
34. Batista, J., Braga, L., Oliveira, R., Silva, E., & Damiani, C. (2018). Partial replacement of wheat flour by pumpkin seed flour in the production of cupcakes filled with carob. *Food Science and Technology*, 38(2), 250–254. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.36116>

35. Batool, M., Ranjha, M. M. A. N., Roobab, U., Manzoor, M. F., Farooq, U., Nadeem, H. R., Nadeem, M., Kanwal, R., AbdElgawad, H., Al Jaouni, S. K., Selim, S., & Ibrahim, S. A. (2022). Nutritional Value, Phytochemical Potential, and Therapeutic Benefits of Pumpkin (*Cucurbita sp.*). *Plants*, *11*(11), 1394. <https://doi.org/10.3390/plants11111394>
36. Belleggia, L., Foligni, R., Ferrocino, I., Biolcati, F., Mozzon, M., Aquilanti, L., Osimani, A., & Harasym, J. (2023). Morphotextural, microbiological, and volatile characterization of flatbread containing cricket (*Acheta domesticus*) powder and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) flour. *Eur Food Res Technol* *249*, 2777–2795 <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04327-5>
37. Bemfeito, C. M., Carneiro, J. d. D. S., Carvalho, E. E. N., Coli, P. C., Pereira, R. C., & Boas, E. V. d. B. V. (2020). Nutritional and functional potential of pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp and pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) peel flours. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(10), 3920-3925. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04590-4>
38. Benedetto, A., Au, C., Avila, D. S., Milatovic, D., & Aschner, M. (2010). Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, *6*(8), e1001084. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001084>
39. Benedito de Barber, C., Prieto, J. A., & Collar, C. (1989). Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of changes in free amino acids during wheat bread dough fermentation. *Cereal Chemistry*, *66*(4), 283–288.
40. Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Imhof, D., Bazzocco, D., & Pfefferle, A. (2003). How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking? *European Food Research and Technology*, *217*(5), 369–373. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0779-z>
41. Bignardi, C., Cavazza, A., Grimaldi, M., Laganà, C., Manzi, C., Rinaldi, M., & Corradini, C. (2019). Acrylamide determination in baked potatoes by HPLC–MS: Effect of steam and correlation with colour indices. *European Food Research and Technology*, *245*, 2393–2400. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03357-2>
42. Bonoli, M., Marconi, E., & Caboni, M. F. (2004). Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *Journal of Chromatography A*, *1057*(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.024>
43. Cacak-Pietrzak, G., Sujka, K., Księżak, J., Bojarszczuk, J., Ziarno, M., Studnicki, M., Krajewska, A., & Dziki, D. (2024). Assessment of Physicochemical Properties and Quality of the Breads Made from Organically Grown Wheat and Legumes. *Foods*, *13*(8), 1244. <https://doi.org/10.3390/foods13081244>
44. Capuano, E. & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT –*

- Food Science and Technology*, 44(4), 793–810.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>
45. Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Acar, Ö., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42(9), 1295–1302. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.018>
  46. Capuano, E., Garofalo, G., Napolitano, A., Zieliński, H., & Fogliano, V. (2010). Rye flour extraction rate affects maillard reaction development, antioxidant activity, and acrylamide formation in bread crisps. *Cereal Chemistry*, 87(2), 131-136. <https://doi.org/10.1094/cchem-87-2-0131>
  47. Cardoso, R. V. C., Fernandes, Â., González-Paramás, A. M., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). Flour fortification for nutritional and health improvement: a review. *Food Research International*, 125, 108576. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108576>
  48. Carpentieri, S., Larrea-Wachtendorff, D., Donsì, F., & Ferrari, G. (2022). Functionalization of pasta through the incorporation of bioactive compounds from agri-food by-products: Fundamentals, opportunities, and drawbacks. *Trends Food Sci. Technol.*, 122, 49-65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.011>
  49. Carpentieri, S., Orkusz, A., Ferrari, G., & Harasym, J. (2024). Effect of replacing durum wheat semolina with *Tenebrio molitor* larvae powder on the techno-functional properties of the binary blends. *Current research in food science*, 8(6), 100672. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100672>
  50. Černiauskienė, J., Kulaitienė, J., Danilčenko, H., Jarienė, E., & Juknevičienė, E. (2014). Pumpkin fruit flour as a source for food enrichment in dietary fiber. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(1), 19–23. <https://doi.org/10.15835/nbha4219352>
  51. Chen, Z. & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>
  52. Chhanwal, N. & Anandharamakrishnan, C. (2014). Temperature- and moisture-based modeling for prediction of starch gelatinization and crumb softness during bread-baking process. *Journal of Texture Studies*, 45(6), 462–476. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12097>
  53. Chikpah, S. K., Korese, J. K., Hensel, O., Sturm, B., & Pawelzik, E. (2023). Influence of blend proportion and baking conditions on the quality attributes of wheat, orange-fleshed sweet potato and pumpkin composite flour dough and bread: Optimization of processing factors. *Discover Food*, 3(2), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s44187-023-00041-z>
  54. Ciesarová, Z., Kukurová, K., Mikušová, L., Basil, E., Polakovičová, P., Duchoňová, L., & Šturdík, E. (2014). Nutritionally enhanced wheat-oat bread with reduced acrylamide level. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 6(3), 327-334. <https://doi.org/10.3920/qas2013.0371>
  55. Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2008a). Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*, 47(2), 118–133. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.016>

56. Claus, A., Mongili, M., Weisz, G., Schieber, A., & Carle, R. (2008b). Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of Cereal Science*, 47(3), 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.011>
57. Claus, A., Schreiter, P., Weber, A., Graeff, S., Herrmann, W., Claupein, W., & Carle, R. (2006). Influence of agronomic factors and extraction rate on the acrylamide contents in yeast-leavened breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8968–8976. <https://doi.org/10.1021/jf061936f>
58. Codex Alimentarius. (2009). Code of practice for the reduction of acrylamide in foods (CAC/RCP 67-2009). [http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11258/CXP\\_067e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11258/CXP_067e.pdf)
59. Commission Regulation (EU) 2017/2158. (2017). Establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *Official Journal of the European Union*, L 304, 24–44.
60. Commission Regulation (EU) 2013/647/EU. (2013). Investigations into the levels of acrylamide in food Text with EEA relevance. *Official Journal of the European Union*, L 301, 15
61. Crawford, L. & Wang, S. (2019). Comparative study of four analytical methods for the routine determination of acrylamide in black ripe olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(46), 12633–12641. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00363>
62. Cuadrado, A. & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3), 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
63. Curtis, T., Powers, S., Balagiannis, D., Elmore, J. S., Mottram, D. S., Parry, M. A. J., & Halford, N. G. (2010). Free amino acids and sugars in rye grain: Implications for acrylamide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 195–202. <https://doi.org/10.1021/jf903577b>
64. Curtis, T. Y., Muttucumar, N., Shewry, P. R., Parry, M. A., Powers, S. J., Elmore, J. S., Mottram, D. S., Hook, 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. <https://doi.org/10.1021/jf8031292>
65. da Silva, A. I., Monteiro, L. R., Galindo, L. C., Nascimento, L. S., Moura, C. C., Freitas, R. M., & Lagranha, C. J. (2014). Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92(5), 330–337. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2013-0321>
66. Das, S. & Banerjee, S. (2015). Production of pumpkin powder and its utilization in bakery products development: A review. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 4(5), 478–481. <https://doi.org/10.15623/IJRET.2015.0405089>

67. Dastmalchi, F., Razavi, S. H., Faraji, M., & Labbafi, M. (2016). Effect of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* on acrylamide formation in flat bread and Bread roll. *Journal of food science and technology*, 53(3), 1531–1539. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2118-3>
68. Davis, K. F., Chhatre, A., Rao, N. D., Singh, D., Ghosh-Jerath, S., Mridul, A., Poblete-Cazenave, M., Pradhan, N., & DeFries, R. (2019). Assessing the sustainability of post-Green Revolution cereals in India. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(50), 25034–25041. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910935116>
69. Davoudi, Z., Shahedi, M., & Kadivar, M. (2020). Effects of pumpkin powder addition on the rheological, sensory, and quality attributes of Taftoon bread. *Cereal Chemistry*, 97(5), 904–911. <https://doi.org/10.1002/cche.10312>
70. Delatour, T., Perisset, A., Goldmann, T., Riediker, S., & Stadler, H.R. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrices such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4625–4631. <https://doi.org/10.1021/jf0498362>
71. Della Valle, G., Dufour, M., Hugon, F., Chiron, H., Saulnier, L., & Kansou, K. (2022). Rheology of wheat flour dough at mixing. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100873. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100873>
72. Demirkesen, İ., Şümmü, G., Şahin, S., & Uysal, N. (2011). Optimisation of formulations and infrared–microwave combination baking conditions of chestnut–rice breads. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(9), 1809–1815. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02682.x>
73. Deng, L., Zhao, M., Cui, Y., Xia, Q., Jiang, L., & Yin, H. (2021). Acrylamide induces intrinsic apoptosis and inhibits protective autophagy via the ROS mediated mitochondrial dysfunction pathway in U87-MG cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(6), 2601–2612. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1979030>
74. Duarte, S. M. S., Harasym, J., Sánchez-García, J., Kelaidi, M., Betoret, E., & Betoret, N. (2024). Suitability of almond bagasse powder as a wheat flour substitute in biscuit formulation. *Journal of Food Quality*, 2024, Article 7152554. <https://doi.org/10.1155/2024/7152554>
75. Dybing, E. & Sanner, T. (2003). Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 75(1), 7–15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg165>
76. Dybing, E., Farmer, P. B., Andersen, M., Fennell, T. R., Lalljie, S. P., Müller, D. J., Olin, S., Petersen, B. J., Schlatter, J., Scholz, G., Scimeca, J. A., Slimani, N., Törnqvist, M., Tuijtelaars, S., & Verger, P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(3), 365–410. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.004>

77. Dziki, D., Krajewska, A., & Findura, P. (2024). Particle Size as an Indicator of Wheat Flour Quality: A Review. *Processes*, 12(11), 2480. <https://doi.org/10.3390/pr12112480>
78. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4104. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>
79. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, 225, 1–27.
80. EFSA. (2009). Results on the monitoring of acrylamide levels in food. *EFSA Journal*, 285, 1–26.
81. EFSA. European Food Safety Authority (2011). *Monitoring of acrylamide levels in food from 2007-2009* (EFSA Journal, 9:2133). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2133>
82. Eke-Ejiofor, J., Victor-Uku, E. C., & Akusu, M. O. (2021). Physicochemical and functional properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) pulp flour and acceptability of its inclusion in cake. *Asian Food Science Journal*, 20(7), 57–71. <https://doi.org/10.9734/afsj/2021/v20i730321>
83. El Khatib, S., & Muhieddine, M. (2020). Nutritional Profile and Medicinal Properties of Pumpkin Fruit Pulp. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89274>
84. El-Demery, M. E. (2011). Evaluation of physico-chemical properties of toast bread fortified with pumpkin (*Cucurbita moschata*) flour. In *Proceedings of the 6th Arab and 3rd International Annual Scientific Conference on Development of Higher Specific Education Programs in Egypt and the Arab World in the Light of Knowledge Era Requirements*.13–14.
85. Erbaş, M., Sekerci, H., Arslan, S., & Durak, A. N. (2011). Effect of sodium metabisulfite addition and baking temperature on Maillard reaction in bread. *Journal of Food Quality*, 35(2), 144–151. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2012.00439.x>
86. Escalada, M. F. d., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2011). Effect of butternut (*cucurbita moschata duchesne ex poiret*) fibres on bread making, quality and staling. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 828-838. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0744-y>
87. Esposito, F., Velotto, S., Rea, T., Stasi, T., & Cirillo, T. (2020). Occurrence of Acrylamide in Italian Baked Products and Dietary Exposure Assessment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4156. <https://doi.org/10.3390/molecules25184156>
88. European Commission. (2017). *Regulation (EU) 2017/2158 of the European Parliament and of the Council establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food* (OJ L 304). <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/2158>
89. Fan, W., Zhao, J., & Li, Q. (2023). Effect of different food additives on the color protection of instant pumpkin flour. *Food Chemistry Advances*, 3, 100413. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100413>
90. Favetto, G., Resnik, S., Chirife, J., & Ferro Fontán, C. (1983). Statistical evaluation of water activity measurements obtained with the Vaisala Humicap humidity meter.

- Journal of Food Science*, 48(2), 534–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10783.x>
91. Fernández Peláez, J., Guerra, P., Gallego, C., & Gomez, M. (2021). Physical Properties of Flours Obtained from Wasted Bread Crusts and Crumbs. *Foods*, 10(2), 282. <https://doi.org/10.3390/foods10020282>
  92. Fink, M., Andersson, R., Rosén, J., & Åman, P. (2006). Effect of added asparagine and glycine on acrylamide content in yeast-leavened bread. *Cereal Chemistry*, 83(3), 218–222. <https://doi.org/10.1094/CC-83-0218>
  93. Food Drink Europe. (2019). *Acrylamide toolbox* (2019). Retrieved December 4, 2024, from [https://www.fooddrinkeurope.eu/wp-content/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope\\_Acrylamide\\_Toolbox\\_2019.pdf](https://www.fooddrinkeurope.eu/wp-content/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf)
  94. Forstová, V., Belková, B., Riddelová, K., Václavík, L., Příhoda, J., & Hajšlová, J. (2014). Acrylamide formation in traditional Czech leavened wheat–rye breads and wheat rolls. *Food Control*, 38, 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.022>
  95. Foyet, H. S., Tchinda Deffo, S., Koagne Yewo, P., Antioch, I., Zingue, S., Asongalem, E. A., Kamtchouing, P., & Ciobica, A. (2017). Ficus sycomorus extract reversed behavioral impairment and brain oxidative stress induced by unpredictable chronic mild stress in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 502. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2012-9>
  96. Fredriksson, H., Tallving, J., Rosén, J., & Åman, P. (2004). Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread. *Cereal Chemistry*, 81(5), 650–653. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.5.650>
  97. 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(15), 6113-6140. <https://doi.org/10.1021/jf0730486>
  98. Gallani, B. & Curtis, A. (2011). The revised food drink Europe 'acrylamide toolbox'. 25. 36-37.
  99. García-Segovia, P., Igual, M., & Martínez-Monzó, J. (2020). Physicochemical Properties and Consumer Acceptance of Bread Enriched with Alternative Proteins. *Foods*, 9(7), 933. <https://doi.org/10.3390/foods9070933>
  100. Gavril, R. N., Stoica, F., Lipşa, F. D., Constantin, O. E., Stănciuc, N., Aprodu, I., & Râpeanu, G. (2024). Pumpkin and pumpkin by-products: A comprehensive overview of phytochemicals, extraction, health benefits, and food applications. *Foods*, 13(17), 2694. <https://doi.org/10.3390/foods13172694>
  101. Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., & Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion *in vitro* on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.009>
  102. Ge, F., Wu, P., & Chen, X. D. (2021). Evolutions of rheology, microstructure and starch hydrolysis of pumpkin-enriched bread during simulated gastrointestinal

- digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(11), 6000–6010. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15273>
103. Ge, H., Yang, L., Yao, Q., Gu, Y., Zhang, C., Liu, X., Huang, F., & Zhang, Y. (2025). Carotenes from pumpkin flesh and peel: a review on their physicochemical properties, preparation techniques, detection methods and antioxidant potential. *ACS Food Science & Technology*, 5(3), 898-908. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00964>
  104. Gertz, C. & Klostermann, S. (2002). Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(11), 762–771. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200211\)104:11<762::AID-EJLT762>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200211)104:11<762::AID-EJLT762>3.0.CO;2-R)
  105. Ghavami, S., Sharma, P., Yeganeh, B., Ojo, O. O., Jha, A., Mutawe, M. M., Kashani, H.H., Los, M.J., Klönisch, T., Unruh, H., & Halayko, A.J. (2014). Airway mesenchymal cell death by mevalonate cascade inhibition: Integration of autophagy, unfolded protein response and apoptosis focusing on Bcl-2 family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(6), 1259–1271. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.006>
  106. Ghizdareanu, A.-I., Banu, A., Pasarin, D., Ionita, A., Nicolae, C.-A., Gabor, A., & Pătroi, D. (2023). Enhancing the Mechanical Properties of Corn Starch Films for Sustainable Food Packaging by Optimizing Enzymatic Hydrolysis. *Polymers*, 15(8), 1899. <https://doi.org/10.3390/polym15081899>
  107. Gökmen, V., & Şenyuva, H. (2006). Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. *Food Chemistry*, 99(2), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.054>
  108. Graeber, M. B. & Streit, W. J. (2010). Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 89–105. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0622-0>
  109. Grassino, A. N., Brnčić, S. R., Sabolović, M. B., Žlabur, J. Š., Marović, R., & Brnčić, M. (2023). Carotenoid content and profiles of pumpkin products and by-products. *Molecules*, 28(2), 858. <https://doi.org/10.3390/molecules28020858>
  110. Grassino, A. N., Karlović, S., Šošo, L., Dujmić, F., Sabolović, M. B., Marelja, M., & Brnčić, M. (2024). Influence of Different Drying Processes on the Chemical and Texture Profile of *Cucurbita maxima* Pulp. *Foods*, 13(4), 520. <https://doi.org/10.3390/foods13040520>
  111. Gravel, A. & Doyen, A. (2020). The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 59, 102272. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102272>
  112. Gülcan, Ü., Candal Uslu, C., Mutlu, C., Arslan-Tontul, S., & Erbaş, M. (2020). Impact of inert and inhibitor baking atmosphere on HMF and acrylamide formation in bread. *Food chemistry*, 332, 127434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127434>

113. Halford, N. G., Curtis, T. Y., Muttucumar, N., Postles, J., Elmore, J. S., & Mottram, D. S. (2012). The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *Journal of experimental botany*, 63(8), 2841–2851. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers011>
114. 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(15), 6145–6153. <https://doi.org/10.1021/jf703743g>
115. Harahap, Y., Jautan, A. S., & Sunarsih. (2021). *The levels of acrylamide and glycidamide as biomarker in smokers: An article review. Systematic Reviews in Pharmacy*, 12(1), 726–732.
116. Harasym, J., Satta, E., & Kaim, U. (2020). Ultrasound Treatment of Buckwheat Grains Impacts Important Functional Properties of Resulting Flour. *Molecules*, 25(13), 3012. <https://doi.org/10.3390/molecules25133012>
117. Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
118. HEATOX. (2007). Heat-generated food toxicants: Identification, characterisation and risk minimisation. The HEATOX Project – Project no. 506820. Sweden.
119. Hedegaard, R.V., Granby, K., Frandsen, H., Thygesen, J., & Skibsted L.H (2008). Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *European Food Research and Technology*, 227, 519-525. <https://doi.org/10.1007/S00217-007-0750-5>
120. Hee, P.-T. E., Liang, Z., Zhang, P., & Fang, Z. (2024). Formation mechanisms, detection methods and mitigation strategies of acrylamide, polycyclic aromatic hydrocarbons, and heterocyclic amines in food products. *Food Control*, 158, 110236. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110236>
121. Hogervorst, J. G., Schouten, L. J., Konings, E. J., Goldbohm, R. A., & van den Brandt, P. A. (2007). A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 16(11), 2304–2313. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0581>
122. Hoxha, I., Hoxha, B., Xhabiri, G., Shala, N., Dreshaj, A., & Durmishi, N. (2023). The effect of the addition of pumpkin flour on the rheological, nutritional, quality, and sensory properties of bread. *Ecological Engineering & Environmental Technology*, 24(7), 178–185. <https://doi.org/10.12912/27197050/169879>
123. Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q., & Jiang, Z. (2014). Biochemical characterization of a novel l -asparaginase with low glutaminase activity from rhizomucor miehei and its application in food safety and leukemia treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1561-1569. <https://doi.org/10.1128/aem.03523-13>
124. Hussain, A., Kausar, T., Din, A., Murtaza, M. A., Jamil, M. A., Iqbal, M. A., Majeed, M. A., Rafique, A., Iftikhar, A., Noreen, S., Quddoos, M.Y., & Mehmood, A. (2022a). Production, characterization, food application and biological study of powder of

- pumpkin (*Cucurbita maxima*) parts (peel, flesh and seeds). *Pure & Applied Biology*, 12, 48-60. <https://doi.org/10.19045/bspab.2023.120006>
125. Hussain, A., Kausar, T., Din, A., Murtaza, M. A., Jamil, M. A., Noreen, S., ur Rehman, H., Shabbir, H., & Ramzan, M. A. (2021). Determination of total phenolic, flavonoid, carotenoid, and mineral contents in peel, flesh, and seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, e15542. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15542>
126. Hussain, A., Kausar, T., Sehar, S., Sarwar, A., Ashraf, A. H., Jamil, M. A., Noreen, S., Rafique, A., Iftikhar, K., Quddoos, M. Y., Aslam, j., & Majeed, M.A. (2022b). A comprehensive review of functional ingredients, especially bioactive compounds present in pumpkin peel, flesh, and seeds, and their health benefits. *Food Chemistry: Advances*, 1, 100067. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100067>
127. Hussain, A., Laaraj, S., Kausar, T., Tikent, A., Azzouzi, H., Kausar, S., An, Q.U., Iqbal, A., Akram, S., Nisar, R., Najam, A., Fatima, H., Yaqub, Sh., & Elfazazi, K. (2023). Food application of orange seed powder through incorporation in wheat flour to boost vitamin and mineral profiles of formulated biscuits. *International Journal of Food Science*, 2023, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2023/6654250>
128. Hwang, E.-S., & Park, T. Y. (2022). Effect of adding pumpkin-sweet potato powder on cookie quality characteristics, antioxidant activity, and acrylamide reduction. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 51(12), 1312–1320. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2022.51.12.1312>
129. Igbabul, B., Ogunleye, R., & Amove, J. (2018). Quality characteristics of cookies prepared from wheat and fermented *afzelia africana* flour. *American Journal of Food Science and Technology*, 6(6), 247-252. <https://doi.org/10.12691/ajfst-6-6-3>
130. International Agency for Research on Cancer. (1994). *Acrylamide in Some industrial chemicals (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 60, 389–433.
131. İşleroğlu, H., Kemerli, T., Sakin-Yılmaz, M., Güven, G., Özdestan, Ö., Üren, A. & Kaymak-Ertekin, F. (2012). Effect of steam baking on acrylamide formation and browning kinetics of cookies. *Journal of Food Science*, 77(10). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02912.x>
132. Janoutová, J., Šerý, O., Hošák, L., & Janout, V. (2015). Is mild cognitive impairment a precursor of Alzheimer's disease? Short Review. *Central European Journal of Public Health*, 23(4), 365–367. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4414>
133. Jaworska, D., Mojska, H., Gielecińska, I., Najman, K., Gondek, E., Przybylski, W., & Krzyczkowska, P. (2019). The effect of vegetable and spice addition on the acrylamide content and antioxidant activity of innovative cereal products. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 36(3), 374–384. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1577991>
134. Jeevitha, G. R. & Bhuvana, S. (2019). Study on the impact of pumpkin seed flour on whole wheat bread characteristics. *International Journal of Chemical Studies*, 7(4),

<https://www.chemijournal.com/archives/?ArticleId=6375&issue=4&si=false>

135. Jesus, S., Delgado, I., Rego, A., Brandão, C. R., Santos, R. G. d., Bordado, J. C., & Castanheira, I. (2018). Determination of acrylamide in portuguese bread by uplc-ms/ms: metrological and chemometric tools. *Acta Imeko*, 7(2), 96. [https://doi.org/10.21014/acta\\_imeko.v7i2.453](https://doi.org/10.21014/acta_imeko.v7i2.453)
136. Jing, Y., Li, X., Hu, X., Ma, Z., Liu, L., & Ma, X. (2019). Effect of buckwheat extracts on acrylamide formation and the quality of bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6482–6489. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9927>
137. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). (2005). Evaluation of certain food contaminants.
138. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). (2020, January 11). *Summary report of the 64th meeting*. World Health Organization. [http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary\\_report\\_64\\_final.pdf](http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf)
139. Jouquand, C., Niquet-Léridon, C., Jacolot, P., Petit, N., Marier, D., & Gadonna-Widehem, P. (2018). Effects of Maillard Reaction Products on Sensory and Nutritional Qualities of the Traditional French Baguette. *Journal of food science*, 83(10), 2424–2431. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14331>
140. Jourden, S., Masson, M., Saint-Eve, A., Panouillé, M., Blumenthal, D., Lejeune, P., & Souchon, I. (2017). Effect of bread crumb and crust structure on the in vivo release of volatiles and the dynamics of aroma perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(16), 3330–3340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00287>
141. Joy, E., Chidinma, V. E., & Akusu, M. O. (2021). Physicochemical and functional properties of pumpkin (*cucurbita pepo*) pulp flour and acceptability of its inclusion in cake. *Asian Food Science Journal*, 20(7) 57-71. <https://doi.org/10.9734/afsj/2021/v20i730321>
142. Jukič, M., Lukinac, J., Čuljak, J., Pavlović, M., Šubarić, D., & Koceva Komlenić, D. (2019). Quality evaluation of biscuits produced from composite blends of pumpkin seed oil press cake and wheat flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 602–609. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13838>
143. Kafouris, D., Stavroulakis, G., Christofidou, M., Iakovou, X., Christou, E., Paikousis, L., Christodoulidou, M., Ioannou-Kakouri, E., & Yiannopoulos, S. (2018). Determination of acrylamide in food using a UPLC-MS/MS method: results of the official control and dietary exposure assessment in Cyprus. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 35(10), 1928–1939. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1508893>
144. Kaluđerski, G. & Filipović, N. (1998). Senzorno Ocenjivanje. Bo G. Kaluđerski, Metode ispitivanja kvaliteta žita, brašna i gotovih proizvoda. Novi Sad.
145. Kampuse, S., Ozola, L., Straumite, E., & Galoburda, R. (2015). Quality parameters of wheat bread enriched with pumpkin (*Cucurbita moschata*) by-products. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 19(1), 3–14.

- <https://doi.org/10.1515/aucft-2015-0010>
146. Karaś, M., Szymanowska, U., Borecka, M., Jakubczyk, A., & Kowalczyk, D. (2024). Antioxidant properties of wafers with added pumpkin seed flour subjected to in vitro digestion. *Applied Sciences*, 14(9), 5129. <https://doi.org/10.3390/app14125129>
147. Katyál, M., Singh, N., Viridi, A. S., Kaur, A., Chopra, N., Ahlawat, A. K., & Singh, A. M. (2017). Extraordinarily soft, medium-hard and hard Indian wheat varieties: Composition, protein profile, dough and baking properties. *Food Research International*, 100, 306-317. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.050>
148. Keramat, J., Le-Bail, A., Prost, C., & Jafari, M. (2010). Acrylamide in baking products: a review article. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 530-543. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0495-1>
149. Khorshidian, N., Yousefi, M., Shadnoush, M., Siadat, S. D., Mohammadi, M., & Mortazavian, A. M. (2020). Using probiotics for mitigation of acrylamide in food products: A mini review. *Current Opinion in Food Science*, 32, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.011>
150. Kim, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y. N., Choi, C., & Lee, B. H. (2012). Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. *Nutrition research and practice*, 6(1), 21–27. <https://doi.org/10.4162/nrp.2012.6.1.21>
151. Kirman, C. R., Gargas, M. L., Deskin, R., Tonner-Navarro, M. E., & Andersen, M. (2003). A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A*, 66, 253–274. <https://doi.org/10.1080/15287390306368>
152. Klupšaitė, D., Starkutė, V., Zokaitytė, E., Černauskas, D., Mockus, E., Kentra, E., Sllazaite, R., Abramavicture, G., Sakaite, P., & Komorova, V. (2023). The contribution of scalded and scalded-fermented rye wholemeal flour to quality parameters and acrylamide formation in semi-wheat-rye bread. *Foods*, 12(5), 937. <https://doi.org/10.3390/foods12050937>
153. Klymenko, S., Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., & Piórecki, N. (2019). Antioxidant Activities and Phenolic Compounds in Fruits of Cultivars of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.). *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, (3). Retrieved from <https://agrobiodiversity.uniag.sk/scientificpapers/article/view/306>
154. Kopańska, M., Łagowska, A., Kuduk, B., & Banaś-Ząbczyk, A. (2022). Acrylamide neurotoxicity as a possible factor responsible for inflammation in the cholinergic nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2030. <https://doi.org/10.3390/ijms23042030>
155. Kopańska, M., Lukáč, N., Kapusta, E., & Formicki, G. (2015). Acrylamide influence on activity of acetylcholinesterase, thiol groups, and malondialdehyde content in the brain of Swiss mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29, 472–478. <https://doi.org/10.1002/jbt.21717>

156. Kopp, E. K. & Dekant, W. (2009). Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicology and applied pharmacology*, 235(2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.001>
157. Kostecka-Gugała, A., Kruczek, M., Ledwożyw-Smoleń, I., & Kaszycki, P. (2020). Antioxidants and health-beneficial nutrients in fruits of eighteen Cucurbita cultivars: Analysis of diversity and dietary implications. *Molecules*, 25(8), 1792. <https://doi.org/10.3390/molecules25081792>
158. Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extracts on acrylamide formation in an emulsion system. *Food Chemistry*, 124(1), 242–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.025>
159. Krishnakumar, T., & Visvanathan, R. (2014). Acrylamide in food products: A review. *Journal of Food Processing and Technology*, 5, 1–9.
160. Kulczyński, B., & Gramza-Michałowska, A. (2019). The Profile of Secondary Metabolites and Other Bioactive Compounds in *Cucurbita pepo* L. and *Cucurbita moschata* Pumpkin Cultivars. *Molecules*, 24(16), 2945. <https://doi.org/10.3390/molecules24162945>
161. Kulczyński, B., Gramza-Michałowska, A., & Królczyk, J. B. (2020). Optimization of extraction conditions for the antioxidant potential of different pumpkin varieties (*Cucurbita maxima*). *Sustainability*, 12(4), 1305. <https://doi.org/10.3390/su12041305>
162. Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., Bednarska, S., & Bartosz, G. (2011). Yeast *Saccharomyces cerevisiae* devoid of Cu, Zn-superoxide dismutase as a cellular model to study acrylamide toxicity. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 25(2), 573–579. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.12.007>
163. Lawrence, G., Pejcz, E., Marchaux, I., Wojciechowicz-Budzisz, A., Olędzki, R., Aurore, G., & Harasym, J. (2025). Bioactive, Functional, and Technological Properties of Gluten-Free Pasta Enriched with Mango (*Mangifera indica* L.) Leaf Powder. *Foods*, 14(23), 4006. <https://doi.org/10.3390/foods14234006>
164. Li, D., Wang, P., Liu, Y., Hu, X., & Chen, F. (2016). Metabolism of acrylamide: Interindividual and interspecies differences as well as the application as biomarkers. *Current Drug Metabolism*, 17(4), 317–326. <https://doi.org/10.2174/1389200216666151015115007>
165. Lin, C. T., Tejano, L. A., Panjaitan, F. C. A., Permata, V. N. S., Sevi, T., & Chang, Y. W. (2024). Protein identification and potential bioactive peptides from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *Food science & nutrition*, 12(8), 5388–5402. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4188>
166. Lisovska, T., Tyupova, A., Olędzki, R., & Harasym, J. (2023). Microwave-Supported Modulation of Functional Characteristics of Gluten-Free Breads. *Applied Sciences*, 13(23), 12716. <https://doi.org/10.3390/app132312716>
167. Litvynchuk, S., Galenko, O., Cavicchi, A., Ceccanti, C., Mignani, C., Guidi, L., & Shevchenko, A. (2022). Conformational changes in the structure of dough and bread

- enriched with pumpkin seed flour. *Plants*, 11(20), 2762. <https://doi.org/10.3390/plants11202762>
168. Liu, J., Liu, X., Man, Y., & Liu, Y. (2018). Reduction of acrylamide content in bread crust by starch coating. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(1), 336–345. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8476>
169. Liu, Z., Song, G., Zou, C., Liu, G., Wu, W., & Yuan, T. (2015). Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 84, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.013>
170. Liu, Z., Souza, T. S. P. d., Holland, B. J., Dunshea, F. R., Barrow, C. J., & Suleria, H. A. R. (2023). Valorization of food waste to produce value-added products based on its bioactive compounds. *Processes*, 11(3), 840. <https://doi.org/10.3390/pr11030840>
171. Liubych, V., Novikov, V., Pushka, O., Pushka, I., Cherchel, V., Kyrpa, M., Kolibabchuk, T., Kirian, V., Moskalets, V., & Moskalets, T. (2023a). Development of the recipe of pasta with pumpkin flour. *EUREKA: Life Sciences*, (1), 57-65. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2023.002788>
172. Liubych, V., Novikov, V., Pushka, O., Pushka, I., Cherchel, V., Kyrpa, M., Kolibabchuk, T., Kirian, V., Moskalets, V., & Moskalets, T. (2023b). Development of wheat bread recipe with pumpkin paste. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 1(11), 60–68. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2023.274259>
173. Loi, M., & Paciolla, C. (2021). Plant antioxidants for food safety and quality: Exploring new trends of research. *Antioxidants*, 10(6), 972. <https://doi.org/10.3390/antiox10060972>
174. LoPachin, R. M., Barber, D. S., He, D., & Das, S. (2006). Acrylamide inhibits dopamine uptake in rat striatal synaptic vesicles. *Toxicological Sciences*, 89(1), 224–234. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj005>
175. LoPachin, R. M., Jr., & Lehning, E. J. (1994). Acrylamide-induced distal axon degeneration: A proposed mechanism of action. *Neurotoxicology*, 15, 247–259.
176. López-Moreno, C., Fernández-Palacios, S., Márquez, P. R., Márquez, S. J. R., Montosa, C. R., Otero, J. C., Navarrete, J. T. L., Ortiz, R. P., & Delgado, M. C. R. (2023). Assessment of acrylamide levels and evaluation of physical attributes in bread made with sourdough and prolonged fermentation. *Food Science and Engineering*, 5(1), 34–48. <https://doi.org/10.37256/fse.5120243690>
177. Ma, K., Mahesh, Vineeta, Gk, S., & Ad, S. (2019). Effect of pumpkin flour on the rheological characteristics of wheat flour and on biscuit quality. *Journal of Food Processing & Technology*, 10(10). <http://doi.org/10.35248/2157-7110.19.10.814>
178. Ma, Q., Cai, S., Jia, Y., Sun, X., Yi, J., & Du, J. (2020b). Effects of hot-water extract from vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) on acrylamide formation, quality and consumer acceptability of bread. *Foods*, 9(3), 373. <https://doi.org/10.3390/foods9030373>
179. Ma, S., Wang, Z., Liu, N., Zhou, P., Bao, Q., & Wang, X. (2020a). Effect of wheat bran dietary fibre on the rheological properties of dough during fermentation and

- Chinese steamed bread quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(4), 1623–1630. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14781>
180. Maan, A. A., Anjum, M. A., Khan, M. K. I., Nazir, A., Saeed, F., Afzaal, M., & Aadil, R. M. (2020). Acrylamide Formation and Different Mitigation Strategies during Food Processing – A Review. *Food Reviews International*, 38(1), 70–87. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1719505>
181. Mahmood, K., Alamri, M. S., Abdellatif, M. A., Hussain, S., & Qasem, A. A. A. (2018). Wheat flour and gum cordia composite system: pasting, rheology and texture studies. *Food Science and Technology*, 38(4), 691–697. <https://doi.org/10.1590/fst.10717>
182. Mardiah, M., Fitriandini, S., Hafiani, N., Fitrilia, T., & Widowati, S. (2020). Effect of Drying Method on Physicochemical Properties of Pumpkin Flour. *International Journal of Advanced Science and Technology*, 29(7), 3174–3189.
183. Márquez Cardozo, C.J., Molina Hernández, D., Caballero, B.L., Ciro Velásquez, H.J., Restrepo Molina, D.A., & Correa Londoño, G.A. (2021). Physical, physiological, physicochemical and nutritional characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) in postharvest stage cultivated in Antioquia-Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 74(3), 9735-9744. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n3.90820>
184. Martinez, E., Rodríguez, J., Mondragon, A., Lorenzo, J., & Santos, E. (2019). Influence of potato crisps processing parameters on acrylamide formation and bioaccessibility. *Molecules*, 24(21), 3827. <https://doi.org/10.3390/molecules24213827>
185. Mato, L., Damani, Z., Osmanaj, A., & Topi, D. (2024). Nutritional value and quality aspects of wheat produced and consumed in Albania. *BIO Web of Conferences*, 85, 01059. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20248501059>
186. Matoso, V., Bargi-Souza, P., Ivanski, F., Romano, M. A., & Romano, R. M. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food chemistry*, 283, 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.054>
187. Melini, V., Vescovo, D., Melini, F., & Raffo, A. (2024). Bakery product enrichment with phenolic compounds as an unexplored strategy for the control of the maillard reaction. *Applied Sciences*, 14(6), 2647. <https://doi.org/10.3390/app14062647>
188. Mesias, M., Holgado, F., Márquez-Ruiz, G., & Morales, F. (2016). An investigation of process contaminants' formation during the deep frying of breadcrumbs using a bread coat model. *Food & Function*, 7(3), 1645–1654. <https://doi.org/10.1039/C6FO00031B>
189. Michalak, J., Czarnowska-Kujawska, M., & Gujska, E. (2019). Acrylamide and thermal-processing indexes in market-purchased food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23), 4724. <https://doi.org/10.3390/ijerph16234724>

190. 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(1), 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.08.006>
191. Michalak, J., Czarnowska-Kujawska, M., Klepacka, J., & Gujska, E. (2020). Effect of Microwave Heating on the Acrylamide Formation in Foods. *Molecules*, 25(18), 4140. <https://doi.org/10.3390/molecules25184140>
192. Michalak, J., Gujska, E., Czarnowska, M., Klepacka, J., & Nowak, F. (2016). Effect of Storage on Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural Contents in Selected Processed Plant Products with Long Shelf-life. *Plant foods for human nutrition*, 71(1), 115–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0523-4>
193. Michalak, J., Gujska, E., Czarnowska-Kujawska, M., & Nowak, F. (2017). Effect of different home-cooking methods on acrylamide formation in pre-prepared croquettes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.006>
194. Mildner-Szkudlarz, S., Rózańska, M., Piechowska, P., Waskiewicz, A., & Zawirska-Wojtasiak, R. (2019). Effects of polyphenols on volatile profile and acrylamide formation in a model wheat bread system. *Food Chemistry*, 297, 125008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125008>
195. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
196. Minarovičová, L., Lauková, M., Karovičová, J., & Kohajdová, Z. (2018). Utilization of pumpkin powder in baked rolls. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12(1), 195–201. <https://doi.org/10.5219/887>
197. Mittal, S., Dhiman, A. K., Sharma, A., Attri, S., & Kathuria, D. (2019). Standardization of recipes for preparation of pumpkin (*Cucurbita moschata*) flour and its quality evaluation during storage. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(2), 3224–3235. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.802.377>
198. Mohr, S., Stamler, J. S., & Brüne, B. (1994). Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxyxynitrite, and related nitrosating agents. *FEBS Letters*, 348(3), 223–227. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00596-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00596-6)
199. Mokhtar, M., Bouamar, S., Di Lorenzo, A., Temporini, C., Daglia, M., & Riazi, A. (2021). The influence of ripeness on the phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of pumpkins (*Cucurbita moschata* Duchesne). *Molecules*, 26(12), 3623. <https://doi.org/10.3390/molecules26123623>
200. Mollakhalili-Meybodi, N., Khorshidian, N., Nematollahi, A., & Arab, M. (2021). Acrylamide in bread: a review on formation, health risk assessment, and determination by analytical techniques. *Environmental science and pollution research international*, 28(13), 15627–15645. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12775-3>

201. Montesano, D., Blasi, F., Simonetti, M. S., Santini, A., & Cossignani, L. (2018). Chemical and Nutritional Characterization of Seed Oil from *Cucurbita maxima* L. (var. Berrettina) Pumpkin. *Foods*, 7(3), 30. <https://doi.org/10.3390/foods7030030>
202. Morreale, F., Garzon, R., & Rosell, C. M. (2018). Understanding the role of hydrocolloids viscosity and hydration in developing gluten-free bread: A study with hydroxypropylmethylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 77, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.004>
203. Morris, C. F., Lillemo, M., Simeone, M. C., Giroux, M. J., Babb, S. L., & Kidwell, K. K. (2001). Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Science*, 41(1), 218–228. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2001.411218X>
204. Mottram, D., Wedzicha, B., & Dodson, A. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419(6906), 448–449. <https://doi.org/10.1038/419448a>
205. Mrázková, M., Sumczynski, D., & Orsavová, J. (2023). Influence of storage conditions on stability of phenolic compounds and antioxidant activity values in nutraceutical mixtures with edible flowers as new dietary supplements. *Antioxidants*, 12(4), 962. <https://doi.org/10.3390/antiox12040962>
206. Mucci, L. A., & Adami, H. O. (2005a). The role of epidemiology in understanding the relationship between dietary acrylamide and cancer risk in humans. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 561, 39–47. [https://doi.org/10.1007/0-387-24980-X\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-24980-X_3)
207. Mucci, L. A., & Wilson, K. A. (2008). Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6013–6019. <https://doi.org/10.1021/jf703747b>
208. Mucci, L. A., Dickman, P. W., Steineck, G., Adami, H. O., & Augustsson, K. (2003). Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *British journal of cancer*, 88(1), 84–89. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600726>
209. Mucci, L. A., Lindblad, P., Steineck, G., & Adami, H. O. (2004). Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *International journal of cancer*, 109(5), 774–776. <https://doi.org/10.1002/ijc.20011>
210. Mucci, L. A., Sandin, S., Bälter, K., Adami, H. O., Magnusson, C., & Weiderpass, E. (2005b). Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *JAMA*, 293(11), 1322–1327. <https://doi.org/10.1001/jama.293.11.1326>
211. Mucci, L., Ahlbom, A., & Wolk, A. (2006). Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *International Journal of Cancer*, 118(1), 169–173. <https://doi.org/10.1002/ijc.21309>
212. Murray, S. M., Waddell, B. M., & Wu, C. W. (2020). Neuron-specific toxicity of chronic acrylamide exposure in *C. elegans*. *Neurotoxicology and Teratology*, 77, 106848. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.106848>

213. Muthoni, J. and Shimelis, H. (2025). Pumpkin (*Cucurbita ssp.*): A neglected and underutilized crop with potential for production in africa. *Australian Journal of Crop Science*, 19(02), 152-160. <https://doi.org/10.21475/ajcs.25.19.02.p212>
214. Nedviha, S., & Harasym, J. (2024). Functional and antioxidative characteristics of soft wheat and tiger nut (*Cyperus esculentus*) flours binary blends. *Foods*, 13(4), 596. <https://doi.org/10.3390/foods13040596>
215. Nedviha, S., & Harasym, J. (2025). Characteristics of Soft Wheat and Tiger Nut (*Cyperus esculentus*) Composite Flour Bread. *Foods*, 14(2), 229. <https://doi.org/10.3390/foods14020229>
216. Negoită, M. A., Iorga, E., Catana, L., Catana, M., & Bădescu, B. (2015). Internal validation of the method for determination of acrylamide in bread by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Revista de Chimie*, 66, 464–471.
217. Nematollahi, A., Kamankesh, M., Hosseini, H., Ghasemi, J., Hosseini-Esfahani, F., & Mohammadi, A. (2019). Investigation and determination of acrylamide in the main group of cereal products using advanced microextraction method coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Cereal Science*, 87, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.03.019>
218. Nguyen, H., & Van Boekel, M. (2017). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during biscuit baking. Part II: Effect of the ratio of reducing sugars and asparagine. *Food Chemistry*, 230, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.009>
219. Norshazila, S., Irwandi, J., Othman, R., & Yumi Zuhani, H. H. (2014). Carotenoid content in different locality of pumpkin (*Cucurbita moschata*) in Malaysia. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(3), 29–32
220. Nucia, A., Okoń, S., Tomczyńska-Mleko, M., & Nawrocka, A. (2021). Molecular and physical characterization of grain hardness in European spring common wheat (*Triticum aestivum* L.). *3 Biotech*, 11(7), 345. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02897-3>
221. Nurgozhina, Z., Shansharova, D., Umirzakova, G., Maliktayeva, P., & Yakiyayeva, M. (2022). The influence of grain mixtures on the quality and nutritional value of bread. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 16, 320–340. <https://doi.org/10.5219/1767>
222. Olakanmi, S. J., Jayas, D. S., & Paliwal, J. (2022). Implications of blending pulse and wheat flours on rheology and quality characteristics of baked goods: a review. *Foods*, 11(20), 3287. <https://doi.org/10.3390/foods11203287>
223. Ołędzki, R., & Harasym, J. (2023). Boiling vs. Microwave Heating—The Impact on Physicochemical Characteristics of Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.) at Different Ripening Stages. *Applied Sciences*, 13(14), 8175. <https://doi.org/10.3390/app13148175>
224. Pan, X., Wu, X., Yan, C., Peng, C., Rao, H., & Yan, H. (2018). Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12

- cells: Involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF-kappaB pathways regulated by MAPKs. *Toxicology Letters*, 288, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.002>
225. Pan, X., Yan, D., Wang, D., Wu, X., Zhao, W., & Yan, H. (2017). Mitochondrion-mediated apoptosis induced by acrylamide is regulated by a balance between Nrf2 antioxidant and MAPK signaling pathways in PC12 cells. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4781–4794. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0021-1>
226. Pasha, I., Ain, Q., Khan, B., Butt, S., & Saeed, M. (2013). Rheological and functional properties of pumpkin wheat composite flour. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 23(2), 100–104.
227. Patil, S. P., Jain, P. D., Sancheti, J. S., Ghumatkar, P. J., Tambe, R., & Sathaye, S. (2014). Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP-induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*, 86, 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.012>
228. Păucean, A., & Man, S. (2014). Physico-chemical and sensory evaluations of wheat bread with pumpkin (*Cucurbita maxima*) pulp incorporated. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(1), 26–32.
229. 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(2), 467–471. <https://doi.org/10.1002/ijc.21336>
230. Pereira, A. M., Krumreich, F. D., Ramos, A. H., Krolow, A. C. R., Santos, R. B., & Gularte, M. A. (2020). Physicochemical characterization, carotenoid content and protein digestibility of pumpkin access flours for food application. *Food Science and Technology*, 40(Suppl. S2), 691–698. <https://doi.org/10.1590/fst.38819>
231. Pinna, N., Ben Abbou, S., Ianni, F., Angeles Flores, G., Pietercelie, A., Perretti, G., Blasi, F., Angelini, P., & Cossignani, L. (2024). Phenolic compounds from pumpkin pulp: Extraction optimization and biological properties. *Food chemistry: X*, 23, 101628. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101628>
232. Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021). How does the phenol structure influence the results of the Folin–Ciocalteu assay? *Antioxidants*, 10(5), 811. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>
233. Polyzos, N., Fernandes, Â., Calhelha, R. C., Petrović, J., Soković, M., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Petropoulos, S. A. (2024). Biochemical Composition of Pumpkin Seeds and Seed By-Products. *Plants*, 13(17), 2395. <https://doi.org/10.3390/plants13172395>
234. Pongjanta, J., Naulbunrang, A., Kawngdang, S., Manon, T., & Thepjaikat, T. (2006). Utilization of pumpkin powder in bakery products. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 28(1), 71–79
235. Portman, D., Maharjan, P., Blanchard, C., Naiker, M., & Panozzo, J. (2021). Impact of thermal processing on levels of acrylamide in a wheat-lentil flour matrix. *Legume Science*, 3(4). <https://doi.org/10.1002/leg3.78>

236. Pourmohammadi, O., Ghaboos, S. H. H., & Jafarian, S. (2020). Physicochemical, rheological, and sensorial properties of bread supplemented with pumpkin powder and basil seed gum. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(12). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14739>
237. Prommaban, A., Kuanchoom, R., Seepuan, N., & Chaiyana, W. (2021). Evaluation of Fatty Acid Compositions, Antioxidant, and Pharmacological Activities of Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Seed Oil from Aqueous Enzymatic Extraction. *Plants*, 10(8), 1582. <https://doi.org/10.3390/plants10081582>
238. Promsakha na Sakon Nakhon, P., Jangchud, K., Jangchud, A., & Prinyawiwatkul, W. (2017). Comparisons of physicochemical properties and antioxidant activities among pumpkin (*Cucurbita moschata* L.) flour and isolated starches from fresh pumpkin or flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(11), 2436–2444. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13528>
239. Purlis, E. (2011). Bread baking: technological considerations based on process modelling and simulation. *Journal of Food Engineering*, 103(1), 92-102. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.003>
240. Purlis, E. (2012). Baking process design based on modelling and simulation: towards optimization of bread baking. *Food Control*, 27(1), 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.034>
241. Que, F., Mao, L., Fang, X., & Wu, T. (2008). Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(7), 1195–1201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01590.x>
242. Raffan, S., & Halford, N. (2019). Acrylamide in food: Progress in and prospects for genetic and agronomic solutions. *Annals of Applied Biology*, 175(3), 259–281. <https://doi.org/10.1111/aab.12536>
243. Rakcejeva, T., Galoburda, R., Cude, L., & Strautniece, E. (2011). Use of dried pumpkins in wheat bread production. *Procedia Food Science*, 1, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.068>
244. Ramos, P. R. (2024). Nutritional quality of bakery products enriched with alternative flours. *International Journal of Family & Community Medicine*, 8(2), 49-54. <https://doi.org/10.15406/ijfcm.2024.08.00349>
245. Rațu, R. N., Stoica, F., Lipșa, F. D., Constantin, O. E., Stănciuc, N., Aprodu, I., & Râpeanu, G. (2024). Pumpkin and pumpkin by-products: a comprehensive overview of phytochemicals, extraction, health benefits, and food applications. *Foods*, 13(17), 2694. <https://doi.org/10.3390/foods13172694>
246. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26(9-10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

247. Rezig, L., Chouaibi, M., Ojeda-Amador, R. M., Gomez-Alonso, S., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Hamdi, S. (2018). *Cucurbita maxima* pumpkin seed oil: From the chemical properties to the different extracting techniques. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 663–669. <https://doi.org/10.15835/nbha46211129>
248. Rico, X., Gullón, B., Alonso, J. L., & Yáñez, R. (2020). Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview. *Food Research International*, 132, 109086. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086>
249. Robert, F., Vuataz, G., Pollien, P., Saucy, F., Alonso, M., Bauwens, I., ... & Blank, I. (2004). Acrylamide formation from asparagine under low-moisture maillard reaction conditions. 1. Physical and chemical aspects in crystalline model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6837-6842. <https://doi.org/10.1021/jf0492464>
250. Rosén, J., Nyman, A., & Hellenäs, K. E. (2007). Retention studies of acrylamide for the design of a robust liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for food analysis. *Journal of chromatography. A*, 1172(1), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.050>
251. Różyło, R., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Jakubczyk, A., Karaś, M., & Różyło, K. (2014). Wheat bread with pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) pulp as a functional food product. *Food Technology and Biotechnology*, 52(4), 430–438. <https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3587>
252. Rwubatse, B., Okoth, M. W., Andago, A. A., Ngala, S., Bitwayiki, C., Ndungutse, V., & Ndahetuye, J. B. (2023). Acrylamide formation during baking of whole wheat flour incorporated with spent coffee grounds and juices of lemon fruits and rosemary leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2023, 9952725. <https://doi.org/10.1155/2023/9952725>
253. Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., & Törnqvist, M. (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(24), 7012–7018. <https://doi.org/10.1021/jf034649+>
254. 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(15), 6154–6161. <https://doi.org/10.1021/jf7037482>
255. Sadek, D. A., Shaltot, O. E.-S., Abdelsalam, N. R., Sharf, M. M., & Amara, A. A.-E.-F. (2018). The development fortified pan bread by increasing its protein content with high levels of live yeast cells *saccharomyces cerevisiae*. *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*, 1(2). <https://doi.org/10.32474/cdvs.2018.01.000109>
256. Saeleaw, M., & Schleining, G. (2011). Composition, physicochemical and morphological characterization of pumpkin flour. *Agricultural and Food Science*, 20(4), 168-176. Retrieved January 7, 2025, from <https://kmweb.moa.gov.tw/files/document/391216/6d72ed7b3912ce1b2099e0e31f823>

257. Saewan, S. A., & George, S. S. (2020). Preparation of pumpkin pulp and peel flour and study their impact in the biscuit industry. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 10(6), 25–33. <https://iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/51939>
258. Santhanasabapathy, R., Vasudevan, S., Anupriya, K., Pabitha, R., & Sudhandiran, G. (2015). Farnesol quells oxidative stress, reactive gliosis, and inflammation during acrylamide-induced neurotoxicity: Behavioral and biochemical evidence. *Neuroscience*, 308, 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.067>
259. Sarion, C., Codină, G. G., & Dabija, A. (2021). Acrylamide in Bakery Products: A Review on Health Risks, Legal Regulations and Strategies to Reduce Its Formation. *International journal of environmental research and public health*, 18(8), 4332. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084332>
260. See, E. F., Nadiyah, W., & Aziah, N. (2007). Physico-chemical and sensory evaluation of breads supplemented with pumpkin flour. *ASEAN Food Journal*, 14(2), 123–130.
261. Shajan, A. E., Dash, K. K., Hamid, Bashir, O., & Shams, R. (2024). Comprehensive comparative insights on physico-chemical characteristics, bioactive components, and therapeutic potential of pumpkin fruit. *Future Foods*, 9, 100312. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100312>
262. Sharma, P., Kaur, G., Kehinde, B. A., Chhikara, N., Panghal, A., & Kaur, H. (2019). Pharmacological and biomedical uses of extracts of pumpkin and its relatives and applications in the food industry: A review. *International Journal of Vegetable Science*, 26(1), 79–95. <https://doi.org/10.1080/19315260.2019.1606130>
263. Shen, Y., Chen, G., & Li, Y. (2019). Effect of added sugars and amino acids on acrylamide formation in white pan bread. *Cereal Chemistry*, 96(3), 545–553. <https://doi.org/10.1002/cche.10154>
264. Shevchenko, A., Litvynchuk, S., & Drobot, V. (2023). Changes in structural units in dough and bread from wheat flour with the addition of pumpkin cellulose in combination with phospholipids. *EUREKA: Life Sciences*, 3, 34–43. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2023.002954>
265. Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1537–1553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
266. Slamet, A., Praseptiangga, D., Hartanto, R., & Samanhudi. (2019). Physicochemical and Sensory Properties of Pumpkin (*Cucurbita moschata* D) and Arrowroot (*Marantha arundinaceae* L) Starch-based Instant Porridge. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 9(2), 412–421. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.9.2.7909>
267. SNFA, S. N. (2013). Acrylamide in Swedish food- targeted sampling 2011 and 2012. *Swedish National Food Agency*. Retrieved from <https://www.livsmedelsverket.se/en/sok/?q=Acrylamide+in+Swedish+food-targeted+sampling+2011+and+2012>

268. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
269. Song, D., Xu, C., Holck, A. L., & Liu, R. (2021). Acrylamide inhibits autophagy, induces apoptosis, and alters cellular metabolic profiles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8, 111543. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111543>
270. Spencer, P. S., & Schaumburg, H. H. (1975). Nervous system degeneration produced by acrylamide monomer. *Environmental Health Perspectives*, 11, 129–133. <https://doi.org/10.1289/ehp.7511129>
271. Sridhar, K., & Charles, A. L. (2019). In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*, 275, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.040>
272. Stadler, R. H., & Studer, A. (2016). Acrylamide formation mechanisms. In V. Gökmen (Ed.), *Acrylamide in food: Analysis, content and potential health effects*, 1–17. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00001-2>
273. Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., & Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419, 449–450. <https://doi.org/10.1038/419449a>
274. Staichok, A.C., Mendonça, K.R., Santos, P.G., Garcia, L.G., & Damiani, C. (2016). Pumpkin Peel Flour (*Cucurbita máxima* L.) – Characterization and Technological Applicability. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(5), 327-333.
275. Stockmann, F., Weber, E. A., Mast, B., Schreiter, P., Merkt, N., Claupein, W., & Graeff-Hönniger, S. (2019). Acrylamide-Formation Potential of Cereals: What Role Does the Agronomic Management System Play? *Agronomy*, 9(10), 584. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100584>
276. Stryjecka, M., Krochmal-Marczak, B., Cebulak, T., & Kiełtyka-Dadasiewicz, A. (2023). Assessment of phenolic acid content and antioxidant properties of the pulp of five pumpkin species cultivated in southeastern Poland. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8621. <https://doi.org/10.3390/ijms24108621>
277. 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. <https://doi.org/10.1021/jf034999w>
278. Tabeshpour, J., Mehri, S., Abnous, K., & Hosseinzadeh, H. (2020). Role of oxidative stress, MAPK and apoptosis pathways in the protective effects of thymoquinone against acrylamide-induced central nervous system toxicity in rat. *Neurochemical Research*, 45, 254–267. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02908-z>
279. Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H., Gondé, P., van Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, r., Müller, D., Tallmadge, D., O'Brien, J., Thompson, S., Silvani, D., & Whitmore, T. (2004). A review of acrylamide: An industry perspective on research, analysis, formation, and control.

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5), 323–347.  
<https://doi.org/10.1080/10408690490478082>
280. Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF-kappaB, inflammation, immunity, and cancer: Coming of age. *Nature Reviews Immunology*, 18, 309–324.  
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>
281. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2000). Acrylamide: A cooking carcinogen? *Chemical Research in Toxicology*, 13(6), 517–522. <https://doi.org/10.1021/tx9901938>
282. 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(7), 4998–5006. <https://doi.org/10.1021/jf020302f>
283. Tedom, W. D., Fombang, E. N., Ngaha, W. D., & Ejoh, R. A. (2019). Optimal conditions for production of fermented flour from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) for infant foods. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 10(2) 125–136.  
<http://doi.org/10.9734/ejnfs/2019/v10i230105>
284. Tekkeli, S., Onal, C., & Önal, A. (2012). A review of current methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Analytical Methods*, 5, 29–39.  
<https://doi.org/10.1007/s12161-011-9277-2>
285. Torres, J.D., Dueik, V., Carré, D., & Bouchon, P. (2019). Effect of the addition of soluble dietary fiber and green tea polyphenols on acrylamide formation and in vitro starch digestibility in baked starchy matrices. *Molecules*, 24, 3674.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24203674>
286. Tuncel, N. B., Tunçel, N., & Şener, E. (2010). The effect of pea (*Pisum sativum* L.) -originated asparaginase on acrylamide formation in certain bread types. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(12), 2470–2476.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02370.x>
287. Unver-Saraydin, S., Saraydin, D., & Sahin Inan, Z. D. (2020). A study of digital image analysis on the acrylamide derivative monomers induced apoptosis in rat cerebrum. *Microscopy Research and Technique*, 83(4), 436–445.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.23431>
288. Urbanaviciute, S., Vandyte, E., Rozaityte, E., Mikoliunas, L., Verpecinskas, P., Venckute, R., & Bartkiene, E. (2025). Effect of spontaneous rye, wheat, and mixed rye-wheat sourdoughs on quality, aroma, and acrylamide content of homemade and small bakeries bread. *Journal of Food Science*, 90(6), e70315. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.70315>
289. Van Toan, N. & Thi Thanh Thuy, N. (2018). Production of high-quality flour and the made biscuits from pumpkin. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 3(5), 157–166.
290. Von Tungeln, L. S., Doerge, D. R., Gamboa da Costa, G., Matilde Marques, M., Witt, W. M., Koturbash, I., Pogribny, I. P., & Beland, F. A. (2012). Tumorigenicity of acrylamide and its metabolite glycidamide in the neonatal mouse

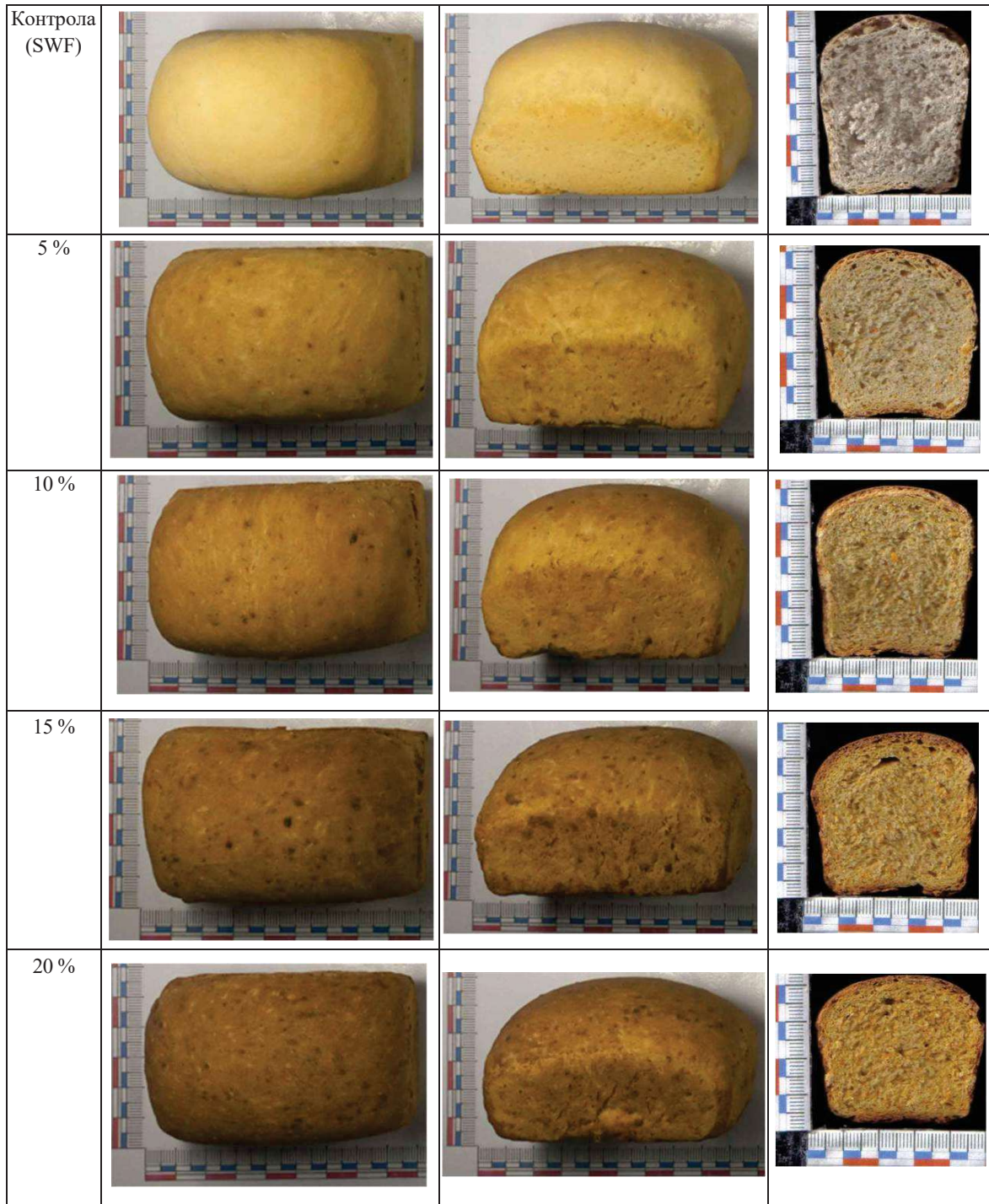
- bioassay. *International journal of cancer*, 131(9), 2008–2015. <https://doi.org/10.1002/ijc.27493>
291. Wächter, K., Longin, C. F. H., Winterhalter, P. R., Bertsche, U., Szabó, G., & Simm, A. (2023). The antioxidant potential of various wheat crusts correlates with age content independently of acrylamide. *Foods*, 12(24), 4399. <https://doi.org/10.3390/foods12244399>
292. Wagner, E. F., Nebreda, A. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9, 537–549. <https://doi.org/10.1038/nrc2694>
293. Wahyono, A., Dewi, A. C., Oktavia, S. N., Jamilah, S., & Kang, W. W. (2020). Antioxidant activity and total phenolic contents of bread enriched with pumpkin flour. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 411(1), Article 012049. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/411/1/012049>
294. Wakaizumi, M., Yamamoto, H., Fujimoto, N., & Ozeki, K. (2009). Acrylamide degradation by filamentous fungi used in food and beverage industries. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(5), 391–393. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.05.004>
295. Wang, L., Zhang, F., Wang, J., Wang, Q., Chen, X., Cheng, J., & Zhang, Y. (2022). Machine learning prediction of dual and dose-response effects of flavone carbon and oxygen glycosides on acrylamide formation. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1042590>
296. Wang, Q., Chen, X., Ren, Y., Chen, Q., Meng, Z., Cheng, J., Zheng, Y., Zeng, W., Zhao, Q., & Zhang, Y. (2017). Toxicokinetics and internal exposure of acrylamide: New insight into comprehensively profiling mercapturic acid metabolites as short-term biomarkers in rats and Chinese adolescents. *Archives of Toxicology*, 91(5), 2107–2118. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1962-6>
297. Waryat, W., Sunarmani, S., & Kurniasih, T. (2023). Chemical characteristics and sensory analysis of cake enriched with pumpkin flour to improve food security. *E3S Web of Conferences*, 444, 04005. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202344404005>
298. Weldeyohanis Gebremariam, F., Tadesse Melaku, E., Sundramurthy, V. P., & Woldemichael Woldemariam, H. (2024). Development of functional cookies form wheat-pumpkin seed based composite flour. *Heliyon*, 10(2), e24443. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24443>
299. Wheat Marketing Center. (2024). *2024 Harvest Soft White Wheat Quality Report: U.S. Pacific Northwest*. Wheat Marketing Center. <https://wmcinc.org/wp-content/uploads/2024/10/WMC-PNW-Soft-White-Wheat-Quality-Report-FINAL-10-2024.pdf>
300. Wongsagonsup, R., Kittisuban, P., Yaowalak, A., & Suphantharika, M. (2015). Physical and sensory qualities of composite wheat-pumpkin flour bread with addition of hydrocolloids. *International Food Research Journal*, 22(2), 745–752.

301. World Health Organization (WHO). (2005). Summary report of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). The ILSI Press International Life Sciences Institute. ISBN 9241209305
302. World Health Organization (WHO). (2005). Summary report of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). The ILSI Press International Life Sciences Institute. ISBN 9241209305
303. Wu, H., Che, X., Zheng, Q., Wu, A., Pan, K., Shao, A., & et al. (2014). Caspases: A molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, 10(9), 1072–1083. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9719>
304. Yan, D., Pan, X., Yao, J., Wang, D., Wu, X., Chen, X., Shi, N., & Yan, H. (2019). MAPKs and NF- $\kappa$ B-mediated acrylamide-induced neuropathy in rat striatum and human neuroblastoma cells SY5Y. *Journal of cellular biochemistry*, 120(3), 3898–3910. <https://doi.org/10.1002/jcb.27671>
305. Yang, X., Zhao, Y., & Lv, Y. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of an acidic polysaccharide extracted from cucurbita moschata duchesne ex poiret. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4684-4690. <https://doi.org/10.1021/jf070241r>
306. Yen, G.-C., & Chen, H.-Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27–32. <https://doi.org/10.1021/jf00049a007>
307. Yorimitsu, T., He, C., Wang, K., & Klionsky, D. J. (2009). Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. *Autophagy*, 5(5), 616–624. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8091>
308. Yousf, N., Nazir, F., Salim, R., Ahsan, H., & Sirwal, A. (2017). Water solubility index and water absorption index of extruded product from rice and carrot blend. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 2165- 2168.
309. Yu, G., Zhao, J., Wei, Y., Huang, L., Li, F., Zhang, Y., & Li, Q. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activity of pumpkin polysaccharide (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) modified by subcritical water. *Foods*, 10(1), 197. <https://doi.org/10.3390/foods10010197>
310. Zahra, N., Hina, S., Masood, S., Kalim, I., Saeed, M. K., Ahmad, I., & Arshad, M. (2020). Exploration of locally grown yellow and green pumpkin as a potential source of  $\beta$ -carotene and vitamin A. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, Series B: Biological Sciences*, 63(3), 238-241. <https://doi.org/10.52763/PJSIR.BIOL.SCI.63.3.2020.238.241>
311. Zhang, G., Li, Z., & Fu, M. (2024). Comparison of quality and oxidative stability of pumpkin seed (*Cucurbita maxima*) oil between conventional and enzymatic extraction methods. *Sustainable Food Technology*, 2(4), 1033-1040. <https://doi.org/10.1039/D4FB00080C>
312. Zhang, K.-X., Li, C.-X., Guo, X.-N., Peng, W., & Zhao, H.-M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ.

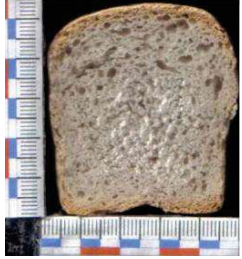



- Food Chemistry*, 126(3), 1122–1126. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2689-1>
313. Zhang, L., Xu, Y., Li, Y., Bao, T., Gowd, V., & Chen, W. (2017). Protective property of mulberry digest against oxidative stress: A potential approach to ameliorate dietary acrylamide-induced cytotoxicity. *Food Chemistry*, 230, 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.045>
314. Zhang, Y., Ren, Y., & Zhang, Y. (2009). New research developments on acrylamide: Analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation recipes. *Chemical Reviews*, 109(9), 4375–4397. <https://doi.org/10.1021/cr800318s>
315. Zhao, H. (2019). Quantification of acrylamide in a variety of food matrices by LC/MS/MS triple quadrupole (Agilent Technologies Application Note No. 5994-0820EN). Santa Clara, CA: Agilent Technologies.
316. Zhao, X., Yang, Z., Gai, G., & Yang, Y. (2009). Effect of superfine grinding on properties of ginger powder. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.08.024>
317. Zhao, M., Zhang, B., & Deng, L. (2022). The Mechanism of Acrylamide-Induced Neurotoxicity: Current Status and Future Perspectives. *Frontiers in nutrition*, 9, 859189. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.859189>
318. Zhou, X., Duan, M., Gao, S., Wang, T., Wang, Y., Wang, X., & Zhou, Y. (2022). A strategy for reducing acrylamide content in wheat bread by combining acidification rate and prerequisite substance content of *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Research in Food Science*, 5, 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.06.005>
319. Zimmerman, S. (2013). Phytate effect and nutrient levels in whole grain flours. *CFW Plexus: Whole Grains Summit 2012 Proceedings*, 61-62. <https://doi.org/10.1094/CPLEX-2013-1001-28B>
320. Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., & Rizzi, G. P. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4782–4787. <https://doi.org/10.1021/jf034180i>
321. Агенција за храна и ветеринарство. (2019). Правилник за општите барања за безбедност на храната во однос на нивоата на референтните вредности за намалување на присуството на акриламид во храната. Службен весник на РСМ бр.39.

## ПРИЛОЗИ



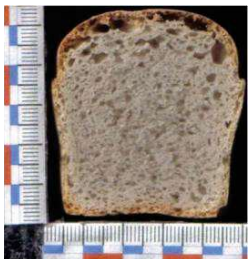


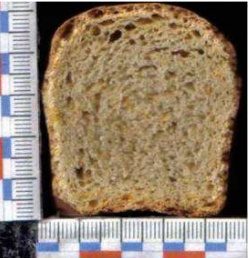


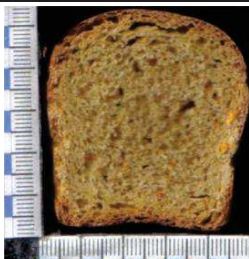


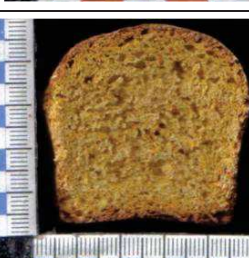



Прилог 1: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по печење (0 денови): едночасовна ферментација (1Н)



Прилог 2: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по складирање (7 дена): едночасовна ферментација (1Н)

Контрола (SWF)			
5 %			
10 %			
15 %			
20 %			

Прилог 3: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по печење  
(0 денови): двоочасовна ферментација (2H)

Контрола (SWF)			
5 %			
10 %			
15 %			
20 %			

Прилог 4: Надворешен изглед и пресек на леб збогатен со брашно од тиква – по складирање (7 дена): двочасовна ферментација (2H)

