Prijenos deoksinivalenola i njegovih derivata iz ječma u slad tijekom procesa slađenja

Marić, Tanja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:157534

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek







SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Tanja Marić

PRIJENOS DEOKSINIVALENOLA I NJEGOVIH DERIVATA IZ JEČMA U SLAD TIJEKOM PROCESA SLAĐENJA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Jospa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za bioprocesno inženjerstvo
Franja Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija slada i piva
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno – tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. Održanoj 13. rujna 2019.
Mentor: doc.dr.sc. *Kristina Mastanjević*

Prijenos deoksinivalenola i njegovih derivata iz ječma u slad tijekom procesa slađenja

Tanja Marić, 0113130345

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti utjecaj izmjene vode tijekom močenja i različitih razina kontaminacije plijesni *Fusarium graminearum* na koncentracije deoksinivalenola I njegovih derivata u ječmenom sladu. Uzorci ječma su podvrgnuti dvama postupcima mikroslađenja - izmjeni vode tijekom slađenja, a drugi bez izmjene vode tijekom slađenja. Slad je bio kontaminiran različitim stupnjevima kontaminacije *F. graminearumom* (0%, 10% i 20%). Rezultati pokazuju da su sladovi s većom razinom kontaminacije *F. graminearum* sadržavali i veće koncentracije ovih mikotoksina. Veće koncentracije sekundarnih metabolita plijesni određene su u uzorcima izloženim svježe izmijenjenoj vodi, osobito deoksinivalenola. Promjena vode tijekom močenja rezultirala je višim koncetracijama određivanih mikotoksina u konačnom proizvodu-sladu.

Ključne riječi: mikotoksini, ječam, slad, deoksinivalenol, *Fusarium graminearum*

Rad sadrži: 36 stranica
5 slika
4 tablica
0 priloga
32 literaturne reference
Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i dplomskog ispita:

1.	prof. dr. sc. Vinko Krstanović	Predsjednik
2.	doc. dr. sc. Kristina Mastanjević	član – mentor
3.	prof. dr. sc. Daliborka Koceva-Komlenić	član
4.	prof. dr. sc. Jasmina Lukinac	zamjena člana

Datum obrane: 14. rujna 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno – tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Bioprocess Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Malt and beer technology
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on September 13, 2019.
Supervisor: *Kristina Mastanjević*, PhD, assist. prof.

Transfer of deoxynivalenol and its derivates from barley to malt during malting process

Tanja Marić, 0113130345

Summary: The aim of this study was to assess the impact of steeping water change and *Fusarium graminearum* contamination level on different multi-toxin types and concentrations in barley malt. Malt samples were subjected to two micromalting regimes—steeping water change and the other with no steeping water change. Malt was contaminated with different *F. graminearum* contamination levels (0%, 10%, and 20%). The results indicate that malt with higher *F. graminearum* contamination levels ensured higher concentrations of detected toxins. Higher deoxynivalenol concentrations were determined in samples exposed to freshly-changed steeping water, whose values were higher than in samples with no water change. Water change during malting resulted in higher levels of mycotoxins in the final product-malt.

Key words: mycotoxins, barley, malt, deoxynivalenol, *Fusarium graminearum*

Thesis contains: 36 pages
5 figures
4 tables
0 supplements
32 references
Original in: Croatia

Defense committee:

1. Vinko Krstanović, PhD, prof. — chair person
2. Kristina Mastanjević, PhD, assist. prof. — supervisor – Member
3. Daliborka Koceva-Komlenić, PhD,assoc.prof. — member
4. Jasmina Lukinac, PhD, assoc.prof. — stand-in

Defense date: September 14th 2020

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek

Ponajprije zahvaljujem suprugu i sinovima koji su mi bili podrška tijekom svih godina studiranja te koji su sve, više i manje uspješne studentske trenutke, proživljavali sa mnom "iz prve ruke". Također, zahvaljujem majci na potpori i vjerovanju u moj uspjeh. Zahvalna sam i onima koji nisu vjerovali u mene jer su mi bili velika motivacija. Naposlijetku, zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Kristini Mastanjević na uloženom trudu, velikoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
   - 2.1 JEČAM 4
   - 2.2 JEČMENI SLAD 5
   - 2.3 MIKROFLORA JEČMA I SLADA 6
     - 2.3.1 MIKOTOKSINI 8
     - 2.3.2 SLAĐENJE JEČMA KONTAMINIRANOG DON-OM I DERIVATIMA TE NJIHOV UTJECAJ NA KAKVOĆU SLADA 12
     - 2.3.3 DEOKSINIVALENOL 14
3. EKSPERIMENTALNI DIO 16
   - 3.1 ZADATAK 17
   - 3.2 MATERIJAL I METODE 17
     - 3.2.1 ODREĐIVANJE POČETNOG STUPNJA KONTAMINACIJE JEČMA S PLIJESNI *Fusarium graminearum* 18
     - 3.2.2 MIKROSLAĐENJE 19
     - 3.2.3 ODREĐIVANJE STUPNJA KONTAMINACIJE ZELENOG I SUHOG SLADA JEČMA S PLIJESNI *Fusarium graminearum* 20
     - 3.2.4 ANALIZA DEOKSINIVALENOLA I NJEGOVIH DERIVATA U JEČMU I SLADU 20
     - 3.2.5 Statistička analiza 21
4. REZULTATI I RASPRAVA 22
5. ZAKLJUČCI 26
6. LITERATURA 28

Popis oznaka, kratica i simbola

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija – tandem masena spektrometrija (eng. Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry)

SPE – ekstrakcija na krutoj fazi (eng. solid phase extraction)

DON - deoksinivalenol

DON-3-GLC - deoksinivalenol-3-glukozid

3-AcDON – 3-acetil-deoksinivalenol

1. UVOD

Ječam, kao dominantna pivovarska sirovina, podložan je kontaminaciji raznim kontaminantima, posebice plijesnima iz roda *Fusaruim* i njihovim sekundarnim metabolitima. Kako se svi oni koriste kao sirovine u proizvodnji hrane i pića, poželjno je izbjeći potencijalne izvore zdravstvenih i tehnoloških problema, što je dovelo do pooštravanja nadzora i regulative.

Plijesni su prirodno prisutne na žitaricama, a ječam kontaminiraju već prilikom cvjetanja. Međutim, zrno ječma je otpornije zagađenju od ostalih žitarica jer sadrži zaštitni sloj tzv. pljevicu zbog čega plijesni teže prodiru u zrno.

Mikotoksini kao metaboliti plijesni mogu uvelike narušiti zdravstvenu ispravnost slada, a naposlijetku i piva. Jedan od metabolita plijesni je deoksinvialenol (DON) koji, osim što narušava kvalitetu slađenja ječma, može uzrokovati velike zdravstvene poteškoće. Deoksinivalenol spada u skupinu trihotecena koji su dobro topljivi u vodi pa postoji mogućnost prijenosa DON-a preko vode za močenje na zdrava zrna ječma, a tijekom proizvodnje piva i u pivo. Sukladno tome, neka su istraživanja pokazala da se većina DON-a sintetizira upravo nakon močenja zrna.

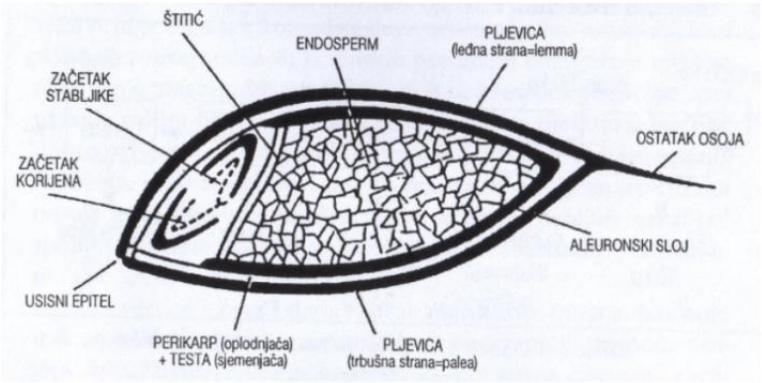
Cilj istraživanja bio je ustanoviti utjecaj stupnja kontaminacije ječma plijesni *Fusarium graminearum* na koncentracije deoksinivalenola i njegovih derivata deoksinivalenol-3-glukozid i 3-acetildeoksinivalenol (DON-3-GLC i 3-ADON) te u kojoj je mjeri kontaminacija prešla u zrno slada tijekom procesa slađenja. Provedena su mikrobiološka i toksikološka istraživanja kako bi se utvrdile i povezale koncentracije navedenih mikotoksina sa početnim stupnjem zaraženosti ječma sa plijesni *Fusarium graminearum*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 JEČAM

Ječam je žitarica koja se najčešće koristi u pivarstvu. To je jedna od najstarijih ratarskih kultura koja se u prošlosti koristila ponajprije za ljudsku prehranu tako što se od te žitarice proizvodio kruh, pravile su se kaše ili razna pića. Za razliku od tada, danas ima namjenu u industriji slada i piva te za ishranu stoke (Martinčić i Kolak, 1993.).

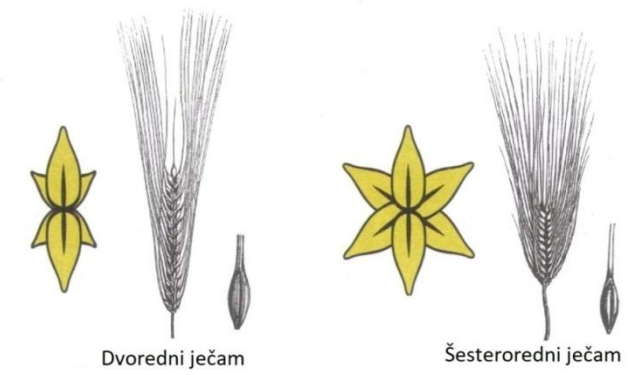
Zrno ječma se preferira upravo zbog svog visokog škrob – protein omjera te većeg ekonomskog prinosa, jednostavne obrade tijekom proizvodnje piva te karakteristične arome slada. Kako bi se proces proizvodnje slada mogao bolje shvatiti, najbolje rješenje je prikazati zrno ječma i njegove glavne dijelove: klicu, endosperm, auleuronski sloj i ljusku (Macleod i Evans, 2016.)



Slika 1 Uzdužni presjek ječmenog zrna (Marić, 2000.)

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) pripada porodici trava i ima mnoge anatomske sličnosti s ostalim strnim žitaricama, a postoje različiti tipovi ječma. Kod biljaka strnih žitarica, zrno se razvije u šiljak koji se sastoji od više manjih povezanih čvorom na glavnu stabljiku. Šiljak se sastoji od cvjetova iz kojih se razvija zrno, odnosno jestiva žitarica. Kod različitih tipova ječma različit je i raspored cvjetova (klasića). U slučaju šesterorednog ječma, tri su cvjetnice plodne i iz njih će se razviti zrno, dok će se kod četverorednog ječma razviti samo srednja. Postoji ječam

otvorenog i ječam zatvorenog cvata. Ječam zatvorenog cvata se samooprašuje (Janssen i sur.,2018.). Po morfologiji razlikujemo ozimi i jari tip dvorednog i višerednog ječma. Za potrebe industrije slada i piva koristi se dvoredni ječam ozimog i jarog tipa (Martinčić i Kolak, 1993.).



Slika 2 Klasovi dvorednog i šesterorednog ječma (Web 1)

Za pivarsku industriju su pogodnije dvoredne sorte, dok su višeredne namijenjene stočarskoj proizvodnji. Većom apsorpcijom dušika raste i postotak bjelančevina u zrnu, koji kod pivarskog ječma ne smije biti veći od 10% (Hrgović, 2006.).

2.2 JEČMENI SLAD

Osnovni sastojak ječma je škrob i, s obzirom da je on netopljiv u vodi, ječam se ne koristi izravno u proizvodnji piva nego se podvrgava prethodnoj preradi odnosno prevođenju ječma u slad (slađenju).

Cilj slađenja je izmijeniti fizikalnu strukturu zrna ječma te omogućiti aktivaciju ili sintezu enzima kako bi se krajnji produkt, slad, mogao lakše koristiti u kasnijim fazama proizvodnje. Tako je maksimizirana sinteza hidrolitičkih enzima, što dovodi do razgradnje stanične stijenke i denaturacije proteina uz minimalnu razgradnju škroba (Macleod, Evans, 2016.). Ječmeni slad nastaje prinudnim proklijavanjem sjemena ječma koje se odvija pri kontroliranim uvjetima, odnosno regulacijom optimalne vlage i temperature. Na taj način slad postaje izvor enzima amilaza. Ti enzimi u daljnjem procesu razgrađuju škrob i prevode ga (i druge satojke zrna) u

vodotopljivi oblik odnosno u jednostavne šećere koje će kvasci moći metabolizirati tijekom procesa fermentacije piva (Wolf-Hall, 2007.; Johanides, 1984.).

Glavni ciljevi slađenja su (Johanides, 1984.):

-dobiti što više aktivnih enzima,

-sačuvati endosperm od trošenja za disanje, rast klice i korjenčića,

-dobiti slad one kvalitete koja će odgovarati tipu piva koje će se od tog slada proizvoditi.

Prijem, močenje i klijanje zna ječma su faze postupka slađenja. Kod faze prijema, potrebno je provesti sortiranje kako bi se izdvojila zrna prikladna za slađenje. Slad se proizvodi iz krupnog zrna čija je debljina ujednačena. Kako bi zrno uspješno proklijalo, mora sadržavati 42 - 48% vode. To se postiže namakanjem. S obzirom da se povećanjem sadržaja vode u zrnu povećava i potreba za kisikom, močenje se odvija u posebno konstruiranim močionicima. Tijekom faze klijanja, zrnu je potrebna hrana odnosno energija kako bi se odvijali fiziološki i biokemijski procesi kao što su oni kod klijanja u zemlji. Da bi izvor hrane i energije (škrob i bjelančevine) poslužio za biosintezu klice i korjenčića, potrebno ga je razgraditi, a potom i hidrolizirati do šećera (glukoza, maltoza itd.). Isklijalo zrno je poluproizvod, tzv. zeleni slad i slatkastog je okusa. Zeleni slad je lako kvarljiv pa se za pivarske svrhe podvrgava sušenju čime se dobiva gotovi trajni proizvod, isklijali, osušeni i od korjenčića oslobođeni slad – pivarski slad. Pivarski slad se koristi u proizvodnji tek nakon što “odleži” četiri tjedna kako bi se rehidrirao vlagom iz zraka, a enzimi reaktivirali nakon sušenja (Johanides, 1984.).

2.3 MIKROFLORA JEČMA I SLADA

Mikroflora ječma proizvodnjom korisnih metabolita utječe npr. na sintezu hormona koji stimuliraju klijanje zrna i proizvodnju korisnih enzima (Habschied i sur., 2011.). Na mikrofloru zrna ječma, a kasnije i slada, uvelike utječe mikroflora polja na kojem je uzgajan ječam.

Mikroflora polja obuhvaća mikrofloru tla, vegetacije i zraka. Sve su to mikroorganizmi koji su pronađeni na ječmu prije same žetve. Čine ih saprofiti i paraziti. Potonji mogu znatno utjecati na gubitke uzrokujući nedostatke zrna i proizvodeći mikotoksine. Gram-negativne

bakterije su dominantne u mikrobnoj populaciji polja, a po brojnosti ih slijede kvasci i plijesni (Noots i sur.,1999.).

Iako je fiziologija ječma presudna za kvalitetu slada, velik utjecaj ima i mikrobna populacija zrna ječma. Istraživanja su pokazala da mikrobni procesi uvelike utječu na svojstva slada i nikako ne smiju biti zanemareni tijekom cijelog procesa proizvodnje. Značajno je pratiti promjene mikroflore već tijekom rasta ječma i njegovog skladištenja jer se na taj način može bolje shvatiti i razumjeti mikrobna metabolička aktivnost tijekom proizvodnje slada (Noots i sur.,1999.)

Sitne žitarice poput ječma su uvelike zaražene plijesnima roda *Fusarium*. Između ostalih mikotoksina zaraženih žitarica, deoksinivalenol je najčešće detektiran i sintetiziran u najvećoj količini te je stoga određen kao prevladavajući mikotoksin (Wolf-Hall, 2007.). Neke od vrsta roda *Fusarium* su: *F. acuminatum*, *F. avanceum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. semitectum* i dr. Razmnožavaju se aseksualno konidiosporama (anamorfni oblik) i seksualno (telomorfni oblik – *Gibberella*) (Mastanjević i sur., 2018.).



Slika 3 Zrna ječma kontaminiranih plijesnima roda *Fusarium* (Web 2)

Mikrobna populacija ječma tijekom skladištenja ovisi o početno prisutnoj populaciji, vremenu skladištenja te okolišnim uvjetima u skladištu kao što su temperatura žitne mase, vlažnost, prozračivanje, lomljena zrna, sjemenke korova, insekti i sl. Skladištenjem pri optimalnim uvjetima, bakterije, kvasci i plijesni nisu aktivni i smanjuje im se brojnost. Kod ispravno skladištenog ječma, najzastupljenija je *Alternaria,* a razlog tomu je što spore *Fusariuma* ne preživljavaju toliko dugo kao *Alternaria* čije spore mogu preživjeti nekoliko godina (Noots i sur., 1999.).

Tablica 1 Najčešći rodovi plijesni izolirani sa 100 zrna ječma nakon žetve (Haikara i sur., 1977.)

Rod	**Stupanj kontaminacije zrna plijesnima (%)**	
	Raspon	***Prosječna vrijednost***
Alternaria	36-89	61
Cladosporium	7-79	38
Fusarium	7-39	22
Cephalosporium	0-26	9
Aspergillus	0-34	3
Epicoccum	0-12	2
Penicillium	0-5	1

Tijekom faze močenja, aktivnost prisutnih mikroorganizama ovisi o kontaminiranosti zrna, vlažnosti supstrata i procesnim uvjetima. Također, uvjeti u sladari tijekom slađenja određuju daljni razvoj mikroorganizama na što velik utjecaj imaju temperatura, aeracija i vlažnost (Mastanjević i sur., 2018.).

Sušenjem slada se smanjuje broj mikroorganizama, čak do 98%. Termostabilniji mikroorganizmi nastavljaju svoj rast i na suhom sladu, ali je njihov sastav drugačiji nego u početnom stanju na ječmu. Ukupan broj prisutnih mikroorganizama nakon sušenja utvrđuje se prema sadržaju vlažnosti zrna. Tako se pri vlažnosti 4 – 6% ne događaju osobite mikrobiološke promjene, dok pri vlažnosti od 14% napreduje rast plijesni *Aspergillus*, a *Penicillium* iznad 20% (Habschied i sur.,2011.).

2.3.1 Mikotoksini

Mikotoksini su prirodni spojevi nastali kao sekundarni metaboliti nitastih gljiva.

Najbolji način kontrole problema zaraženog ječma je ne upotrebljavati takav ječam za slađenje. Međutim, to nije uvijek izvedivo, pogotvo u zemljama u razvoju gdje su zalihe hrane ograničene. Takav bi poduhvat rezultirao ekonomskom štetom za proizvođače ječma, a zatim i za prerađivače jer bi ječam morali dodatno testirati (Wolf-Hall, 2007.).

Najveći agroekonomski i zdravstveni utjecaj imaju mikotoksini poput aflatoksina (AF), ohratoksina A (OTA), patulina (PAT), trihotecena kao što su deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV), HT-2 toksin, T-2 toksin, zearalenona (ZEN), fumonizina (FUM), termogenih toksina i ergot alkaloida koji su uglavnom produkti *Aspergillusa*, *Penicilliuma* i *Fusariuma* (Pascari i sur., 2018.).

Plijesnima s polja pripadaju vrste roda *Fusarium* te se smatraju najvažnijim proizvođačima mikotoksina. Oni to čine kad se nađu u nepovoljnim uvjetima pa sintetiziraju u najvećoj mjeri trihotecene tipa A i tipa B. Trihoteceni tipa A su T-2 toksin, HT-2 toksin te diacetoksiscirpenol (DAS), a proizvode ih vrste *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichoides* i *F. poae*. Trihoteceni tipa B su nivalenol (NIV), fusarenon-X i deoksinivalenol (DON), a proizvode ih vrste *F. culmorum*, *F. graminearum* te *F. cerealis* (Habschied i sur., 2011.).

Provedena su istraživanja za korištenje različitih tehnika uz pomoć kojih bi se mogla koristiti i zaražena zrna ječma. Te se tehnike mogu podijeliti u tri kategorije: uklanjanje zaraženih zrna, postupci dekontaminacije ili uklanjanja mikotoksina prisutnih u ječmu i postupci sprječavanja ili inhibicije rasta plijesni (Wolf-Hall, 2007.). Multi-mikotoksinske analize su iznimno napredovale i sve su preciznije u određivanju mikotoksina i kod vrlo malih koncentracija. Također su koristan alat za procjenu sigurnosti konačnih proizvoda te u procjeni izloženosti i to analizom biomarkera mikotoksina (Mastanjević i sur., 2018.).

Tijekom rukovanja s kontaminiranim žitaricama neophodno je koristiti prikladnu opremu kako se ne bi dogodila kontaminacija okolnih, zdravih žitarica, a naposlijetku i kontaminacija okolnih polja. Ukoliko žitarica sadrži DON i ostale toksine ili spore plijesni, treba ju izolirati od zdravih i spriječiti raspršivanje spora. Kontminirana se zrna tako mogu upotrijebiti u proizvodnji bioplina, spaliti ili kompostirati. Kao najprihvatljivije metode dekontaminacije mikotoksinima, pokazale su se (Mastanjević i sur., 2018.):

-čišćenje i miješanje s nekontaminiranim zrnom (hrana za životinje),

-odlaganje u zemlju, mulj i grm,

-sortiranje gravitacijom (zrna kontaminirana *Fusariumom* su lakša),

-spaljivanje (najčešća metoda),

-kompostiranje,

-anaerobna probava,

-gama zračenje.

Iako se najčešće koristi metoda spaljivanja, dokazano je kako i pepeo zaostao nakon spaljivanja može sadržavati DON i spore plijesni (Mastanjević i sur., 2018.).

Mikotoksini su kemijski stabilni pa lako mogu ostati prisutni u krajnjim proizvodima kao što su brašno i pivo i nakon mnogih koraka obrade. Tako se, uostalom, kontaminacija može primijetiti u pivu proizvedenom od ječma kontaminiranog mikotoksinima. Između ostalog, primijećena je povezanost između udjela alkohola i koncentracije mikotoksina pa je tako u bezalkoholnim pivima najniža koncentracija (Janssen i sur., 2018.).

Faktori koji utječu na proizvodnju mikotoksina

Spore plijesni *Fusarium* su jako otporne pa stoga mogu preživjeti u tlu, usjevima ili ostacima sjemena. Do vrha biljke žitarice mogu doći nošene vjetrom ili vodom putem kiše ili navodnjavanjem te kontaminiraju biljku kada nastanu idealni uvjeti i spore proklijaju. Plijesni prodiru u peteljku nakon čega se kontaminacija širi izravno, direktnim kontaktom među klasićima (poglavito u šesterorednom ječmu). Kontaminirati se ponekad može samo određeno područje biljke tako da se ne širi na ostale dijelove (Janssen i sur., 2018.).

Vremenski uvjeti su najutjecajniji faktor sinteze mikotoksina u ječmu jer određuju klijavost i rast plijesni. Jedan od faktora je i odabir kultivara ječma otpornijeg na kontaminaciju *Fusariumom* i nakupljanje mikotoksina. Datum sjetve, oprašivanje, položaj usjeva, korištenje fungicida, obrada tla, rotacija usjeva, žetva i prerada ječma također predstavljaju faktore za smanjenje stupnja kontaminacije *Fusarium* plijesnima i sinteze mikotoksina (Janssen i sur., 2018.).

Deoksinivalenol u ječmu

Izloženost ljudi i životinja deoksinivalenolu putem unosa kontaminirane hrane može izazvati akutne i kronične posljedice kao što su imunosupresija, neurotoksičnost, embriotoksičnost i teratogenost. Također, u pivu proizvedenom od kontaminiranog ječma može se javiti pretjerano pjenjenje i prelijevanje prilikom otvaranja boce, što može znatno narušiti kvalitetu piva,a time i ugled pivovare (Piacentini i sur., 2014.).

Za iniciranje proizvodnje DON-a zaslužan je tri5 gen *Fusariuma*. Tijekom slađenja zrna, DNA tri5 gena se drastično povećava (Yu i sur., 2019.). Prema Yu i sur. (2019.), provedena su istraživanja čiji su rezultati pokazali da je razvoj DON-a u sladu pšenice i raži uočljiviji nego u ječmu, što je pripisano razlici u strukturi tih zrna.

Predmet mnogih istraživanja su derivati DON-a, tzv. “maskirani” mikotoksini, npr. 3- i 15-acetil-DON, DON-3-di-glukozid, DON-3-mono-glukozid koji nastaju uslijed reakcija mikotoksina sa spojevima koji se prirodno nalaze u žitaricama. Kao produkti tih reakcija su manje toksični derivati koji dovode do prividnog smanjenja početne koncentracije mikotoksina (Galaverna i sur., 2009.). Utvrđeno je da tako skriveni DON čini i do 12% ukupnog sadržaja DON-a (Berthiller i sur., 2005.).

DON-3-GLC je najčešći modificirani oblik deoksinivalenola koji nastaje detoksikacijom biljaka koju katalizira glukoziltransferaza, a može nastati i tijekom procesa klijanja tijekom aktivacije amilaza, iako je to rijedak slučaj jer je manja vjerojatnost prisutnosti DON-a u endospermu (Pascari i sur., 2019.).

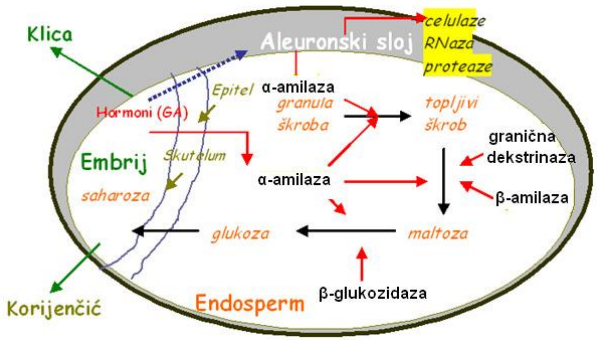
Deoksinivalenol je topiv u vodi i njegova se koncentracija uvelike smanjuje nakon procesa močenja ječma, iako sami uvjeti procesa slađenja odgovaraju mikrobiološkom rastu i rastu plijesni što za rezultat ima dodatnu sintezu DON-a (Schwartz i sur., 1996.).

Konačna koncentracija deoksinivalenola u sladu je približno jednaka, ako ne i manja od koncentracije detektirane u ječmu. Do smanjenja je došlo najvjerojatnije zbog ispiranja ili uklanjanja čestica prljavštine ili plijesni, dok su razine DON-a ponovno porasle tijekom

naknadnog klijanja i rane faze sušenja. Oko 80% koncentracije DON-a u sladu je nastalo nakon močenja (Noots i sur.,1999.).

2.3.2 Slađenje ječma kontaminiranog don-om i derivatima te njihov utjecaj na kakvoću slada

Plijesni roda *Fusarium* predstavljaju najvažniji problem, odnosno najvažniji patogen u industriji proizvodnje slada jer se tijekom samog procesa razmnožavaju i integriraju u zrno žitarice. Standardni postupak slađenja provodi se u fazama s različitim sadržajem vlage i temperaturama u rasponu između 10 °C i 80 °C. Navedeni uvjeti doprinose razmnožavanju plijesni tijekom cijelog procesa slađenja. Močenjem se, zbog direktnog kontakta zrna s vodom, vlažnost zrna povećava na 45% što uz niže temperature rezultira klijanjem spora plijesni i micelarnim rastom. Sušenjem se stvaraju nepovoljni uvjeti za plijesni što uzrokuje odumiranje micelija (Mastanjević i sur., 2018.). Faza močenja je ključna faza u kojoj počinje razmnožavanje mikroorganizama zrna, aktiviraju se spore omogućavajući novi rast mikroorganizama koji se sad može širiti od jezgre do jezgre. Broj bakterija i kvasaca dostiže maksimum u fazi klijanja. Utvrđeno je i da je stopa rasta plijesni bila polagana tijekom drugog dana klijanja, dok je znatno porasla tijekom trećeg dana. Temperatura i vlaga utječu na mikrobiološku aktivnost. Ukoliko zrno sadrži velik udio vlage, umanjit će se učinkovitost sušenja zrna, što će rezultirati pojačanim umnažanjem mikroorganizama i produkcijom laktata (Noots i sur.,1999.). Uočeno je da se dogodilo značajno povećanje koncentracije DON-3-GLC nakon faze klijanja. Povećanje se dogodilo i tijekom ukomljavanja slada , tako da je u sladovini koncentracija konjugata deset puta veća nego u meljavi slada (Habschied i sur., 2011.).



Slika 4 Fiziološki i kemijski procesi u zrnu tijekom klijanja (Bewley, 1985.)

Mnoga su istraživanja potvrdila da se slađenjem ječma kontaminiranog *Fusarium* plijesnima povećava razina DON-a. Iako postoji mišljenje da je povećanje koncentracije DON-a u vezi s porastom rasta plijesni *Fusarium*, do njega zapravo dolazi zbog enzimolize zrnate matrice koja uzrokuje oslobađanje mikotoksina. Najveće količine DON-a sintetizirane su posljednjeg dana klijanja i početne faze sušenja tijekom procesa slađenja (Vegi i sur., 2011.).

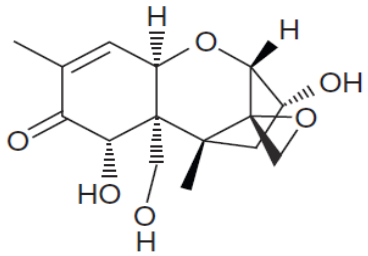
Kontaminacija ječmenog zrna DON-om uvelike utječe na kvalitetu slada. Istraživanja su pokazala da su koncentracije DON-a u ječmu i sladu značajno povezane s količinom pjene koja nastaje pri otvaranju boce piva (Schwarz i sur., 1996.). Prema Pascari i sur. (2019.), tijekom slađenja prirodno kontaminiranog ječma, kontaminacija DON-om se značajno smanjuje. Čak do 75% prisutnog DON-a se ispire vodom tijekom procesa slađenja. Isto tako je zabilježeno da se na kraju procesa slađenja povećava razina DON-3-GLC. Međutim, u slučaju laboratorijski kontaminiranog ječma, zabilježeno je nakon procesa slađenja povećanje razine i DON-a i DON-3-GLC (Noots i sur.,1999.). Utjecaj ukupne mikrobne populacije i/ili izoliranog mikrobnog sastava na kvalitetu slada, može se istraživati selektiranim suzbijanjem, umjetnom kontaminacijom tijekom eksperimentalnog slađenja ili proučavanjem aktivnosti koje su sprecifične za određeni izolat mikrobne populacije. Većina se istraživanja provodi u laboratorijskom mjerilu pa se malo zna o aktivnostima mikrobne populacije tijekom komercijalnog slađenja (Noots i sur.,1999.).

Derivati DON-a, 3-AcDON i 15-AcDON, također se mogu razviti u sladu i biti preneseni sa zrna u pivo, ali njihov je sadržaj znatno niži od DON-a. Do reprodukcije trihotecena, a time i

DON-a, dolazi u fazi klijanja. Dio tih trihotecena će biti potencijalno preneseni u pivo zahvaljujući njihovoj topivosti u vodi i termostabilnosti (Yu i sur.,2019.).

2.3.3 Deoksinivalenol

Deoksinivalenol (DON) je kemikalija koja pripada u skupinu trihotecena koju karakterizira epoksidni prsten na C-12,13 položaju. DON je najčešće prisutan trihotecen u namirnicama (Pitt, 2014.).



Slika 5 Struktura deoksinivalenola (Pitt, 2014.)

Djelovanje DON-a se veže uz inhibiciju sinteze proteina i to tako što remeti normalnu funkciju ribosoma, a sukladno tome, i imunološku funkciju. Simptomi bolesti kod životinja (npr. svinja) su odbijanje hrane, gubitak tjelesne mase, poremećaj srčane i imunološke funkcije i gastroenteritis, dok se kod ljudi bolest očituje kao akutni gastroentritis s mučninom, povraćanjem, povišenom tjelesnom temperaturom, boli u trbuhu i dijarejom. Prema Pitt (2014.), vrijeme inkubacije je 30 minuta, nakon čega se javljaju simptomi koje je teško razlikovati od obolijevanja uzrokovanog bakterijom (npr. *Bacillus cereus*). Istraživanja koje je provela JEFCA dovode do rezultata da dnevna izloženost DON-u u dozi od 50 µg po kg tjelesne mase uglavnom neće dovesti do razvoja simptoma (Pitt, 2014.).

DON se obično analizira plinskom kromatografijom i masenom spektroskopijom. Problem može predstavljati modificirani DON (3-glukozid) jer se on ne testira uobičajenim metodama (Pitt, 2014.). Ingestirani modificirani oblik DON-3-GLC se u probavnom traktu se konvertira u DON oblik i kao takav oslobađa u tijelo jer se pod utjecajem hidrolaza kida glukozil

veza (Pascari i sur., 2019.). DON se detektira prvenstveno kod kukuruza i strnih žitarica zaraženih *F. graminearum*-om i to najviše u hladnijim područjima s puno vlage, kao što su Kanada, Europa i Argentina. Prema mnogim istraživanjima, infekcija plijesnima je veća ako su nasadi zasađeni na poljima gdje je prethodno bio zasađen kukuruz, posebice ako su ostaci tih usjeva bili ostavljeni na poljima (Pitt, 2014.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 ZADATAK

Cilj istraživanja bio je ustanoviti utjecaj početnog stupnja kontaminacije ječma s plijesni *F. graminearum* na udjele DON-a i njegovih derivata gotovom sladu, kao i utjecaj pojedinih izmjene vode tijekom procesa proizvodnje slada na razvoj ispitivane plijesni i njezine sposobnosti sinteze gore navedenih mikotoksina.

Provedeno je mikroslađenje uzoraka ječma s različitim početnim stupnjem kontaminacije s plijesni *F. graminearum* (0% - 20%). Mikrobiološka i toksikološka analiza uzoraka neslađenog ječma te slada (osušeni i stabilizirani slad), pri čemu je određivan udio zrna zaraženog s *F. graminearumom* te koncentracija DON-a i njegovih derivata u uzorcima koji su izloženi različitim režimima slađenja koji se odnose na primjenu izmjene vode ili izostanak izmjene vode tijekom močenja.

3.2 MATERIJAL I METODE

Sorta ječma (*Hordeum vulgare*) Pivarac, korištena u ovom istraživanju, dobivena je od Poljoprivrednog instituta u Osijeku, uzgajana na lokalitetu Osijek (45°27'S, 18°48'E), požeta tijekom lipnja 2018. Uzorci žitarica (5 kg) sakupljani su kao neobrađeno i kondicionirano zrno, vađeni i pakirani u papirnate vrećice (1 kg). Do mikroslađenja materijal se dva mjeseca skladištio u sterilnim suhim spremnicima na suhom i hladnom mjestu (18 – 20 °C) kako bi se prevladalo stanje dormantnosti žita nakon žetve. Uzorci ječma zaraženi su plijesni *Fusarium graminearum* (CBS 110250, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Nizozemska) tijekom faza namakanja i klijanja. Da bi se dobio zaraženi slad, inokulacija ječma provedena je dodavanjem micelijskih diskova na ječam tijekom faze klijanja prvog dana. Micelij *F. graminearum* pripremljen je kako su opisali Habschied i sur. (2011). Ukratko, PDA (krumpir dekstrozni agar) korišten je za rast plijesni s temperaturom inkubacije postavljenom na 14 °C kako bi se smanjio šok nakon inokulacije slada, jer je temperatura slađenja bila 14 °C. Diskovi promjera 5 mm izrezani su s ruba kolonije. Sve inkubacije i analize provedene su paralelno, a svi rezultati prikazani su kao prosječne vrijednosti.

3.2.1 Određivanje početnog stupnja kontaminacije ječma s plijesni *Fusarium graminearum*

Stvarni stupanj kontaminacije s plijesni *Fusarium graminearum* u neslađenim uzorcima ječma određivan je prema MEBAK-u (1997.) kako slijedi.

Korišteni uređaji:

-autoklav,

-laminar (Laminarij, TELESTAR AV-100),

-komora za inkubaciju.

Kemikalije:

-aueromicin,

-streptomicin sulfat,

-PCNB (pentaklornitrobenzen),

-dikloran (2,6-dikloro-4-nitro-anilin),

-otopina NaOCl (sa 1% aktivnog klora),

-sterilna vodovodna voda.

Agar s manitolom: 2 g manitola i 20 g agara se unese u 1000 ml vode i autoklavira 15 minuta na 120 °C. Poslije autoklaviranja i hlađenja na oko 60 °C u agar se sterilno unese po 0,03 g/L antibiotika aueromicina i streptomicin sulfata, kao i fungicida PCNB (1 g/L) ili diklorana (1 mg/L).

Provedba

Oko 50 g ječma se drži 10 minuta u 100 ml otopine NaOCl (1%-tna otopina) u cilju dezinfekcije površine ječma. Uzorak zrna se zatim ispere dva puta sa sterilnom vodovodnom vodom, ostavi da se cijedi, ili eventualno, otkloni površinska voda papirnom maramicom. Sto zrna se pojedinačno poslaže u petrijevu zdjelicu i prelije mlakim agarom sa manitolom. Uzorci se inkubiraju na tamnom mjestu na 30 °C. Opisani postupak poveden je u dvije paralele, pri čemu se za konačni rezultat uzimala srednja vrijednost.

Ocjena rezultata

Kontaminacija s plijesni *Fusarium graminearum* može se zapaziti golim okom na osnovi pojave pigmentacije boje višnje u agaru, pri čemu primjena mikroskopa nije potrebna. Na agaru s manitolom mogu rasti skoro sve plijesni koje se sreću u žitaricama, međutim, samo *Fusarium graminearum* daje na ovoj podlozi pigment boje višnje.

3.2.2 Mikroslađenje

Postupak mikroslađenja je proveden prema standardnoj MEBAK proceduri (MEBAK, 1997.) u rashladnom inkubatoru s kontrolom vlage (Climacell 222, MMM Medcenter Einrichtungen). Klijanje zelenog slada je također provedeno prema MEBAK-u. Nakon sušenja slad je premješten u papirnate vrećice i držan na sobnoj temperature tri dana radi izjednačavanja vlažnosti. Shema slađenja ječma u ovom istraživanju prikazana je u **Tablici 2**.

Tablica 2 Shema mikroslađenja ječma

<table>
<tr><th>Dan</th><th>Koraci mikroslađenja</th><th colspan="2">Postupak močenja</th></tr>
<tr><td>1</td><td>Močenje u trajanju 5 h na 14 °C;
Suho močenje u trajanju 19 h na 14 °C, relativna vlažnost zraka 95%.</td><td>Izmjena vode za šaržu A</td><td>Bez izmjene vode za šaržu B</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Močenje 4 h na 14 °C;
Suho močenje u trajanju 20 h na 14 °C, relativna vlažnost zraka 95%.</td><td>Izmjena vode za šaržu A</td><td>Bez izmjene vode za šaržu B</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Suho močenje u trajanju 1 h na 14 °C, relativna vlažnost zraka 95%.</td><td>Izmjena vode za šaržu A</td><td>Bez izmjene vode za šaržu B</td></tr>
<tr><td>3–6</td><td>Klijanje je provedeno kroz 96 h na 14 °C
relativna vlažnost zraka 95%</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="2">7</td><td rowspan="2">Sušenje je provedeno nakon poslijednjeg sata klijanja, tijekom 19 h, prema standardnoj procedure za svijetli slad;</td><td>50 °C tijekom 16 h
60 °C tijekom 1 h
70 °C tijekom 1 h
80 °C tijekom 1 h</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">otklicavanje; pakiranje u papirnate vreće i skladištenje</td></tr>
</table>

Primijenjena su dva modela močenja. U prvoj šarži zaraženog uzorka, voda za natapanje redovito se zamjenjivala nakon svake faze namakanja (AI), a u drugoj šarži voda za močenje nije mijenjana tijekom slađenja (BI). Identični postupci (AH i BH) također su primijenjeni na zdravom (kontrolnom) ječmu tijekom slađenja. Dodana voda bila je iste temperature kao voda u kadicama za slađenje prije izmjene (14 ° C). Sušenje zelenog slada izvedeno je prema protokolu MEBAK®. Nakon sušenja slad se prebacio u papirnate vrećice i držao na sobnoj temperaturi tri tjedna radi uravnoteženja vlage. Mikrobiološka analiza kontrolnog (zdravog) ječma pokazala je 0% kontaminacije *Fusarium graminearum*, a nakon postupka slađenja dobiveni slad (zaražen i zdrav) također je podvrgnut mikrobiološkoj analizi. Utvrđena je 100%-tna kontaminacija za zaraženu seriju, a 0% kontaminacije za kontrolnu (zdravu). Kako bi se postigle različite razine onečišćenja (0%, 10% i 20%), zaraženi slad je pomiješan sa zdravim uzorkom slada (šarža AI s AH i serije BI i BH), što je potvrđeno uporabom prethodno opisane mikrobiološke metode.

3.2.3 Određivanje stupnja kontaminacije zelenog i suhog slada ječma s plijesni *Fusarium graminearum*

Određivano na isti način kao i stupanj kontaminacije neslađenog ječma.

3.2.4 Analiza deoksinivalenola i u ječmu i sladu

Analiza multi-toksina izvedena je kako su opisali Malachová i sur. (2014) na Odjelu za agrobiotehnologiju (IFA-Tulln), Beč, Austrija. Pet grama homogeniziranog mljevenog uzorka ekstrahirano je otapalom za ekstrakciju acetonitril : voda : octena kiselina = 79 : 20 : 1 tijekom 90 minuta uporabom rotacijske tresilice GFL 3017 (GFL, Burgwedel, Njemačka) na 180 okretaja u minuti, pri sobnoj temperaturi. Nakon taloženja, 500 µL bistrog ekstrakta razrijedi se otapalom za razrjeđivanje (acetonitril: voda: octena kiselina = 20: 79: 1). Za separaciju je korišten Agilent 1290 UHPLC sustav u kombinaciji sa Gemini® C18 (150 × 4,6 mm id, veličina čestica 5 µm) i zaštitnim uloškom C18, 4 × 3 mm id, dok je sustav Sciex 5500 qtrap® korišten za detekciju i kvantifikaciju spojeva. Svi su parametri sustava su opisani u Malachová i sur. (2014). Svi uzorci analizirani su u tri primjerka.

3.2.5 Statstička analiza

Eksperimentalni podaci obrađeni su analizom varijance (ANOVA) i Fisherovom najmanje značajnom razlikom (LSD), sa značajnošću definiranom na $p < 0,05$. Statistička analiza provedena je u programu Statistica 12.7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako bi se istražio učinak stope zaraze *F. graminearum* i raznolikosti mikotoksina tijekom slađenja, primijenjena su dva režima slađenja, A) gdje je tijekom slađenja promijenjena voda za namakanje i B) gdje voda za kuhanje nije promijenjena tijekom slađenja. Rezultati mikrobiološke analize početnog ječma, slada i razrijeđenog slada prikazani su u **Tablici 3**.

Tablica 3 Rezultati mikorbiološke analize početnog ječma, slada i razrijeđenog slada

	Predviđena kontaminacija, %	**Izmjerena kontaminacija, %**
Početni ječam	0	0
Slad		
AI	100	99
BI	100	100
AH	0	0
BH	0	0
Razrijeđeni slad		
Izmjena vode		
0	0	0
10	10	9
20	20	21
Bez izmjene vode		
0	0	0
10	10	11
20	20	22

Iz rezultata je vidljivo da je metodom inokulacije micelijem plijesni *F. graminearum* postignuta željena razina kontaminacije slada od 100%. Metodom razrijeđenja sa neinficiranim ječmom, dobivene su različite razine kontaminacije od 0, 10 i 20%.

U nekoliko istraživačkih radova koje su objavili Krstanović i sur. (2002.;2005.) i Velić i sur. (2007.) provedeno je praćenje koncentracije *F. graminearum* i *F. culmorum* u hrvatskim sortama

ječma i pšenice. Da bi rezultati bili statistički značajni, Krstanović i sur. (2005.) su ispitivali kontaminaciju ječma *F. graminearum* kroz tri uzastopne godine (2001. - 2003.). Rezultati su pokazali da je maksimalna prosječna vrijednost kontaminacije tom plijesni bila 19%. Istraživanjem koje su proveli Krstanović i sur. u 2015. godini, praćen je odnos između onečišćenja ječma i slada. Rezultati istraživanja pokazali su da 20% kontaminiranog ječma daje otprilike trostruko niže rezultate za onečišćenje sladom, što rezultira sa 7% kontaminiranim sladom. Potaknuti tim rezultatima, zaključeno je da razina onečišćenja sladom od 20% predstavlja realne agroklimatske uvjete za hrvatski ječam. To je razlog zašto je maksimalna razina kontaminacije slada u ovom istraživanju bila 20%.

Tablica 4 Koncentracije DON-a i njegovih derivata u uzorcima slada

Šarža	Toksin μg kg^{-1}		
	DON	**DON-3-GLC**	**3-ADON**
A - Izmjena vode			
0	25.4 ^{f}	<LOD *	8.03 ^{e}
10	282 ^{d}	354 ^{d}	14.4 ^{d}
20	1001 ^{a}	695 ^{a}	110 ^{a}
B - Bez izmjene vode			
0	38.1 ^{e}	<LOD	5.10 ^{f}
10	370 ^{c}	407 ^{c}	24.1 ^{c}
20	685 ^{b}	639 ^{b}	84.5 ^{b}

Vrijednosti u tablici su srednje vrijednost tri mjerenja. Vrijednosti u istoj koloni sa različitim slovima (a-f) označavaju značajnu statističku razliku između uzoraka ($p < 0.05$). * Limit detekcije (LOD) za DON = 0.3 μg kg^{-1}; DON-3-GLC = 0.02 μg kg^{-1}; 3-ADON = 0.3 μg kg^{-1}.

Rezultati određivanja DON-a i njegovih derivata, DON-3-GLC i 3-ADON, takozvanih modificiranih mikotoksina, prikazani su u **Tablici 4**. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazuju da je režim natapanja vode značajno ($p < 0,05$) utjecao na proizvodnju mikotoksina, odnosno da se više mikotoksina sintetiziralo u šarži gdje se redovito mijenjala voda tijekom močenja. Za 20%-tno onečišćenje, proizvodnja DON-a bila je veća za oko 1,5 puta u seriji A u usporedbi sa serijom B, gdje voda za močenje nije mijenjana.

Slično se dogodilo i sa derivatima DON-a, DON-3-GLC (deoksinivalenol-3-glukozid) i 3-ADON (3-acetildeoksinivalenol), odnosno izmjena vode tijekom močenja pridonjela je povećanju koncentracije ovih metabolita u sladu.

Jedno od mogućih objašnjenja moglo bi biti da dotok svježe vode iz slavine povećava koncentraciju otopljenih minerala i kisika u šarži i stoga služi kao reaktivator enzima koji sudjeluju u biosintezi mikotoksina (Amarasinghe i Dilantha Fernando, 2016.). Druga bi teorija bila da je voda iz slavine djelovala nepovoljno na micelij i zbog toga stimulirala proizvodnju mikotoksina. Prema godišnjem izvješću Vodovoda Osijek za 2017. godinu (Vodovod, 2018), količina svih metalnih iona bila je unutar zakonske preporuke; osim arsena čija je dopuštena koncentracija u vodi za piće 10 μgL^{-1}, a utvrđena koncentracija je 30 μgL^{-1}. Budući da je arsen poznati aktivator oksidativnog stresa, a razine arsena u korištenoj vodi iz slavine bile su tri puta veće od dopuštenih, to bi moglo imati utjecaja na stimulaciju proizvodnje mikotoksina, jer je poznato da plijesni sintetiziraju mikotoksine kada se nađu u nepovoljnim i stresnim uvjetima (Ponts, 2015.). Prema Cueru i Quelletu (2005.), metalni ioni (Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}) imaju stimulativni učinak na proizvodnju zearalenona u *Fusarium graminearum*. To je tema koju tek treba detaljnije istražiti.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- koncentracije DON-a, DON-3-GLC i 3-ADON-a u uzorcima povećavale su se sa povećanjem kontaminacije, i to u svim uzorcima bez obzira na izmjenu vode tijekom močenja,
- primjena izmjene vode tijekom močenja dovela je do porasta koncentracije DON-a, i njegovih derivata u uzorcima u odnosu na one kojima se voda tijekom močenja nije mijenjala,
- izmjenom vode tijekom močenja slada kontaminiranog plijesni *F. graminearum* potiče se proizvodnja mikotoksina DON-a i njegovih derivata vjerojatno zbog svježeg pritoka hranjivih tvari.

6. LITERATURA

Amarasinghe, CC, Dilantha Fernando, WG: Comparative analysis of deoxynivalenol biosynthesis related gene expression among different chemotypes of *Fusarium graminearum* in spring wheat. *Frontiers in Microbiology, 7*, 1229, 2016.

Atukwase A, N. Kaaya A, Muyanja C, Vismer H, P. Rheeder J: Diversity of Gibberella fujikuroi Species Complex isolated from Maize Produced in Uganda. *International Journal of Plant Pathology*, 3:1-13, 2012.

Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R: Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glukoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53, 3421-3425, 2005.

Bewley JD, Black M: Seeds, Physiology of development and germination. *Plenum Press*. New York, 1985.

Cuero R, Ouellet T: Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. *Journal of Applied Microbiology, 98*, 598-605, 2005.

Galaverna G, Dall'asta C, Mangia M, Dossena A, Marchelli R: Masked mycotoxins: an emerging issue for food safety. *Czech Journal of Food Science,* 27, 87-92, 2009.

Habschied K, Velić N, Tišma M, Krstanović V: Utjecaj mikroflore ječma i pšenice na kakvoću slada i piva. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 6 (3-4), 100-111, 2011.

Haikara A, Makinen V, Hakulinen R: On the microflora of barley after harvesting, during storage and in malting. *Proceedings of the Congres of European Brewing Convention,* 16, 35-46, 1977.

Hrgović S: Osnove agrotehnike proizvodnje: ječma, zobi i raži. *Glasnik zaštite bilja 1/2006*, 15-32, 2006.

Janssen EM, Liu C, Van der Fels-Klerx HJ: Fusarium infection and trichothecenes in barley and its comparsion with wheat. *World Mycotoxin Journal*, 11(1),33-46,2018.

Johanides V: *Industrijska mikrobiologija*, Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb, 1984.

Krstanović V, Velić N, Ćosić J: Research on pollution of domestic beer barley with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum. Svijet piva*, *7,* 6-12, 2002.

Krstanović V, Klapec T, Velić N, Milaković Z: Contamination of malt barley and wheat by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from the crop years 2001–2003 in eastern Croatia. *Microbiological Research, 160*, 353-359, 2005.

Krstanović V, Mastanjević K, Velić N, Pleadin J, Perši N, Španić V: The influence of *Fusarium culmorum* contamination level on deoxynivalenol content in wheat, malt and beer. *Romanian Biotechnological Letters, 20,* 10901–10910, 2015.

MacLeod L, Evans E: Barley, Rice and Maize Processing. *Encyclopedia of Food Grains, Second Edition*, 423-433, 2016.

Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R: Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J. Chromatography A*, *1362*, 145–156, 2014.

Marić V: Biotehnologija i sirovine. *Stručna i poslovna knjiga*, Zagreb, 2000.

Martinčić J, Kolak I: Ječam – *hordeum vulgare* l. conv. *distichum*, Sirovina za potrebe industrije slada i piva. *Sjemenarstvo* 10(93) 3-4, 163-172, 1993.

Mastanjević K, Krstanović, V, Mastanjević K, Šarkanj, B: Malting and brewing industries encounter *Fusarium* spp. related problems. *Fermentation* 4, 3, 2018.

MEBAK – Mitteleuropaische Brautechnische Analysenkommision: *Guidelines for Beverage Dispensing Systems*, Weihenstephan, Njemačka, 2011.

Noots I, Delcour JA, Michiels CW: From field barley to malt: detection and specification of microbal activity for quality aspects. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(2), 121-153, 1998.

Pascari X, Ramos AJ, Marin S, Sanchis V: Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International*, 103, 121-129, 2018.

Pascari X, Gil-Samarra S, Marin S, Ramos AJ, Sanchis V: Fate of zearalenone, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during malting process. *LWT – Food Science and Technology*, 99, 540-546, 2019.

Piacentini KC, Savi GD, Olivo G, Scussel VM: Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control*, 50, 925-929, 2015.

Pitt JI: Deoxynivalenol and other trichotecenes. *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 295-298, 2014.

Ponts N: Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system. *Frontiers in Microbiology, 6*, 1-5, 2015.

Schwarz PB, Beattie S, Casper HH: Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 102, 93-96, 1996.

Vegi A, Schwarz P, Wolf-Hall CE: Quantification of Ttri5 gene, expression, and deoxynivalenol production during the malting of barley. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 150-156, 2011.

Vodovod Osijek: Godišnje izvješće o kvaliteti vode za ljudsku potrošnju u 2017. godini. 11.1.2018.

Web 1: http://brulosophy.com/2018/04/09/grain-comparison-2-row-pale-malt-vs-6-row-pale-malt-exbeeriment-results/ [18.7.2020.]

Web 2: http://www.int.laborundmore.com/archive/853726/How-can-we-safeguard-the-quality-of-our-beer%3F.html [18.7.2020.]

Wolf-Hall CE: Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology* 119:89-94, 2007.

Yu J, Yin H, Dong J, Zhang C, Jin Z, Cao Y: Pullulation of toxigenic *Fusarium* and Deoxynivalenol in the malting of *de minimis* infected barley (*Hordeum vulgare*). *LWT – Food Science and Technology*, 113, 108242, 2019.