

# Utjecaj temperature skladištenja na raspodjelu zearalenona u frakcijama slada

---

Stepanović, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:109:708803>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-02-25**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Marko Stepanović**

**UTJECAJ TEMPERATURE SKLADIŠTENJA NA  
RASPODJELU ZEARALENONA U FRAKCIJAMA SLADA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad 2014.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za bioproceno inženjerstvo  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Osnove biokemijskog inženjerstva s osnovama industrijske mikrobiologije  
**Tema rada** Prihvaćena na I. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj 2012/2013. godini održanoj dana 23. 10. 2012.  
**Mentor:** dr.sc. Vinko Krstanović, izv. prof.  
**Pomoć pri izradi:** Kristina Habschied, dipl. ing.

### UTJECAJ TEMPERATURE SKLADIŠTENJA NA RASPODJELU ZEARELENONA U FRAKCIJAMA SLADA

Marko Stepanović, 2302/02

#### Sažetak:

Cilj istraživanja bio je ustanoviti utjecaj temperature skladištenja na raspodjelu zearalenona (ZEA) u pojedinim frakcijama slada. Provedeno je mikroslađenje uzoraka oljuštenog ječma te su uzorci cijepljeni sa plijesni *Fusarium graminearum*. Toksikološke analize provedene su u uzorcima pojedinih frakcija slada na različitim temperaturama pri različitom vremenu inkubacije, pri čemu je određivana koncentracija mikotoksina. Rezultati istraživanja pokazali su da je razina Zearalenona (ZEA) veća u mekinjama i klicama nego u brašnu pod gotovo svim uvjetima uzgoja. Inkubacija na 30 °C rezultirala je općenito nižim vrijednostima ZEA u klicama i mekinjama bez obzira na vrijeme inkubacije. Nadalje, rezultati ukazuju na važnost uvjeta skladištenja na koncentracije ZEA u frakcijama slada koje se koriste u proizvodnji hrane.

**Ključne riječi:** ječmeni slad, Zearalenon, *Fusarium graminearum*, temperatura, vrijeme inkubacije

**Rad sadrži:** 32 stranica  
8 slika  
1 tablice  
0 priloga  
56 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |    |  |               |
|----|--|---------------|
| 1. | dr. sc. Marko Jukić, doc.              | predsjednik   |
| 2. | Prof.dr. sc. Vinko Krstanović          | član-mentor   |
| 3. | dr. sc. Natalija Velić, doc.           | član          |
| 4. | Prof.dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić | zamjena člana |

**Datum obrane:** 03. listopad 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) 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

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Course title:** Technology of malting and brewing  
**Thesis subject** Was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. I held on November 23, 2012.  
**Mentor:** *PhD, Vinko Krstanović, Associate Prof.*  
**Technical assistance:** *MSc Kristina Habschied*

### IMPACT OF TEMPERATURE STORAGE ALLOCATION ZEARELENONE IN MALT FRACTIONS

*Marko Stepanović, 2302/02*

#### Summary:

The aim of this study was to determine the effect of storage temperature on the distribution of zearalenone (ZEA) in individual fractions of malt. Micro-malting was conducted with samples of hulled barley and the samples were inoculated with the mold *Fusarium graminearum*. Toxicological tests were carried out in samples of fractions of malt at different temperatures for different periods of incubation, where is determined the concentration of mycotoxins. The results showed that the levels of zearalenone (ZEA) is higher in the bran and germ than in flour under almost all growing conditions. Incubation at 30 ° C resulted in generally lower values of ZEA in the germ and bran, regardless of the time of incubation. Furthermore, the results indicate the importance of storage conditions on ZEA concentrations in the fractions of malt to be used in food manufacturing.

**Key words:** Malted barley, Zearalenone, *Fusarium graminearum*, temperature, incubation time

**Thesis contains:** 32 pages  
8 figures  
1 tables  
0 supplements  
56 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |                                    |              |
|------------------------------------|--------------|
| 1. Marko Jukić, PhD,               | chair person |
| 2. Vinko Krstanović, PhD,          | supervisor   |
| 3. Natalija Velić, PhD,            | member       |
| 4. Daliborka Koceva Komlenić, PhD, | stand-in     |

**Defense date:** October, 03, 2014.

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

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Vinku Krstanoviću, svome mentoru, na predloženoj temi i ukazanom povjerenju prilikom izrade diplomskog rada.

Također se zahvaljujem dipl.ing. Kristini Habschied na brojnim stručnim savjetima, i potpori tijekom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se i svojoj supruzi na pruženoj potpori .

Zahvaljujem se svojim roditeljima na ukazanom strpljenju i potpori tijekom mog studiranja.

## Sadržaj

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2.TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. JEČAM .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Opne zrna .....	4
<b>2.2. PROIZVODNJA JEČMENOG SLADA.....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Močenje zrna .....	7
2.2.2. Klijanje .....	7
2.2.3. Sušenje zelenog slada .....	8
<b>2.3. MIKROBNA POPULACIJA ZRNA JEČMA I SLADA .....</b>	<b>9</b>
2.3.1. Plijesni roda Fusarium .....	9
2.3.2. Utjecaj žitarica kontaminiranih s plijesni Fusarium graminearum na kakvoću slada i piva.....	11
2.3.3. Mikotoksini u ječmu, sladu i pivu .....	12
2.3.4. Zearalenon (ZEA) .....	13
2.3.5. Sprječavanje razvoja mikroflore na žitaricama prije i tijekom slađenja .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. ZADATAK.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>16</b>
3.2.2. Priprema slada .....	16
3.2.3. Inokulacija i inkubacija uzoraka ječmenog slada .....	17
3.2.4. Toksikološka analiza pojedinih frakcija slada .....	18
<b>4.REZULTATI.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. TOKSIKOLOŠKA ANALIZA POJEDINIH FRAKCIJA SLADA .....</b>	<b>21</b>
<b>5.RASPRAVA .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1. TOKSIKOLOŠKA ANALIZA POJEDINIH FRAKCIJA SLADA .....</b>	<b>25</b>
<b>6.ZAKLJUČCI .....</b>	<b>26</b>
<b>7.LITERATURA.....</b>	<b>28</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

ZEA zearalenon

MEBAK Srednjeeuropska komisija za pivarsku analitiku

## **1. UVOD**



Ječam je široko rasprostranjena namirnica namijenjena za ljudsku potrošnju. Zrna ječma predstavljaju nutritivno bogatu podlogu i zbog toga su pogodna za mikrobiološki rast i proliferaciju (Kocić-Tanackov i sur., 2005.). Ječam se koristi za proizvodnju slada. Pod imenom slad, podrazumjeva se zrno žitarice koje je proklijalo u umjetnim uvjetima kod određene temperature i određene količine vlage.

Mikroorganizmi koji uzrokuju štetu na ječmu su plijesni. Plijesni roda *Fusarium* prvenstveno uzrokuju bolest zrna nazvanu fuzarioza. Ove plijesni su prirodno prisutne na zrnu i proliferiraju tijekom procesa slađenja ovisno o različitim čimbenicima, kao što su primjerice početni stupanj kontaminacije zrna te međudjelovanje između različitih mikrobnih vrsta, nutritivnih svojstava zrna i procesnih parametara (temperature, zračenja i vlage) (Noots i sur., 1998.). Posljedice kontaminacije s pljesnima ovog roda su smanjeni prinosi, manja prosječna veličina zrna, smanjenje nutritivne vrijednosti, gubitak boje i promjene u mirisu i okusu zrna (Vanne i Haikara, 2001.). Fuzarioza je teška bolest zrna (Perkowski i sur., 2003.), koja se može djelomično kontrolirati plodoredom, izborom kulture ječma i primjenom fungicida.

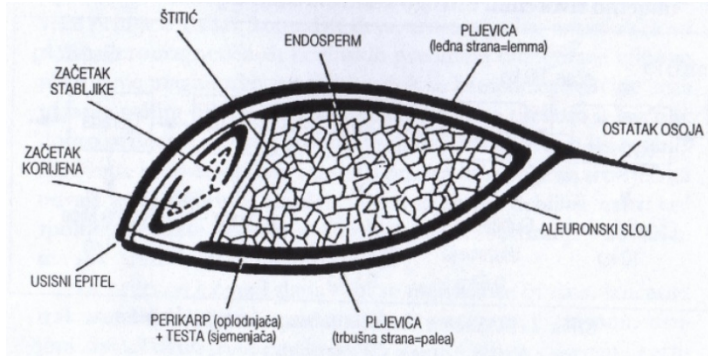
Kao sekundarni metabolit plijesni roda *Fusarium*, zearalenon je među najčešće prisutnim mikotoksinima u žitaricama (Zinedine i sur., 2007.). Štetni utjecaji zearalenona (ZEA) na ljude i životinje, primarno reproduktivne i razvojne poteškoće, predstavljaju veliki izazov za prehrambenu industriju i industriju stočne hrane (Zinedine i sur., 2007.).

Cilj ovog istraživanja bio je ustanoviti utjecaj temperature skladištenja na raspodjelu zearalenona u frakcijama slada. Provedena su toksikološka istraživanja u uzorcima pojedinih frakcija slada na različitim temperaturama pri različitom vremenu inkubacije, pri čemu je određivana koncentracija mikotoksina.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Ječam

Ječam (*Hordeum vulgare*) je žitarica iz porodice trava i zauzima peto mjesto u svjetskoj proizvodnji žitarica te je kao škrobna sirovina pogodna za upotrebu u pivarstvu (Marić 2000.).



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

Ona strana zrna na kojoj se nalazi uzdužna brazda naziva se trbušnom stranom. Dobar pivski ječam ima finu i tanku pljevicu, koja je naročito na donjem dijelu trbušne strane izbrazdan brojnim poprečnim naborima. Na donjem dijelu zrna, sa leđne strane nalaze se dva ostatka od cvijetanja koji se zovu lodikule, sa trbušne strane u centralnoj brazdi smještena je bazalna četkica. Oblik, veličina i pokrivenost dlačicama ovih dijelova zrna karakteristični su za ječam određene sorte. Na poprečnom presjeku zrna (sl. 1) razlikuju se tri osnovna dijela: opne, embrio (klica) i endosperm.

### 2.1.1. Opne zrna

Ječmeno zrno obavijeno je sa tri opne, a to su pljevica i međusobno srasle oplodnjača i sjemenjača. Pljevica obavija zrno sa svih strana te je kod pivskog ječma srasla sa ostalim dijelovima zrna. Sastoji se od veće leđne i manje (tanje i finije) trbušne pljevice. Leđna pljevica se na gornjem dijelu produžava u osoj, a na donjem dijelu obavija osnovu zrna sa kojom se zrno spaja sa centralnim vretenom klasa. Pljevica zrelog ječmenog zrna sastavljena je od nekoliko slojeva izumrlih stanica, koje se sastoje od celuloze i hemiceluloze. U njoj ima i gorkih i taninskih supstanci koje mogu utjecati na okus i druge osobine piva te  $\text{SiO}_2$  koji joj daje tvrdoću. Sadržaj pljevice u ječmu iznosi 6 – 14 %. Kod dobrog pivskog ječma količina pljevice ne prelazi 6 – 8 %. Pljevica je čvrsta i štiti zrno od povreda.

Ispod pljevice nalaze se srasle opne ploda i sjemena (oplodnjača i sjemenjača), sastavljene od po nekoliko redova nježnijih stanica. Sjemenjača je polupropusna što znači da dobro propušta vodu, a zadržava prolaz otopljenih supstanci. Zahvaljujući tome, prilikom močenja ječma zrno se može tretirati raznim kemijskim supstancama u cilju dezinfekcije, a da ne dođe do njihovog prodora u endosperm i do oštećenja embrija.

Ispod ovih opni nalazi se aleuronski sloj. To su bjelančevinaste stanice koje su, pored embrija, jedini živi dio zrna. Ovaj sloj igra veoma značajnu ulogu u klijanju i nastanku nove biljke.

Embrio ili klica je živi dio zrna, od kojeg klijanjem nastane nova biljka. On čini 2,8 - 5 % težine zrna i smješten je na donjem dijelu zrna sa leđne strane. Sastoji se od začetaka korijena, stabla i lista.

Embrio je štitićem odvojen od endosperma u kojem se nalazi rezervna hrana koja služi za razvoj biljke dok se ne razvije korijenov sustav. U sastav štitića ulazi i usisni epitel, sloj šupljih duguljastih stanica kroz koje se otopljeni sastojci endosperma prilikom klijanja transportiraju u embrio.

Prilikom klijanja u embriju nastaju tvari pod čijim djelovanjem se u ostalim dijelovima zrna aktiviraju ili sintetiziraju enzimi. Ovi enzimi prelaze u endosperm gdje razgrađuju rezervne hranjive sastojke otopljene u vodi. Ovi sastojci zatim odlaze u embrio gdje služe kao hrana u razvoju nove biljke.

Endosperm je brašnasti dio zrna u kojem se nalazi rezervna hrana za rast klice. On je sastoji od stanica sa tankim zidovima u kojima se nalaze škrobna zrnca. Kod pivskih sorti ječma stanični zidovi endosperma su tanji i lakše se razgrađuju nego kod stočnog ječma. U stanicama endosperma koje se nalaze u neposrednoj blizini štitića nema škroba jer je on utrošen kao hrana za klicu tijekom sazrijevanja i čuvanja zrna.

Za proizvodnju ječmenog slada isključivo se koristi pljevičasti dvoredni ječam (*Hordeum distichum*) kojeg se može sijati u proljeće (jare sorte) ili u jesen (ozime sorte). Za slađenje se, međutim, primjenjuje samo zrno odgovarajuće kvalitete. Kvaliteta zrna ovisi o svojstvima sorte i uvjetima uzgoja (klima, sastav i geografski položaj poljoprivrednog zemljišta, gnojidba). Sladarsku kvalitetu zrna ocjenjuje se prije svega prema vanjskom izgledu zrna, fizičkoj i kemijskoj analizi te fiziološkim svojstvima (Marić, 2000.).

Prema kvaliteti, pivski se ječam dijeli u tri kvalitativne skupine: prosječan, vrlo dobar i izvrstan ječam. Jedan od kriterija za takvu podjelu je veličina zrna ili sortiranost zrna. Sortiranje je najvažnija metoda fizičkog/mehaničkog ispitivanja zrna. Određivanjem brašnavosti endosperma zrna mogu se dobiti važni zaključci o njegovu ponašanju tijekom slađenja te, o očekivanoj kvaliteti slada. Udio brašnavih zrna u dobrom pivskom ječmu ne

smije biti manji od 80%. Udio vode u dobrom pivskom ječmu ne smije biti veći od 14%, jer mu je u protivnom vrijeme čuvanja ograničeno te zrna treba sušiti. Udio proteina u pivskom ječmu vrlo je značajan, pa se tako ječam s većim udjelom proteina teže sladi te su gubici pri slađenju veći. Povećan udio proteina u zrnu ječma, osim toga, smanjuje sadržaj ekstrakta u proizvedenom sladu. Udio proteina u dobrom pivskom ječmu obično iznosi 11 do 12,5%. Pojam klijavosti obuhvaća postotak živih zrna u uzorku ječma, neovisno o trajanju posliježetvenog dozrijevanja zrna. Udio klijavih zrna mora biti najmanje 96%. Energija klijanja je postotak zrna koja isključuju pri uobičajenim uvjetima slađenja nakon 3 ili nakon 5 dana. Velika energija klijanja ukazuje na dobro zdravstveno stanje ječmenog zrna i uspješan proces slađenja. Energija klijanja nakon 3 dana mora biti slična onoj nakon 5 dana. Osjetljivost ječma na primanje vode (hidrosenzibilnost) može biti različita. Izraz označava pojavu velikog smanjenja energije klijanja, kad ima više vode nego je potrebno za samo klijanje. Nju se određuje iz razlike energije klijanja pri močenju s različitim volumenima vode i ima raspon od 10% (za ječam vrlo male osjetljivosti), do iznad 45% (za ječam velike osjetljivosti prema vodi). Što je osjetljivost ječma prema vodi veća, to je kraće vrijeme njegova močenja. Moć bubrenja ukazuje na sposobnost zrna da nakon 72 sata močenja primi najveći volumen vode, a kreće se u rasponu od ispod 45% (nezadovoljavajuća) do iznad 50% (vrlo dobra) (Marić, 2000.).

## 2.2. Proizvodnja ječmenog slada

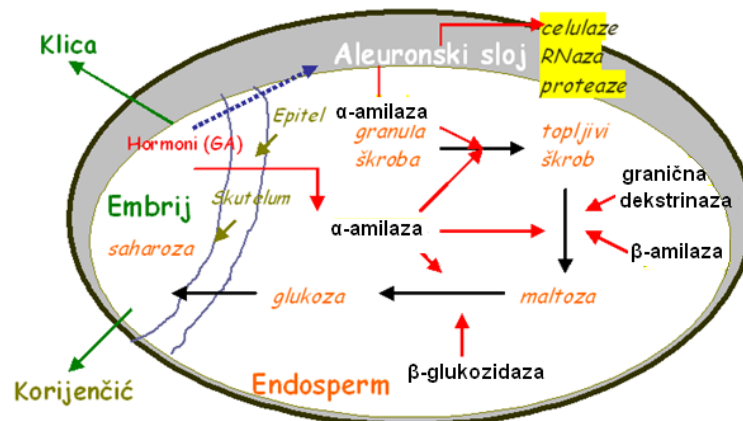
Slad je osnovna sirovina za proizvodnju industrijske hranjive podloge koju se naziva sladovina. Proizvodnja slada temelji se na biokemijskim procesima koji se zbivaju u zrnu ječma ili pšenice tijekom prirodnog klijanja u zemlji. Prva faza tehnološkog postupka slađenja je močenje tijekom kojeg zrno upija vodu te iz stanja anabioze prelazi u stanje bioze, tj. počinje klijati. Tijekom klijanja u zrnu se nakupljaju hidrolitički enzimi ( $\alpha$ -amilaza,  $\beta$ -glukanaze i proteaze), kako bi došlo do razgradnje endosperma, odnosno pribavljanja hranjivih sastojka potrebnih za rast embrija - korjenčića i lisne klice buduće biljke. Djelovanjem  $\alpha$ -amilaze iz škroba nastaju topljivi dekstrini, koje u zrnu prisutna  $\beta$ -amilaza hidrolizira do jednostavnih šećera. Istovremeno proteaze, hidroliziraju proteine do malih peptida i aminokiselina. Klijanjem se dobiva tzv. zeleni slad koji je zbog velikog udjela vode nestabilan. Zato se zelenom sladu uklanja voda sušenjem i uklanjaju se korjenčići (Marić, 2000.). Sladna klica je vrlo higroskopska i brzo prima vlagu. Uslijed primanja vlage ona postaje elastična, pa ako se ne bi odmah odvojila od slada, kasnije bi se odvajala teško i nepotpuno. Nakon sušenja zelenog slada, slad se dorađuje i skladišti.

### 2.2.1. Močenje zrna

Močenje je početna faza slađenja. Tijekom močenja (potapanja zrna u vodi), zrno upija vodu, bubri i povećava volumen za jednu trećinu. S povećanjem udjela vode u zrnu, pojačava se i disanje. Posljedica je nakupljanje  $\text{CO}_2$  i zagrijavanje zrna zbog topline oslobođene disanjem. Toj pojavi pridonosi i razvoj mikroorganizama na površini zrna. Radi uklanjanja mikroorganizama, topline i  $\text{CO}_2$ , voda za močenje nekoliko se puta mijenja, a ječmeno zrno snažno provjetrava i tako miješa. Povećanjem udjela vode u zrnu, upijanje vode je sve usporenije i na kraju potpuno prestaje kada sadržaj vode u zrnu dostigne graničnu vrijednost (50 do 55%). U sladarskoj praksi močenje završava pri vrijednostima nižima od graničnih (42 do 46%) (Gaćeša, 1979.). Brzina i tijek močenja ovise o temperaturi i kemijskom sastavu vode za močenje te veličini i hidrosenzibilnosti zrna. Močenje najčešće traje 40 do 50 sati, jer se kroz to vrijeme pri temperaturi vode 10 do 15°C postiže zadovoljavajući udio vode u zrnu (Marić, 2000.).

### 2.2.2. Klijanje

Tijekom klijanja dolazi do rasta nove biljke ječma, zbog čega je potrebna velika količina energije i gradivnih tvari, koje se dobivaju razgradnjom i trošenjem zaliha pohranjenih u endospermu. Promjene u zrnu tijekom klijanja prikazane su na **Slici 2**.



**Slika 2** Fiziološki i kemijski procesi u zrnu tijekom klijanja (Bewley, 1985.)

Prije početka klijanja, sastojci endosperma su u stabilnom makromolekulskom obliku. Da bi ih endosperm mogao trošiti kao izvor energije i ugljika, mora ih se razgraditi do vodotopljivih gradivnih molekula. Razgradnja tih molekula se odvija uz primjenu enzima, koji su u malim koncentracijama prisutni u zrnu ječma, pa tijekom klijanja većina enzima se najprije aktivira

te zatim sintetizira. Samo jedan od tih enzima nije sastojak zrna ječma ( $\alpha$ -amilaza) i posve se sintetizira tijekom klijanja.

Signalne tvari (hormoni giberelini i giberelinska kiselina) koji pokreću ovaj proces potječu iz klice - ukoliko je ona oštećena, odnosno odumrla ne dolazi do promjena u endospermu, a klijanje je onemogućeno.

Cilj klijanja je sintetizirati dovoljno citolitičkih, proteolitičkih i posebno amilolitičkih enzima ( $\alpha$ -amilaza,  $\beta$ -amilaza). Amilolitički enzimi razgrađuju škrob tijekom procesa ukomljavanja i on postaje dostupan kvascima kao supstrat u fazi vrenja. Nadalje, razgradnjom škroba i proteina endosperma postiže se rastresita struktura i smežuran izgled slada. Razvoj klice i korjenčića u kljajalištu osigurava se propuhivanjem zraka određene temperature (obično 2 °C niže od temperature zrna koje klija) i relativne vlažnosti zraka 70 – 90% (ovisno o polaznim pokazateljima kvalitete za određenu sortu). Nakon klijanja dobiva se tzv. "zeleni slad" koji je zbog velike vlažnosti i udjela enzima kemijski i mikrobiološki nestabilan te ga je potrebno sušiti (Marić, 2000.).

### 2.2.3. Sušenje zelenog slada

Sušenjem zelenog slada se smanjuje udjel vode u zrnu, prekida se klijanje i biokemijska razgradnja zrna i potiču se kemijske reakcije između razgradnih proizvoda te tako dobiva obojene i mirisne sastojke slada, bitne za organoleptička svojstva piva. Vlažnost zrna se smanjuje s oko 45% na manje od 5%. U prvoj fazi proces sušenja provodi se vrlo oprezno (temperatura manja od 50 do 70 °C) do vlažnosti zrna 10 - 12%, kako ne bi došlo do smanjenja enzimske aktivnost zrna (odnosno da se spriječi inaktivacija enzima toplinom). Druga faza u kojoj se uklanja preostala slobodna voda i voda vezana za koloidne sastojke zrna, provodi se pri višim temperaturama (80 - 85 °C za svijetli slad, odnosno 120 - 130 °C za tamni) te uz smanjen protok toplog zraka. Nakon sušenja slijedi hlađenje, otklicavanje (uklanjanje korjenčića-sladnih klica, jer su higroskopni i gorkog su okusa) te prikladno skladištenje slada. Prije upotrebe slad je potrebno skladištiti najmanje četiri tjedna, kako bi došlo do revitalizacije enzima i ujednačavanja vlažnosti (Marić, 2000.).

## 2.3. Mikrobna populacija zrna ječma i slada

Mikrofloru ječma i pšenice, te slada koji se od njih dobiva čine bakterije, kvasci i filamentozne gljive (Van Nierop i Rautenbach, 2006.). Mikroflora polja se u najvećoj mjeri sastoji od bakterija, divljih kvasaca i filamentoznih gljiva, koji potječu iz zraka i zemlje. Bakterije su brojčano najzastupljeniji mikroorganizami na polju, dok odmah iza bakterija, po broju slijede kvasci (Fleet, 1998.). Iako su bakterije i kvasci dominantne vrste na pšenici i ječmu, pravi problem predstavljaju plijesni, zbog štetnih proizvoda njihova metabolizma koji utječu na zdravstvenu ispravnost sirovine, a samim time i na kakvoću slada. Plijesni koje se najčešće mogu pronaći na ječmu i pšenici, uključuju vrste rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Cladosporium*, pri čemu najveće probleme u sladarstvu i pivarstvu uzrokuju plijesni roda *Fusarium* (Papadopoulou i sur., 1999.).

Nakon žetve, te za vrijeme skladištenja, mikroflora zrna se mijenja uslijed djelovanja temperature skladištenja, vlažnosti zrna i vremena skladištenja. Zrno visokog sadržaja vlage se prije skladištenja mora osušiti do vlažnosti manje od 14%. Sušenjem zrna sprječava se rast plijesni s polja i kvasaca te bakterija (Flannigan, 1987.). Ukoliko bi se skladištila zrna visoke vlažnosti (iznad 14%), moglo bi doći do proliferacije mikroorganizama i pregrijavanja žitarica. Plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus* su dominantne vrste u skladištima na obiteljskim gospodarstvima (Flannigan, 1987.). Do proliferacije plijesni roda *Fusarium* najčešće dolazi zbog ne pravovremenog sušenja sirovine. Kako bi se izbjegli ovi problemi, potrebno je provoditi kontrolu skladišnih prostora te primjenjivati higijenske mjere (Papadopoulou i sur., 1999.). Za rast i razvoj mikroorganizama troše se velike količine suhe tvari zrna, te pod njihovim utjecajem u pravilu dolazi do smanjenja klijavosti zrna, što uzrokuje pojavu neugodnih mirisa, okusa i promjena karakteristika slada.

### 2.3.1. Plijesni roda *Fusarium*

Plijesni roda *Fusarium* najčešće su prisutne plijesni na žitaricama u našem podneblju (Jurković i sur., 1998.). U rod *Fusarium* ubrajamo sljedeće vrste:

- *Fusarium acuminatum*
- *Fusarium anthophilium*
- *Fusarium avanceum*
- *Fusarium cerealis*
- *Fusarium chlamydosporum*
- *Fusarium culmorum*
- *Fusarium equiseti*
- *Fusarium graminearum*
- *Fusarium heterosporum*



- *Fusarium nygamai*
- *Fusarium oxysporum*
- *Fusarium poae*
- *Fusarium proliferatum*
- *Fusarium sambucinum*
- *Fusarium semitectum*
- *Fusarium sporotrichoides*
- *Fusarium subglutaminans*
- *Fusarium tricintum*
- *Fusarium verticillioides* i dr. (Logrieco i sur., 2003.)

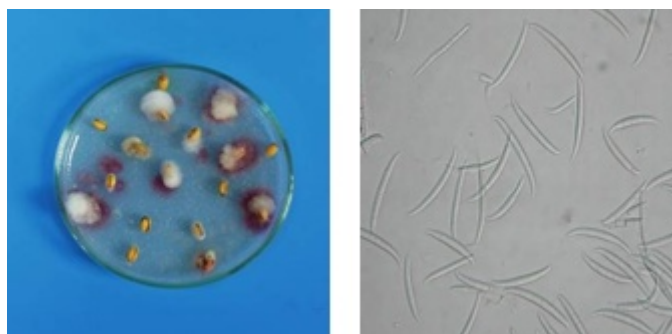
od kojih su

- *Fusarium graminearum* i
- *Fusarium culmorum*

najrasprostranjenije patogene vrste u srednjoeuropskoj klimatskoj zoni (Bottalico, 1998.). *F. graminearum* je ujedno i prevalentna vrsta u području istočne Hrvatske (Jurković i sur., 1998., Krstanović i sur., 2005.).

Navedene plijesni uzrokuju bolest žitarica tzv. „fuzariozu klasa“, najčešću i kvantitativno najzastupljeniju mikozu žitarica ovog podneblja (Ožegović, 1995.). Kontaminacija navedenim plijesnima ima karakter isključivosti, - šarža zrna koja je prihvatljiva po svim drugim pokazateljima kakvoće, a kontaminirana je ovim plijesnima, smatra se nepogodnom za slađenje (Schwarz i sur., 1997.).

Sve vrste plijesni roda *Fusarium* razgrađuju celulozu i susreću se u svim tipovima zemljišta. S obzirom na veliku konkurentsku moć u odnosu na većinu drugih saprofita, mogu preživjeti i duže od godinu dana u površinskom sloju tla i pri tome ostati aktivne (Teich, 1989.). Najpovoljniji period za infekciju je 2 – 3 dana prije cvjetanja kada plijesni iz tla prelaze na biljku na kojoj su latentno prisutne.



**Slika 3** *F. graminearum* na selektivnoj podlozi prema MEBAK-u i makrokonidije

### 2.3.2. Utjecaj žitarica kontaminiranih s plijesni *Fusarium graminearum* na kakvoću slada i piva

Mikrobna proliferacija može imati pozitivne i negativne učinke na kakvoću slada. Povoljni učinci mikroflore uključuju proizvodnju mikrobnih metabolita kao što su biljni hormoni koji stimuliraju klijanje ječma (Tuomi i sur., 1995.; Flannigan, 1996.; Noots i sur., 1999.), te pridonose enzimskom potencijalu slada (Flannigan, 1996.; Noots i sur., 1999.; Van Campenhout, 2000.). Štetni učinci mikroflore uključuju loš izgled zrna, smanjenje energije klijanja i nepoželjne arome. Mikroorganizmi proizvode širok spektar sekundarnih metabolita, koji uključuju i jako toksične mikotoksine (Papadopoulou i sur., 1999.).

Simptomi zaraze plijesnima roda *Fusarium* posebno dolaze do izražaja tijekom procesa slađenja. Micelij ovih plijesni razvija se kratko nakon močenja, a očituje se kao bijeli, zračni micelij čije hife prodiru u unutrašnjost zrna dajući mu dlakav izgled. Kod prevrtanja tijekom procesa slađenja bijeli micelij se razara i dobiva izgled mokre vate, a na njegovom mjestu zrno dobiva intenzivno ljubičastu boju koja se trajno zadržava na zrnu (**Slika 4**). Takva zrna nazivaju se „relevantna crvena zrna“ (Niessen i sur., 1991.).



**Slika 4** Nekontaminirano a) i kontaminirano b) zrno ječma s *F. graminearum* (www.buhlergroup.com)

Fuzarioza može direktno i indirektno utjecati na kakvoću ječmenog slada. Indirektno utječe na transport hranjivih sastojaka tijekom razvoja zrna što za posljedicu ima smanjenje udjela endosperma, porast udjela proteina te smanjenje ekstrakta. Pojava "divljeg piva", koje je posljedica djelovanja toksina iz plijesni na enzimsku aktivnost zrna i/ili utjecaja enzima iz plijesni koje imaju drugačiju strukturu i svojstva od onih iz slada, definira se kao direktan utjecaj fuzarioze. Promjene kakvoće ječmenog slada uzrokovane su visokom proteolitičkom aktivnosti koja dovodi do povišenja koncentracije topljivog dušika i slobodnog  $\alpha$ -amino dušika

(FAN, *eng.* free amino nitrogen) u sladovini, jakoj razgradnji stanične stijenke i smanjenoj amilolitičkoj aktivnosti (Greenhalgh i sur., 1986.; Narziss, 1999.; Schwarz i sur. 2001.).

### **2.3.3. Mikotoksini u ječmu, sladu i pivu**

Mikotoksini su skupina sekundarnih metabolita plijesni koji nastaju u uvjetima stresa te predstavljaju opasnost u prehrambenom lancu (Klosovski i sur., 2010.; Mankevičiene, 2011.). Kontaminacija slada i piva ovim metabolitima rezultat je proliferacije plijesni prisutnih na sirovinama za proizvodnju slada.

Plijesni roda *Fusarium* sintetiziraju mikotoksine uslijed nepovoljnih uvjeta (Smith i Moss, 1985.; Medentsev i sur., 2001., Boeira i sur., 2002.) i oni u najvećoj mjeri pripadaju skupini trihotecena, kojih ima oko stotinu. Razlikuju se trihoteceni tipa A i tipa B. Najvažniji predstavnici trihotecena tipa A su T-2 toksin, HT-2 toksin i diacetoksiscirpenol (DAS), a tipa B nivalenol (NIV), fusarenon-X i deoksinivalenol (DON). Osim trihotecena, plijesni roda *Fusarium* produciraju i mikotoksine koji imaju estrogeno djelovanje, od kojih je najpoznatiji zearalenon (ZEA) i njegovi derivati (Hart i sur., 1984.; Lamper i sur., 2000.; Lori i sur., 2003.; Schwarz i sur., 2001.).

Zbog dobre topljivosti trihotecena u vodi, ovi se spojevi mogu prenijeti s inficiranog zrna preko vode za močenje na zdrava zrna i zatim blokirati ili usporavati sintezu enzima. Provedena istraživanja (Garda-Buffon i sur. 2010.) pokazala su da trihoteceni (DON i T-2) ometaju aktivnost amilaze tijekom slađenja, ali njihovo djelovanje ne pokazuje linearno ponašanje tijekom inhibicije enzima. Kako je većina ovih toksina termostabilna (Scott, 1984.; Lauren i Ringrose, 1989.; Wolf-Hall i sur., 1999.; Hazel i Patel, 2004.; Pronik i sur., 2005.), za očekivati je da kuhanje sladovine neće utjecati na njih.

Navedeni mikotoksini predstavljaju rizik za zdravlje ljudi, te su i snažni fitotoksini i tako utječu na sam proces slađenja. DON i nivalenol (NIV) pokazuju inhibicijski učinak na rast, broj stanica i vitalnost sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji se upotrebljavaju za proizvodnju lager i ale vrsta piva dok ZEA utječe na promjenu profila okusa piva već u koncentraciji od 2 µg/mL (Boeira i sur., 1999.; Boeira i sur., 2003.).

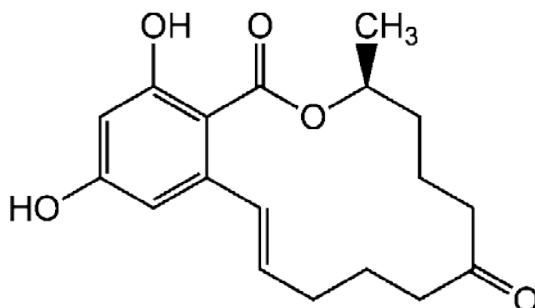
### 2.3.4. Zearalenon (ZEA)

ZEA je nesteroidni mikotoksin koji djeluje na estrogenske receptore (Zinedine i sur., 2007; Zinedine i Manes, 2009).

Zearalenon je metabolit povezan s nekoliko *Fusarium* vrsta:

- *Fusarium culmorum*
- *Fusarium graminearum*
- *Fusarium sporotrichioides* i
- *Fusarium crookwellense*

ZEA se u životinjama biotransformira u dva metabolita,  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) i  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL) koji su povezani s glukuronskom kiselinom (Zinedine i sur., 2007.). Ovi alkoholni metaboliti ZEA ( $\alpha$ -ZOL i  $\beta$ -ZOL) također pokazuju estrogeno djelovanje (Cheeke, 1998.). Zearalenon se može pronaći u žitaricama, stočnoj hrani, mesu i mlijeku. Djeluje kao endokrini disruptor, narušava reproduktivne funkcije, izaziva rani pubertet i ginekomastiju (Pepeljnjak i sur., 2008.). Štetni učinci zearalenona (ZEA) na ljude i životinje, što uključuje prvenstveno reproduktivne i razvojne poteškoće (Zinedine i sur., 2007.), su veliki izazov za prehrambenu industriju i industriju stočne hrane zbog maskiranih oblika ovog mikotoksina (ZEA glikozidi i sulfati). Kao sekundarni metabolit plijesni roda *Fusarium*, ZEA je među najčešće otkrivenim mikotoksinima u žitaricama. Kontrolirani uvjeti tijekom proizvodnje ječmenog slada potiču rast plijesni roda *Fusarium* i proizvodnju mikotoksina. Zearalenon i drugi mikotoksini mogu prijeći u proizvode od slada koji se koriste u ljudskoj prehrani, uključujući pivo, zbog topljivosti ZEA u alkoholu. Nus-proizvodi proizvodnje slada (klica i korjenčići odvojeni od zrna nakon klijanja) koriste se kao hrana za životinje te je iz tog razloga uvedena zakonska regulativa kojom se ograničava količina ovog mikotoksina u stočnoj hrani (Wolf-Hall, 2007.; Cavaglieri i sur., 2009.; Habschied i sur., 2011.).



**Slika 5** Kemijska struktura ZEA ([www.leatherheadfood.com](http://www.leatherheadfood.com))

### 2.3.5. Sprječavanje razvoja mikroflore na žitaricama prije i tijekom slađenja

Najbolji način kontrole je sprječavanje kontaminacije ječma ili odabir isključivo nekontaminiranih žitarica za slađenje. Važnu ulogu ima postupak obrade tla, također je važno što se koristi kao predusjev, pa su tako zeljaste biljke (kupus, repa, krumpir) bolje nego biljke koje obogaćuju tlo dušikom. Temperatura i vlažnost tijekom skladištenja trebaju biti usmjereni ne samo na sprječavanje proliferacije plijesni nego i na sprječavanje klijanja zrna i prevenciju štete koju nanose insekti (Habschied i sur., 2011.).

Sprječavanje razvoja mikroflore i produkcije mikotoksina tijekom slađenja može se postići odabirom procesnih parametara ili primjenom različitih kemijskih i fizikalnih tretmana. Nepovoljna mikroflora može se smanjiti početnim močenjem zrna bez aeracije te izmjenom vode tijekom močenja (Briggs i McGuinness, 1993.). Dodatak natrijevog hipoklorita u vodu za močenje uzrokuje smanjenje kontaminacije plijesnima, ali u visokim koncentracijama (> 0,1%) nepovoljno utječe na klijanje zrna.

Sustavno istraživanje provedeno tijekom procesa slađenja (Papandoupoulou i sur. 1999.) pokazalo je kako promjene u postupku slađenja imaju mali utjecaj na mikrofloru gotovog slada dok je mijenjanje režima močenja bilo učinkovito što se tiče smanjenja stupnja fungalnog rasta. Također, dodatak  $\alpha$  i  $\beta$ -kiselina hmelja tijekom slađenja uzrokovao je inhibiciju mikrobne proliferacije, ali su  $\alpha$ -kisleline izazvale pojavu divljeg piva.

Mikroorganizmi koji pokazuju antimikrobni potencijal mogu se koristiti kao starter kulture u bioprocima (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, „sladarski kvasac“ *Geotrichum candidum*, *Rhizopus*) u kojima je nepoželjna upotreba kemikalija s antimikrobnim učinkom, kao što je to slučaj sa slađenjem. Osim antimikrobnog učinka, korištenje starter kultura tijekom slađenja dovodi do poboljšanja fizikalnih i kemijskih parametara kakvoće gotovog slada (Linko i sur., 1998.)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

Cilj istraživanja bio je ustanoviti utjecaj različitih temperatura na raspodjelu zearalenona (ZEA) pri različitom vremenu inkubacije u pojedinim frakcijama slada koji je kontaminiran s plijesni *Fusarium graminearum*.

Provedeno je mikroslađenje uzoraka oljuštenog ječma koji nije kontaminiran. Uzorci slada su zatim inokulirani sa plijesni *Fusarium graminearum* te inkubirani na temperaturi od 20 °C i 30°C u vremenu od 17, 26 i 34 dana. Toksikološke analize dobivenih uzoraka slada provedene su u uzorcima pojedinih frakcija slada na različitim temperaturama pri različitom vremenu inkubacije, pri čemu je određivana koncentracija zearalenona (ZEA). Dobiveni rezultati za pojedine frakcije slada prikazani su tablično i grafički te su na osnovu toga doneseni odgovarajući zaključci.

### 3.2. Materijal i metode

Analize su provedene na oljuštenom ječmu dobivenom od Poljoprivrednog instituta Osijek. Uzorci ječma su izvagani i stavljeni u osam posuda za pripremu slada. Mikroslađenje je provedeno prema standardnoj MEBAK proceduri (MEBAK 1997.) Ekstrakcija i imunoafinitetno čišćenje uzoraka frakcija ječmenog slada napravljena je prema VICAM-ovoj proceduri za kukuruz

#### 3.2.2. Priprema slada

Postupak mikroslađenja je proveden prema standardnoj MEBAK proceduri (MEBAK, 1997.) u rashladnom inkubatoru s kontrolom vlage (Climacell 222, MMM Medcenter Einrichtungen, Germany). Močenje je provedeno u metalnim perforiranim korpicama uronjenima u metalne kadice s vodom za močenje. 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.

**Tablica 1** Shema standardnog mikroslađenja za ječam (MEBAK, 1997.)

<b>Močenje</b>					
<b>Procesni parametri</b>					
<i>t</i> / h	<i>T</i> / °C	<i>t</i> <sub>pod vodom</sub> / h	<i>t</i> <sub>na zraku</sub> / h	Vlažnost zrna / %	napomena
24	14	5	19	29	(1)
24	14	4	20	36	
24	14	2	/	44,5	(2); (3)
(1) u močioniku; (2) u klijalistu; (3) močenje orošavanjem					
<b>Klijanje</b>					
<b>Procesni parametri</b>					
<i>t</i> / h	<i>T</i> / °C	<i>Rh</i> <sub>zraka</sub> / %	napomena		
96	14	95 - 98	(3); (4); (5)		
(3) močenje orošavanjem; (4) podešavanje vlažnosti zrna do udjela vode od 44,5% prskanjem; (5) prevrtanje gomile dva puta dnevno					
<b>Sušenje</b>					
<b>Procesni parametri</b>					
<i>t</i> / h	<i>T</i> / °C			napomena	
16	50			(6)	
1	60 (H <sub>2</sub> O < 10%)				
1	70				
1	80				
(6) vrijeme sušenja 19 h, prema standardnom postupku sušenja za svijetli slad prema MEBAK-u					

Čišćenje slada se mora obaviti tako da se osigura potpuno uklanjanje korjenčića bez oštećenja pljevice.

### 3.2.3. Inokulacija i inkubacija uzoraka ječmenog slada

Slad je razdjeljen u Petrijeve zdjelice, koje su zatim naknadno sterilizirane u autoklavu. Aktivitet vode supstrata prilagođen je do 0,95 sa sterilnom destiliranom vodom i provjeren je korištenjem  $a_w$  – metra (Rotronic, Bassersdorf, Švicarska). Kako bi se osigurao konstantan aktivitet vode, u plastične vrećice stavljena je posuda sa 100 mL otopine NaCl istog aktiviteta vode zajedno sa Petrijevim zdjelicama. Za inokulaciju je korištena plijesan *Fusarium graminearum*, proizvodna plijesan za zearalenon (DZS 110.250, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Nizozemska). Uzorak je inokuliran uzimanjem diska promjera 5 mm PDA agara na rubu *Fusarium* kolonije. Disk je stavljen agarom prema dolje na sredinu svake Petrijeve zdjelice u kojoj se nalaze uzorci slada. Uzorci se zatim stavljaju na inkubaciju



na temperature od 20 °C i 30 °C u vremenu inkubacije od 17, 26 i 34 dana. Inokulacije i inkubacije uzoraka slada provode se u dva primjerka.

### **3.2.4. Toksikološka analiza pojedinih frakcija slada**

Toksikološka analiza uzoraka provedena je u laboratoriju Katedre za biokemiju i toksikologije Prehrambeno tehnološkog fakulteta u Osijeku.

#### **Kemikalije i aparatura**

Koncentracije ZEA u frakcijama slada određivane su prema VICAM-ovoj proceduri za kukuruz.

Od pribora korišteno je:

- metanol, HPLC
- acetonitril, HPLC
- KCl
- deionizirana voda

Kao standard korišten je ZEA standard (Biopure, Tulln, Austrija).

#### **Pripreme uzoraka frakcija ječmenog slada i postupak**

Nakon što završi inkubacija za zadano vremensko razdoblje (17,26,34 dana), uzorci se suše 1 sat na temperaturi od 50 °C. Nakon sušenja, uzorcima se prvo odvajaju klice, te se zatim slad melje u mlinu za slad (Newman Industries, Sale Creek, TN). Dobivena samljevena smjesa slada se pomoću sita različitih perforacija razdvajaju u mekinje i brašno potrebnih za toksikološku analizu. Za određivanje suhe tvari uzoraka korišten je HR73 halogeni analizator vlage (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) radi sušenja frakcija uzoraka do konstantne mase. Nakon razdvajanja, u inox blender dodaje se 40 g uzorka, 4 g KCl i 100 mL otopine acetonitril:voda (90:10) i miješa se na najvećoj brzini 2 minute. Zatim se dobivena smjesa razdvoji pomoću naboranog filter papira (Whatman). Od dobivenog eluata uzima se 1 mL uzorka i razrijedi sa 49 mL deionizirane vode i dobro promješa. Dobivena smjesa se zatim filtrira kroz microfiber filter papir. Količinu od 10 ml dobivenog uzorka propusti se kroz ZearalaTest kolonu brzinom 1 - 2 kapi u sekundi dok sav zrak ne izađe, te se kolona ispere sa 10 mL deionizirane vode brzinom 1 - 2 kapi u sekundi. Nakon toga se kroz kolonu propusti 1,5 mL metanola HPLC čistoće brzinom 1 kap u sekundi i uzorak se hvata u kivetu.

Kalibracija je provedena standardnom metodom korištenjem ZEA standarda (Biopure, Tulln, Austrija), te je recovery određen veličinom pika praznih uzoraka za 20,06 ppm, 1,003 ppm, a vrijeme retencije za zearalenon je iznosilo 26,4 minute.

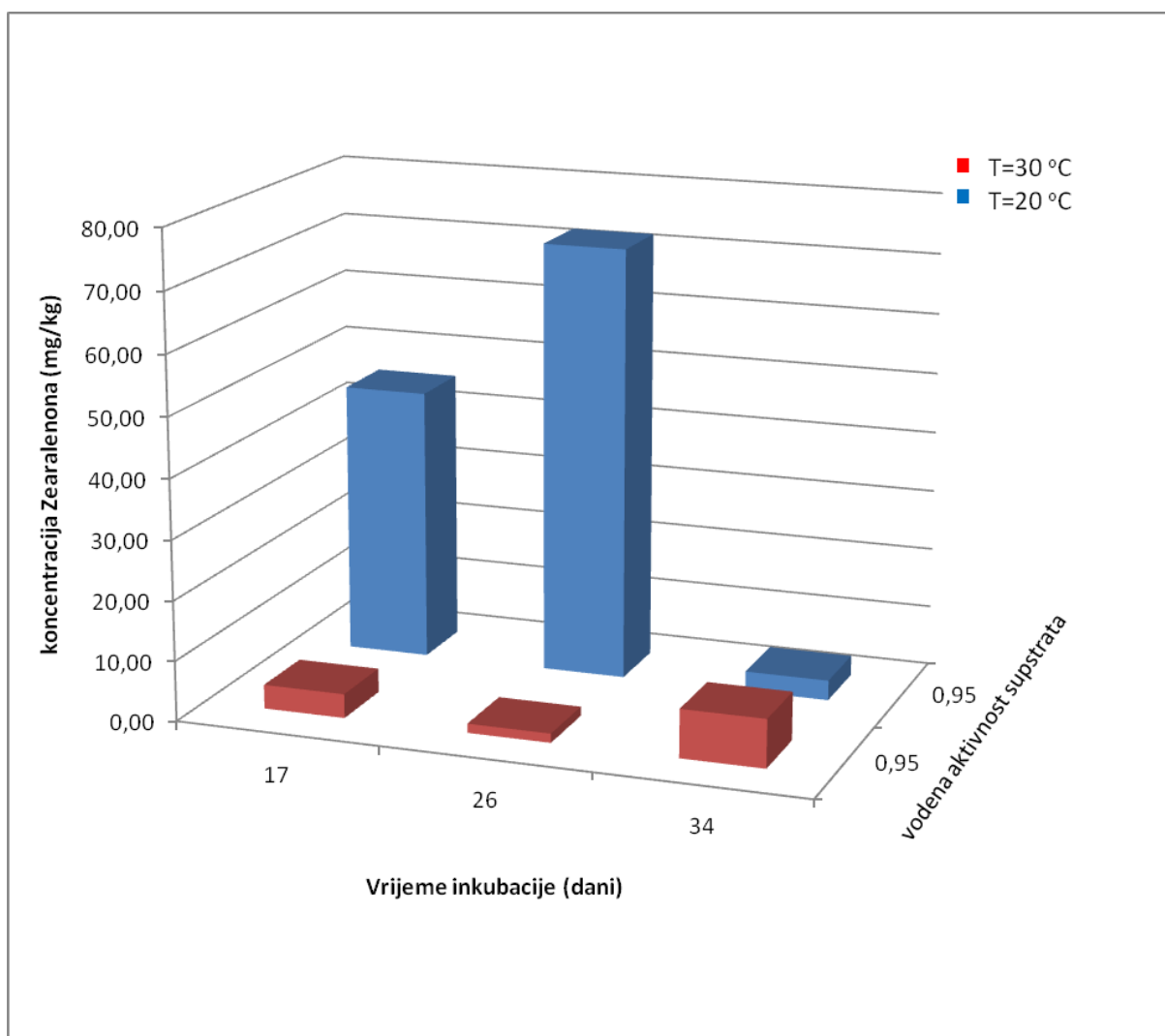
#### **Provedba**

Uzorci frakcije slada obrađeni su kromatografom Perkin-Elmer (Waltham, MA) serija 200 HPLC u kombinaciji sa Perkin – Elmer uređajem za automatsko uzimanje uzoraka. Korištene su Supelco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) C18 kolona (125 × 4,6 mm i.d. , veličina čestica 5 µm) i Supelco C18 predkolona (20 × 4 mm, veličina čestica 5 µm). Korištene mobilne faze za gradijetno eluiranje faze A (voda) i faze B (methanol, LC stupnja čistoće, JT Baker, Phillipsburg, NY) sa sadržajem od 0,1 % mravlje kiseline. Protok kroz kolone je 250 µL/min, količina injektiranog uzorka je 20 µL, a temperature kolone je konstantna 45 °C. Korišteni detector je API 2000 trolni – četveropolni maseni spektrometar (Applied Biosystems / MDSSCIEX, Foster city, CA) u kombinaciji sa turbo izbojem iona (ESI). Za prikupljanje i obradu podataka korišten je računalni program Analyst software Verion 1.4.2 , te je sučelje izvršeno u negativnom ionizacijskom modu prema Cavaliere, Foglia, Pastorini, Samper i Lagana (2005). Sve analize podataka su provedena pomoću kompjuterskog programa Statistica 8.0 i Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, Wa).

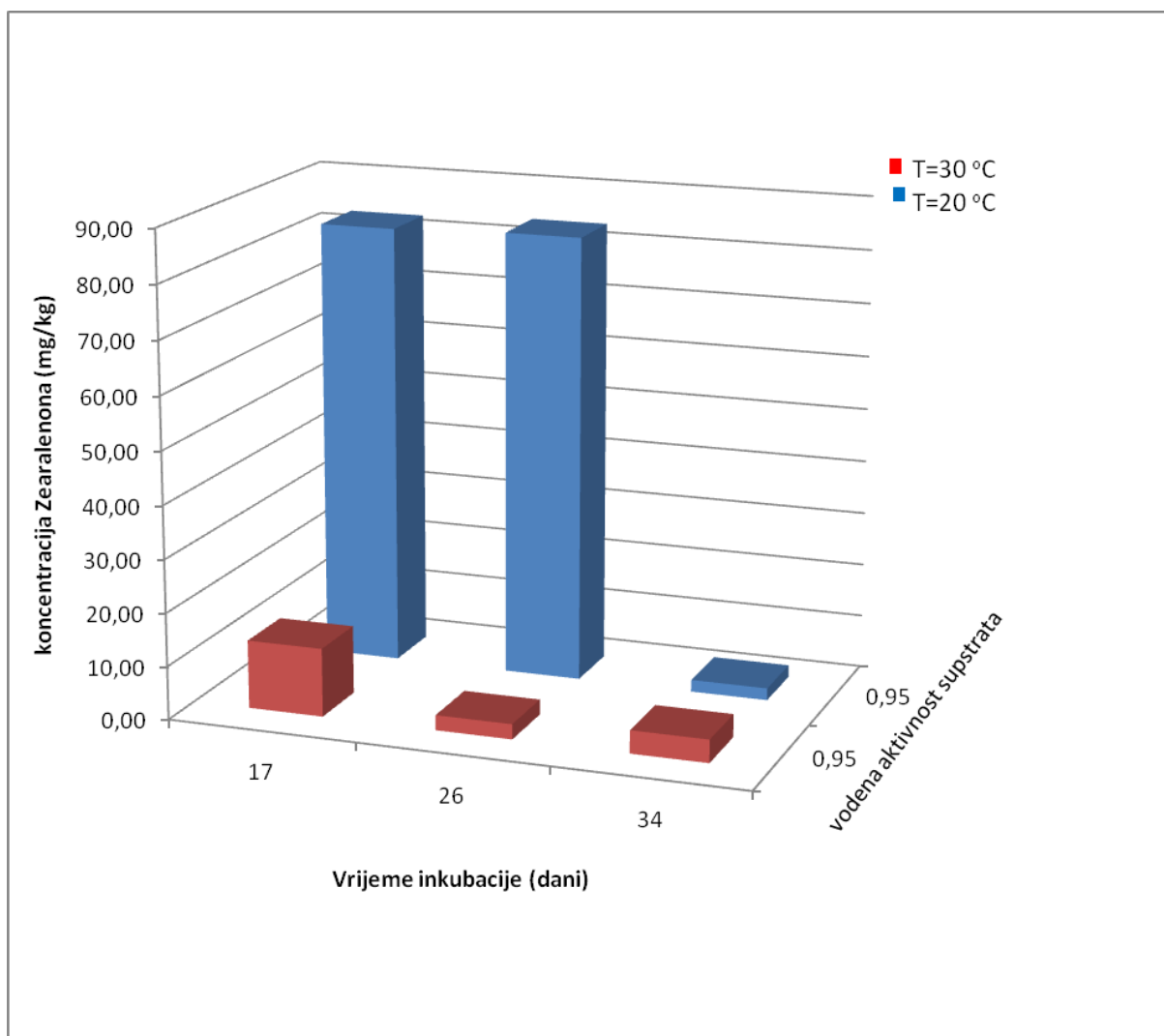
## **4.REZULTATI**

#### 4.1. Toksikološka analiza pojedinih frakcija slada

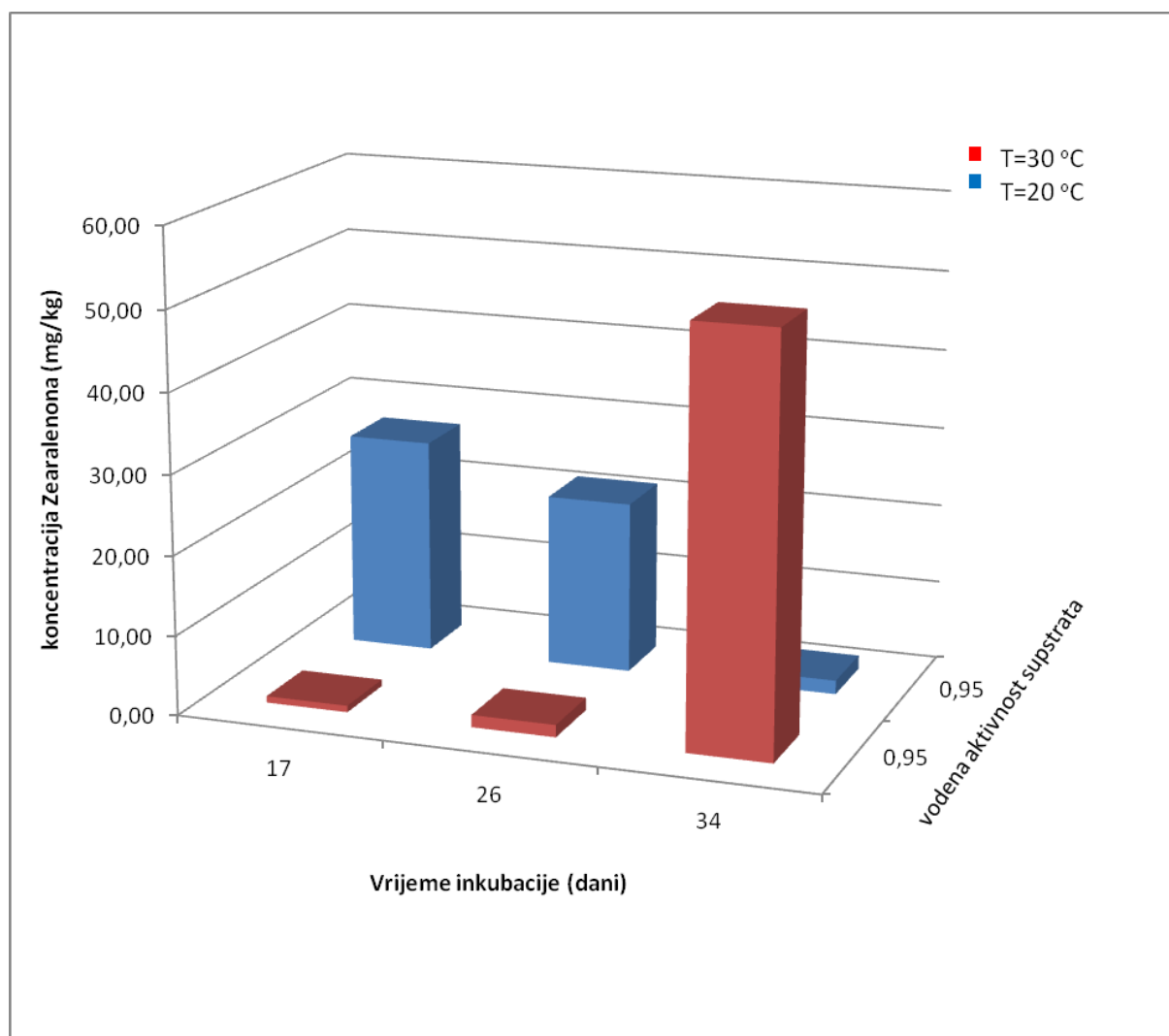
Na slikama 6 - 8 zbirno je prikazan utjecaj svih ispitivanih parametara (vrijeme inkubacije, temperatura i aktivitet vode) na koncentraciju zearalenona u sladu i njegovim frakcijama



**Slika 6** Koncentracija zearalenona u sladnim klicama u ovisnosti o vremenu inkubacije plijesni *Fusarium graminearuma*, temperature inkubacije i vodene aktivnosti supstrata



**Slika 7** Koncentracija zearalenona u sladoj krupici (mekinjama) u ovisnosti o vremenu inkubacije plijesni *Fusarium graminearum*, temperature inkubacije i vodene aktivnosti supstrata



**Slika 8** Koncentracija zearalenona u sladnom brašnu u ovisnosti o vremenu inkubacije plijesni *Fusarium graminearum*, temperature inkubacije i vodene aktivnosti supstrata

## **5.RASPRAVA**

## 5.1. Toksikološka analiza pojedinih frakcija slada

Postupkom određivanja recovery-a nije detektiran zearalenon u neinokuliranom ječmenom sladu što znači da je 86,7% mikotoksina dobiveno iz uzoraka što je uskladu sa EC normom 401/2006 (EC,2006a).

Prema podacima iz literature (Scudamore & Patel,2009.), većina kombinacija u uvjetima uzgoja *Fusarium graminearum*, stvaraju značajno više koncentracije zearalenona u mekinjama i klicama nego u brašnu ječmenog slada. Nakon što su uzorci inkubirani 17 dana na temperaturi od 20 °C, mekinje su sadržavale 83 ppm-a, klice 45,44 ppm-a i brašno 27,13 ppm-a zearalenona. 34-ti dan koncentracija zearalenona značajno se smanjila u svim frakcijama, eliminirajući značajnu razliku između mekinja i brašna. Isto tako, na temperaturi od 30 °C rezultati su pokazali znatno povećanje koncentracije zearalenona u brašnu za 34-ti dan, nadmašivši razine koncentracije zearalenona za klice i mekinje nekoliko puta. Općenito, niža temperatura inkubacije stimulira stvaranje zearalenona u svim frakcijama ječmenog slada. Utvrđene razlike u koncentracijama zearalenona između uzoraka ječmenog slada inkubiranih na temperaturama od 20 i 30 °C, te različitom vremenu inkubacije su vrlo značajne u većini slučajeva. Martins & Martins (2002.) objavili su o sličnom učinku temperature na akumulaciju zearalenona u kukuruzu cijepljenom s *Fusarium graminearum*. Međutim, u ovom radu nakon 34 dana inkubacije na temperaturi od 30 °C koncentracija zearalenona u brašnu je 51,68 ppm što je značajno više nego što li je određena pri nižoj temperaturi. To znači da mekinje i klice također sadržavaju više zearalenona na temelju ovog skupa u uvjetima uzgoja, iako razlike nisu dostigle statistički značajnu razliku. Nagli pad koncentracije zearalenona u brašnu, mekinjama i klicama na temperaturi od 20 °C u odnosu na temperaturu od 30 °C za vrijeme inkubacije od 34 dana može se manifestirati kao analitička slabost. Naime, ako je zearalenon metaboliziran u neki drugi oblik (npr.  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ - zearalenol, zearalenon i zearalenol glikozid i zearalenon sulfat (Vendl,Berth Hiller, Crews & Krska,2009)) njih se nije moglo detektirati sa HPLC/MS. Osim toga, nesterilni uvjeti tijekom proizvodnje slada podrazumjevaju prisutnost konkurentnih mikroorganizama koji bi mogli utjecati na povećan metabolizam zearalenona. Koncentracija zearalenona u svim frakcijama je povećana na temperaturi od 30 °C za vrijeme inkubacije od 34 dana. Visoke razine u brašnu vjerovatno su posljedica velikog gljivičnog prodora u endosperm, što se može objasniti s obzirom na obilje hranjivih tvari i poticajnom učinku zearalenona na aktivnost  $\alpha$ -amilaze i  $\beta$ -glukozidaze.



## **6.ZAKLJUČCI**

Temeljem dobivenih rezultata iz ovog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. pri nižoj temperaturi i kraćem vremenu inkubacije ( $t_i$ ) u sladnom brašnu izmjerene su više vrijednosti koncentracije ZEA, osim u slučaju inkubacije na višoj temperaturi inkubacije, a pri dužem vremenu inkubacije ( $t_i=34$  dana)
2. na višoj temperaturi inkubacije, a pri dužem vremenu inkubacije ( $t_i=34$  dana) pri vodenoj aktivnosti supstrata ( $a_w=0,95$ ) dolazi do značajnog porasta koncentracije ZEA u sladnom brašnu
3. kod mekinja (krupice) je uočljiva izrazito veća koncentracija ZEA pri nižoj temperaturi inkubacije, dok je pri uzgoju na višoj temperaturi inkubacije uočljiv pad koncentracije ZEA s produžavanjem vremena inkubacije
4. kod sladnih klica je također ustanovljena značajno veća koncentracija ZEA pri uzgoju na nižoj temperaturi inkubacije i kraćem vremenu inkubacije, izuzev kod uzgoja ( $t_i=34$  dana) gdje je koncentracija ZEA nešto viša ( $t_i=34$  dana i  $T_i=30$  °C)
5. uvjeti skladištenja imaju velik utjecaj na koncentraciju mikotoksina ZEA u komercijalno relevantnim frakcijama slada
6. promjenom uvjeta skladištenja možemo utjecati na smanjenje koncentracija ZEA u sladu i njegovim frakcijama

## **7.LITERATURA**

- Beattie, S., Schwarz, P. B., Horsley, R., Barr, J., & Casper, H. H: The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. *Journal of Food Protection*, 61, 103–106, 1998.
- Bechtel, D. B., Kaleikau, L. A., Gaines, R. L., & Seitz, L. M. (1985). The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry*, 62,191–197.
- Bewley JD, Black M: *Seeds, Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York, 1985.
- Boeira LS, Bryce JH, Stewart GG, Flannigan B: Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeasts growth to *Fusarium* mycotoxins zerealenone, deoxynivalenol and fumonisin B1. *Journal of the Internatinal of the Biodetermination and Biodegradation society* 50:69-81, 2002.
- Bottalico A: *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 80:85-103, 1998.
- Briggs DE, McGuinness G: Microbes on barley grains. *Journal of the Institute of Brewing*, 99:24, 1993.
- Cavaglieri LR, Keller KM, Pereya CM, Gonzalez Pereya ML, Alonso VA, Rojo FG, Dalcero AM, Rosa CAR: Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. *Journal of Stored Products Research* 45:147-150, 2009.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., & Lagana, A: Development of a multiresidue method for analysis of major *Fusarium* mycotoxins in corn meal using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2085–2093, 2005.
- Cheeke PR: Mycotoxins in cereal grains and supplements. In: *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*, Cheeke, P.R. (ed.), Interstate Publishers, Inc, Danville, IL, 87-136, 1998.
- Doohan, F. M., Brennan, J., & Cooke, B. M: Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109,755–768, 2003.
- Duraković S: *Specijalna mikrobiologija*. Duriex, Zagreb, Hrvatska. , str. 137-142, 2000.
- European Commission : Regulation No. 401. Official Journal of European Union L70:12–34, 2006 a
- European Commission : Regulation No. 576. Official Journal of European Union L229:7–9, 2006 b.
- European Commission : Regulation No. 1126. Official Journal of European Union L255:14–17,2006.
- Flannigan B: *The microbiology of barley and malt*. U *Brewing Microbiology* 1<sup>st</sup> Ed. Elsevier Applied Science, London, NY, 1987.

- Fu, Y. F., Han, Y. Z., Zhao, D. G., & Meng, F. J.: Zearalenone and flower bud formation in thin-cell layers of *Nicotiana tabacum* L.. *Plant Growth Regulation*, 30,271–274, 2000.
- Gaćeša S: *Tehnologija slada sa sirovinama za tehnologiju piva*. Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 1979.
- 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, Šarkanj B, Klapac T, Krstanović V: Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on *Fusarium graminearum* growing conditions . *Food Chemistry* 129, 329-332, 2011.
- 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. U Proceedings Congress European. Brewing Convention 16, 35-46, 1977.
- Hope, R., Aldred, D., & Magan, N: Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F.graminearum* on wheat grain. Letters in *Applied Microbiology*, 40, 295–300, 2005.
- Kocić-Tanackov SD, Škrinjar MM, Grujić OS, Pejin JD: Fungal growth during malting of barley. *APTEFF*, 36,1-266, 2005.
- Krstanović V, Klapac 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.
- Lee, U. S., Jang, H. S., Tanaka, T., Oh, Y. J., Cho, C. M., & Ueno, Y: Effect of milling on decontamination of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in Korean wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35,126–129, 1987.
- Logrieco A, Bottalico A, Mule GA, Moretti G, Perrone: Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109:645-667, 2003.
- Mankevičiene A, Butkute B, Gaurilčikiene I, Dabkevičius Z, Supreniene S: Risk assesment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains, *Food Control*, 22, 970-976, 2011.
- Marić V: *Biotehnologija i sirovine*. Stručna i poslovna knjiga, Zagreb, 2000.
- Martins, M. L., & Martins, H. M: Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, 79,315–318, 2002.

- Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: *Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani*. Narodne novine 146/12, 2012.
- Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommision: Brautechnische Analysenmethoden Band I. MEBAK, Freising-Weihenstephan, 1997.
- Murkovic, M., Gailhofer, M., Steiner, W., & Pfannhauser, W: Formation of zearalenone on wheat contaminated with *Fusarium graminearum* under controlled conditions. Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und Forschung A, 204, 39–42, 1997.
- Ožegović I, Pepeljnjak S: *Mikotoksikoze*. Školska knjiga, Zagreb, pp. 65, 1995.
- Papandoupoulou A, Wheaton L, Muller R: The control of selected microorganism during the malting process. *Journal of The Institute of Brewing* 106:179-188, 1999.
- Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Šegvić Klarić M: Ochratoxin a and zearalenon: cereals and feed contamination in Croatia (1977-2007) and influence on animal and human health, *Krmiva* 50, 147-1, 2008.
- Perkowski J, Kiecana I, Kaczmarek Z: Natural occurrence and distribution of *Fusarium* toxins in contaminated barley cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 331-339, 2003.
- Rennie, H., & Ball, K: The influence of malt storage on wort separation. *Journal of the Institute of Brewing*, 85, 247–249, 1979.
- Salas B, Steffenson BJ, Casper HH, Tacke B, Prom LK, Fetch TG Jr, Schwarz PB: *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease*, 83, 667-674, 1999.
- Schwarz PB, Casper HH, Barr J, Musial M: Impact of *Fusarium* head blight on the malting and brewing quality of barley. *Cereal Research Community* 25:813-814, 1997.
- Schwarz PB, Casper HH, Beattie S: Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53, 121-127, 1995.
- Schwarz PB, Schwarz JG, Zhou A, Prom LK, Steffenson BJ: Effect of *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* infection on barley and malt quality. *Mon. Schr. Brauwiss.* 54, 55-53, 2001.
- Scudamore, K. A., & Patel, S: *Fusarium* mycotoxins in milling streams from the commercial milling of maize imported to the UK, and relevance to current legislation. *Food Additives and Contaminants A*, 26, 744–753, 2009.
- Smith J, Moss M: *Mycotoxins formation, analysis and significance*. John Wiley & Sons, New York, 1985.

- Solarska E: Study on cause of *Fusarium* cone tip blight. U *Scientific Commission CICH IHB-IHGC, International Hop Grower's Convention*. 95-97. Tettngang, Germany, 2007.
- Šegvić Klaric´ , M., Pepeljnjak, S., Cvetnic´ , Z., & Kosalec, I: Comparison between ELISA and TLC/HPLC methods for determination of zearalenone and ochratoxin A in food and feed. *Krmiva*, 50, 235–244, 2008.
- Teich AH: Epidemiology of Wheat Scab Caused by *Fusarium* spp. U *Topics in Secondary Metabolism, Taxonomy and Pathogenicity*. Chelkowski, J. Ed., Elsevier, 1989.
- Trigo-Stockli, D. M., Deyoe, C. W., Satumbaga, R. F., & Pedersen, J. R: Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled fractions of wheat. *Cereal Chemistry*, 73, 388–391, 1996.
- Trucksess MW , Pohland EE: *Mycotoxin protocols. Humana*. Press Inc, New Jersey, 2001.
- Tuomi T, Laakso S, Rosenqvist H: Plant hormones in fungi and bacteria from malting barley. *Journal of Institute of. Brewing* 101:351-357, 1995.
- Van Nierop SNE, Rautenbach M: The impact of microorganisms on barley and malt quality - a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64, 69-78, 2006.
- Vicam : Zearala Test instructions manual. Watertown: Vicam, 1998.
- Vendl, O., Berthiller, F., Crews, C., & Krska, R: Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cerealbased food by LC–MS–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395,1347–1354, 2009.
- Vendl, O., Crews, C., MacDonald, S., Krska, R., & Berthiller, F: Occurrence of free and conjugated *Fusarium* mycotoxins in cereal-based food. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(8), 1148–1152, 2010.
- Wolf-Hall CE: Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology* 119:89-94, 2007.
- Zinedine A, Manes J: Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed in Morocco. *Food Control*, 20, 334-344, 2009.
- Zinedine A, Soriano HM, Molto JC, Manes J: Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18, 2007.