

# Prijelaz ergot alkaloida iz raži u proizvode mljevenja i kruh

---

Andrašek, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:109:121062>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



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

**Andrašek Iva**

**PRIJELAZ ERGOT ALKALOIDA IZ RAŽI U PROIZVODE MLJEVENJA I  
KRUH**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, listopad, 2017.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za biokemiju i toksikologiju  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Opasnosti vezane uz hranu  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 29. lipnja 2017.  
**Mentor:** doc. dr. sc. *Bojan Šarkanj*  
**Komentor:** izv. prof. dr. sc. Marko Jukić  
**Pomoć pri izradi:** Ana Šušak, dipl. ing. i dr.sc. Tihomir Kovač

### Prijelaz ergot alkaloida iz raži u proizvode mljevenja i kruh

*Andrašek Iva, 320-DI*

#### Sažetak:

Ergot alkaloidi su mikotoksini koje proizvodi plijesan *Claviceps purpurea*, ali ga mogu proizvesti i druge plijesni te neke biljke. Najčešće se nalaze na raži iako su detektirani i u ostalim žitaricama. Mljevenjem i prosijavanjem raži dobije se brašno, koje za razliku od pšeničnog brašna ima manju količinu glutena. Raženo tijesto se može proizvesti direktnim, indirektnim i kombiniranim postupkom, pri čemu se indirektnim postupkom dobije ujednačena kakvoća proizvoda. U ovom diplomskom radu analizirana je koncentracija ergot alkaloida u krupici, mekinjama, brašnu, tijestu i kruhu proizvedenima direktnim i indirektnim postupkom. Uzorci su analizirani na LC-MS/MS uređaju, nakon čega je provedena kvalitativna i kvantitativna analiza podataka. Rezultati su pokazali da je koncentracija ergot alkaloida veća kod tijesta proizvedenog direktnim postupkom nego kod tijesta proizvedenog indirektnim postupkom. Sukladno tome ima i 36 % manje ukupnih ergot alkaloida u konačnom proizvodu, kruhu, kod indirektnog zamjesa u odnosu na direktni zamjes. Osim toga, kiselo tijesto značajno utječe na povećanje otpora žvakanju, čvrstoću i omjer h/d (omjer visine i širine sredine kruha) u odnosu na tijesto s direktnim zamjesom.

**Ključne riječi:** Ergot alkaloidi, *Claviceps purpurea*, brašno, kruh, LC-MS/MS

**Rad sadrži:** 48 stranica  
31 slika  
7 tablica  
0 priloga  
48 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

1.	prof. dr. sc. <i>Tomislav Klapac</i>	predsjednik
2.	doc. dr. sc. <i>Bojan Šarkanj</i>	član-mentor
3.	Izv. prof. dr. sc. Marko Jukić	član-komentor
4.	prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić	zamjena člana

**Datum obrane:** 13. listopada 2017.

**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 applied chemistry and ecology  
Subdepartment of biochemistry and toxicology  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Foodborne hazards

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on July 29, 2017.

**Mentor:** *Bojan Šarkanj*, PhD, assistant prof.

**mentor** Marko Jukić, PhD, associate prof.

**Technical assistance:** Ana Šušak, M.Sc., Tihomir Kovač, PhD

### Transfer of ergot alkaloids from rye to grinding produces and bread

*Andrašek Iva, 320-DI*

#### Summary:

Ergot alkaloids are mycotoxins produced by *Claviceps purpurea* but they can also be produced by other molds and plants. They are most commonly found on rye although they can also be detected on other cereals. Milling of rye, produces flour, which, unlike wheat flour, has a lower amount of gluten. The rye dough can be produced by direct, indirect or combined processes, whereby the indirect technique gives a product of uniform quality. In this thesis the concentration of ergot alkaloids in the grits, bran, flour, dough and bread produced by direct and indirect process was analyzed. The samples were analyzed by the LC-MS/MS, after which a qualitative and quantitative data analysis was performed. The results showed that the concentration of ergot alkaloids is higher in dough produced by the direct process. Accordingly, there was 36% less total ergot alkaloids in the final bread produced by indirect process compared to direct procedure. In addition, the sourdough significantly increases the chewiness, hardness and height/width ratio as compared to the direct process.

**Key words:** ergot alkaloids, *Claviceps purpurea*, flour, bread, LC-MS/MS

**Thesis contains:** 48 pages  
31 figures  
7 tables  
0 supplements  
48 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | <i>Tomislav Klavec</i> , PhD, prof.           | chair person  |
| 2. | <i>Bojan Šarkanj</i> , PhD, assistant prof.   | supervisor    |
| 3. | <i>Marko Jukić</i> , PhD, associate prof.     | co-supervisor |
| 4. | <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> , PhD, prof. | stand-in      |

**Defense date:** October 13, 2017.

**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 mentoru doc. dr. sc. Bojanu Šarkanju, komentoru izv. prof. dr. sc. Marku Jukiću i suradnicima na savjetima i pomoći tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se svojim kolegicama, kolegama i prijateljima koji su uvijek bili uz mene i spremni pomoći te bez kojih cijeli tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako.

Najveća zahvala mojim roditeljima, bratu te bakama i djedu na podršci i svemu što su mi pružili tijekom mog studiranja.

## Sadržaj

1	UVOD .....	1
2	TEORIJSKI DIO .....	3
2.1	Ergot alkaloidi .....	4
2.2	Pojavnost ergot alkaloida u hrani .....	7
2.3	Proizvodnja brašna i kruha od raži.....	7
2.4	UHPLC-ESI-MS/MS .....	10
2.4.1	Masena spektrometrija .....	11
2.4.2	ESI ionizacija .....	12
2.4.3	Princip rada trostrukog kvadrupola.....	13
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1	Zadatak.....	16
3.2	Materijali i metode .....	16
3.2.1	Uzorci, oprema i kemikalije .....	16
3.2.2	Priprema uzoraka .....	17
3.2.3	Analiza uzoraka i uvjeti rada LC-MS/MS-a.....	21
3.2.4	Određivanje teksturalnih svojstava .....	21
3.2.5	Određivanje boje sredine kruha .....	22
3.2.6	Određivanje specifičnog volumena kruha i h/d omjera .....	24
4	Rezultati i rasprava .....	25
4.1	Teksturalna svojstva .....	35
4.2	Specifični volumen i omjer h/d .....	37
4.3	Određivanje boje sredine kruha .....	38
5	Zaključci .....	43
6	literatura.....	45



## Popis oznaka, kratica i simbola

(U)HPLC	<i>(Ultra) high performance/pressure liquid chromatography</i> , (Ultra) visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> , Europska agencija za sigurnost hrane
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> , Ionizacija elektroraspršenjem
LC-MS/MS	Metoda tekućinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom
LOD	<i>Limit of detection</i> , Limit detekcije
LOQ	<i>Limit of quantification</i> , Limit kvantifikacije
MS	<i>Mass spectrometry</i> , Masena spektrometrija





Mikotoksini (*mykes* – grč. gljiva, *toxikon* – grč. otrov) su sekundarni metaboliti gljiva koji imaju toksično djelovanje i kontaminiraju hranu tijekom rasta ili skladištenja. Do njihovog povećanog nakupljanja dolazi u uvjetima koji izazivaju stres biljci (vremenski ekstremi, oštećenje kukcima...) (Bennett i Klich, 2003). Česti su onečišćivači hrane, uzrokuju brojne štete u gospodarstvu, različite bolesti (najčešće putem hrane ili respiratornim putem). Ovisno o načinu unosa u organizam, mikotoksikoze mogu biti primarne i sekundarne. Mikotoksini se često povezuju uz bolesti, pošto dokazano uzrokuju karcinogenost, hepatotoksičnost, imunotoksičnost, nefrotoksičnost, dermatotoksičnost, fenotoksičnost, teratogenost, hematotoksičnost, itd (Bennett i Klich, 2003). U pravilu su otporni na povišenu temperaturu i stabilni su. Njihova biosinteza ovisi o klimatskim uvjetima i fizikalno-kemijskim čimbenicima. Kako bi se spriječila moguća kontaminacija hrane mikotoksinima, potrebno je poznavati preventivne mjere za sprječavanje kontaminacije (fizikalne, kemijske i biološke), mjere uzgoja, žetve i pohrane žitarica te mjere u proizvodnom procesu, transportu i skladištenju (Šarkanj i sur., 2010).

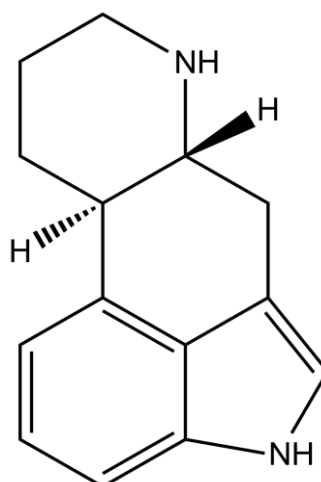
Mikotoksini se mogu podijeliti u dvije skupine s obzirom na trenutnu legislativu: regulirani (aflatoksini, deoksinivalenol, ohratoksin A, zearalenon, fumonizini, patulin, citrinin) i neregulirani, ali od posebnog značaja za EFSA-u (*Alternaria* toksini, trihoteceni (osim deoksinivalenola), eniatini, bovericin, moniliformin, kulmorin, ergot alkaloidi). Ergot alkaloidi se dijele u podskupine: agroklavin, kanoklavin, ergin, ergokornin, ergokristin, ergokriptin, ergometrin, ergozin, ergotamin... te njihovi -inini epimeri. Proizvode ih gljive roda *Claviceps* (najčešće *Claviceps purpurea*) (EFSA, 2012).

Ovaj rad opisuje postupak dobivanja raženog brašna i raženog kruha te postupak određivanja ergot alkaloida u navedenim proizvodima.

## **2 TEORIJSKI DIO**

## 2.1 ERGOT ALKALOIDI

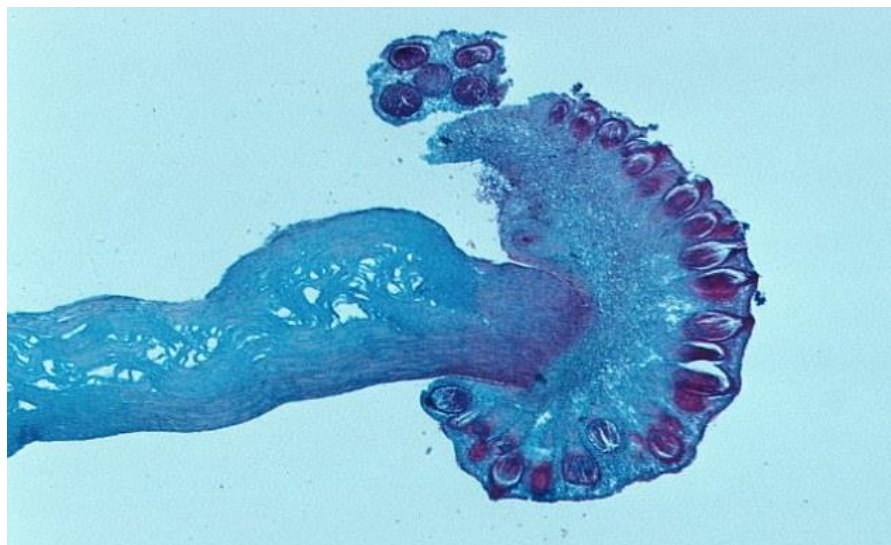
Ergot alkaloidi su jedna od skupina mikotoksina. Po kemijskom sastavu su amidi terpenoidnog derivata indola – D-lizerginske kiseline, koja nastaje od spoja ergolina (**Slika 1**), koji predstavlja osnovnu tetracikličku strukturu svih ergot alkaloida.



**Slika 1** Ergolin

Većina ergot alkaloida pokazuje slično djelovanje, no razlikuju se u toksičnosti. Neki djeluju na receptore neurotransmitera, neki reduciraju razinu prolaktina, dok neki djeluju kao agonisti za dopamin. Najznačajniji simptomi trovanja ergot alkaloidima su gubitak apetita, gangrene uzrokovane začepljenjem žila (pogotovo zimi), hipernervoza, halucinacije, reproduktivni poremećaji (Bennett i Klich, 2003; Peraica i sur., 1999).

Produkt su metabolizma gljiva - najčešće porodice *Clavicipitaceae*, ali su prisutni i u biljnoj porodici *Convolvulaceae* u vrstama *Ipomoea violacea* i *Turbina corymbosa* (Tudzynski i sur., 2001). *Claviceps purpurea* (Slika 2) je najraširenija vrsta roda *Claviceps* te inficira više od 400 biljnih vrsta, a među njima i neke žitarice poput raži, pšenice, ječma, prosa i zobi. Sadrži brojne alkaloide, od kojih neki imaju veliku medicinsku važnost, dok neki uzrokuju štetne fiziološke efekte (EFSA, 2012; 2017).



Slika 2 *Claviceps purpurea* (Gray, 2015)

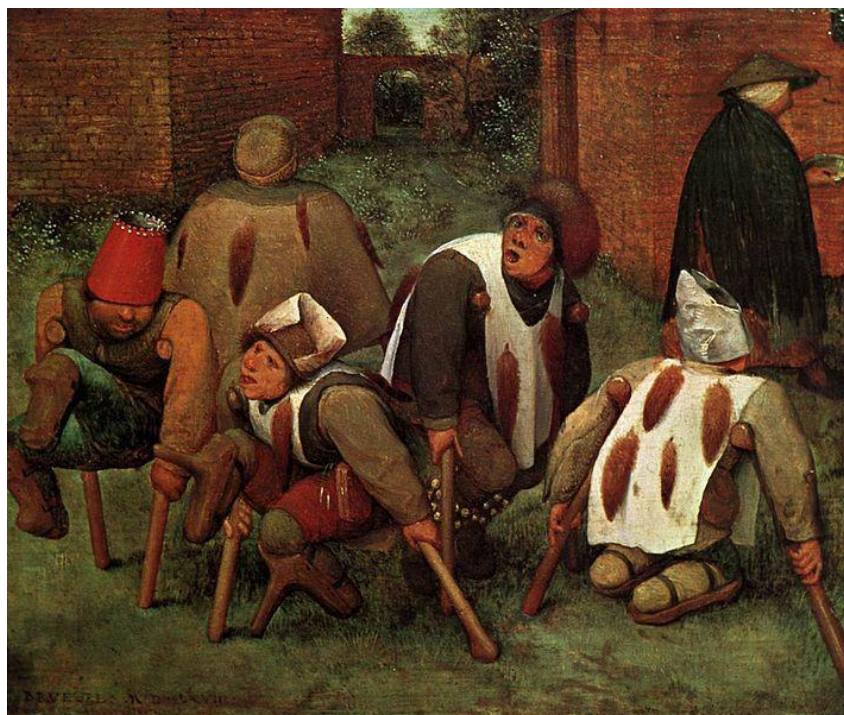
Do danas je izolirano više od 50 različitih ergot alkaloida iz sklerocija gljiva. Neki od njih su farmakološki inaktivni (imaju nastavak -inin), ali u vodenoj otopini izomeriziraju, pri čemu nastaje ravnotežna otopina s aktivnim derivatima lizerginske kiseline (ima nastavak -in). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) istražuje ergot alkaloide podrijetlom iz porodice *Claviceps purpurea* (ergometrin, ergozin, ergotamin, ergokriptin, ergokristin, ergokornin) za koje se i traže detaljniji podaci o pojavnosti na području Europske unije (EFSA, 2012) te izloženosti ljudi i životinja istima (EFSA, 2017).

Gljivične strukture vrste *Claviceps* zamjenjuju zrnca na klasu i vidljiva su kao veliki tamni sklerociji (Slika 4) te se nazivaju ergot sklerociji u kojima su visoke koncentracije ergot alkaloida. Najznačajniji ergot alkaloidi su ergozin, ergometrin, ergotamin, ergokristin, ergokriptin, ergokornin i njihovi izomeri (nastavak –inin) (EFSA, 2012; 2017).



Slika 4 Ergot sklerociji na klasu raži (Evolva, 2017)

U srednjem vijeku su ergot sklerocije, odnosno kontaminirana raž, bila uzrok epidemija ergotizma pod nazivom „Muka Sv. Antuna“ ili „Sveta vatra“, jer su njezini simptomi smatrani božjom kaznom. Simptomi ove bolesti bili su gubitak udova, gangrena, bolne konvulzije, halucinacije, osjećaj gorenja kože, itd. (Slika 3) (Peraica i sur., 1999).



Slika 3 Posljedice ergotizma – gubitak udova (Scotnevins, 2015)

## 2.2 POJAVNOST ERGOT ALKALOIDA U HRANI

Prisutnost ergot alkaloida u zrnu žitarica u određenoj mjeri je povezana s prisutnošću ergot sklerocija. S obzirom da ergot alkaloidi mogu biti prisutni i u prašini iz ergot sklerocija adsorbirano na žitarice, ova povezanost nije apsolutna (EFSA, 2017). Stoga je važno postaviti maksimalne razine ergot sklerocija, odnosno ograničenja za stavljanje hrane na tržište ili zahtijevati povlačenje hrane s povišenim razinama s tržišta. Potrebno je odrediti u kojoj je fazi prerade maksimalna razina ergot sklerocija, kako bi se primijenile odgovarajuće operacije poput čišćenja i sortiranja u svrhu smanjenja istih. Maksimalna razina odnosi se na neobrađene žitarice namijenjene za „prvu fazu prerade“, koja uključuje bilo koju fizikalnu ili termičku obradu (osim sušenja) (EC, 2015).

Di Mavungu i sur. (2011) su utvrdili da su ergot alkaloidi bili prisutni u 52 % ražene stočne hrane, 95 % ražene hrane, 34 % pšenične stočne hrane, 86 % pšenične hrane, 76 % prehrambenih proizvoda iz trgovina s ukupnom količinom alkaloida u rasponu od 1 do 12340  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Analizirano je nekoliko različitih uzoraka pomoću LC-MS/MS metode (raženi kruh (19 uzoraka), raženo brašno (21), pšenično brašno (21), pšenične mekinje (18), pšenični kruh (21), keksi (30), integralno brašno (14), integralne pahuljice (12), integralni kruh (17) s područja EU (Di Mavungu i sur., 2011).

## 2.3 PROIZVODNJA BRAŠNA I KRUHA OD RAŽI

Za razliku od pšeničnog brašna, brašno od raži sadrži manju količinu glutena i ukupnog sadržaja proteina pa je raženi kruh gušći i žilaviji nego pšenični. Škrob raži je sklon enzimskoj razgradnji, naročito na povišenim temperaturama, zbog čega sredina kruha postaje vlažna, a tijesto omekšava. Sadrži više vlage, duže zadržava svježinu, tamniji je, ima slabije razvijenu sredinu i nije šupljikav kao pšenični kruh. Razlikuju se tri vrste postupaka proizvodnje raženih tijesta: direktan, indirektan i kombinirani postupak pripreme tijesta. Za proizvodnju tijesta direktnim postupkom koristi se raženo brašno, voda, sol, kvasac i sredstvo za zakiseljavanje. Indirektan postupak pripreme uključuje brašno, vodu, sol i kiselo tijesto, čime se osigurava sigurna proizvodnja i ujednačena kakvoća proizvoda. Kod kombiniranog postupka količina kiseline potrebna za proizvodnju tijesta potječe jednim dijelom od sredstva za zakiseljavanje (regulira kiselost), a drugim dijelom od kiselog tijesta

(daje aromu). Mijesenje tijesta se provodi pomoću mijesilica, a vrijeme mijesenja je veoma kratko zbog male količine dodataka te se ne provodi intenzivno. Nakon toga, tijesto ide na odmaranje, obradu, odvagu i oblikovanje te slijedi fermentacija. Temperatura fermentacije je obično do 40 °C, a vrijeme se razlikuje od kruha do kruha, a najčešće iznosi 20 do 50 minuta. Kada fermentacija završi, tijesto ide na pečenje, pri temperaturi od 200 - 270 °C. Boja kore ovisi o: temperaturi pečenja, trajanju pečenja, relativnoj vlažnosti zraka, mješavini brašna, pH vrijednosti tijesta (Schünemann i Treu, 2012).

Kiselost tijesta se primjenjuje kako bi se dobio proizvod boljih tehnoloških, mikrobioloških, nutritivnih i organoleptičkih svojstava. Bakterije mliječno-kiselog vrenja, s obzirom na način fermentiranja glukoze, mogu biti homofermentativne (fermentiraju glukozu do mliječne kiseline (90%) i ostalih metabolita) i heterofermentativne (fermentiraju glukozu do mliječne kiseline (50%), etanola, octene kiseline i drugih metabolita). Osim navedenih metabolita, mogu nastati i etanol, aldehidi, esteri te druge hlapljive i ne hlapljive organske kiseline. Najznačajnije bakterije mliječno-kiselog vrenja su one roda *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*...). Na proces fermentacije kiselog tijesta utječu temperatura, upotrijebljena starter kultura, supstrat i prinos tijesta.



U Republici Hrvatskoj raž je slabo zastupljena ratarska kultura, manjeg gospodarskog značaja. Uzgaja se u brdskim i planinskim predjelima, na tek nešto više od 1500 - 2000 ha, a prinosi, uz odgovarajuće uvjete (vlaga iznad 14 % i u punoj zrelosti) mogu iznositi i iznad 5 t ha<sup>-1</sup> (Međimurec, 2016). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, proizvodnja raži u Hrvatskoj u 2014. godini iznosi 1302,49 ha, odnosno 0,3 % od ukupno zasijanih žitarica.



**Slika 5** Raž – od klasa do kruha (Medved, 2016; Pasarić, 2014; Shipton Mill, 2013)

## 2.4 UHPLC-ESI-MS/MS

Spajanjem (U)HPLC ((ultra)visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija) i MS (masena spektrometrija) štedi se vrijeme te je olakšano detektiranje kompleksnijih spojeva (Taleuzzaman i sur., 2015). LC-MS sustavi omogućuju analizu spojeva koji se ne mogu analizirati plinskom kromatografijom vezanom za spektrometar masa te analizu termički nestabilnih analita (Budimir, 2016).

Kod UHPLC-MS/MS-a (metoda (ultra) visokodjelotvorne/visokotlačne tekućinske kromatografije tandemске masene spektrometrije), uređaji i programi LC-a i MS-a su ukomponirani i integrirani u jedan sustav koji daje visoku selektivnost i osjetljivost. Sama kvaliteta podataka je poboljšana jer su pikovi oštiji, niži je šum, a shodno tome LOD (limit detekcije) i LOQ (limit kvantifikacije) su sniženi (Pratima i sur., 2013).



**Slika 6** Shematski prikaz rada MS/MS sustava (prilagođeno iz Madeira i Florêncio, 2012)

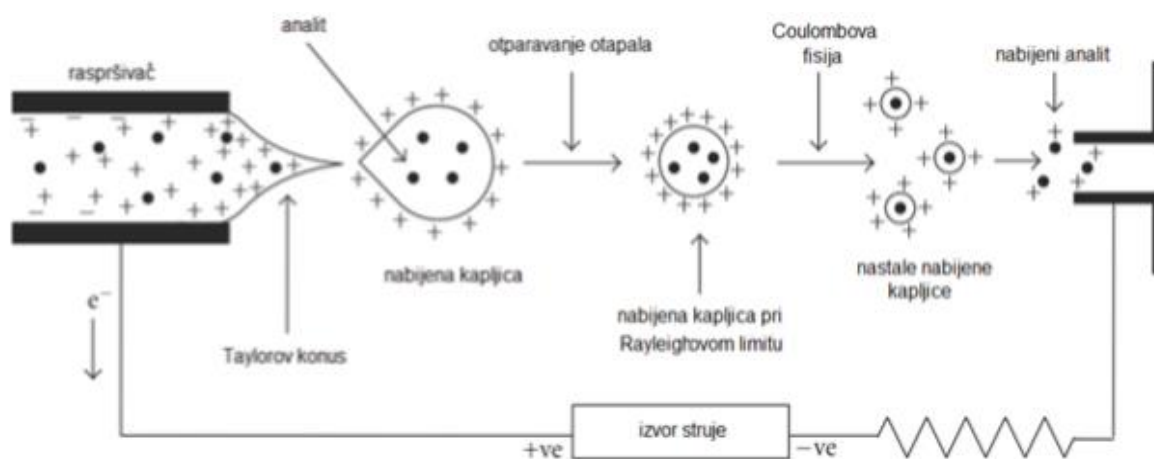
### 2.4.1 Masena spektrometrija

MS (masena spektrometrija) je najraširenija analitička tehnika. Bez obzira koji je analitički problem u pitanju, masena spektrometrija nastoji identificirati spoj iz molekularne mase njegovih sastavnih dijelova. Informacija dobivena iz mase može biti dovoljna za identifikaciju elemenata i određivanje molekularne formule analita, ali za apsolutnu potvrdu potrebno je napraviti dodatne NMR studije. Izotopi pomažu u određivanju koji elementi doprinose takvoj formuli i procjeni broja atoma pojedinog elementa. Fragmentacija iona može dati informacije o ionskoj strukturi. MS određuje (prosječni) broj i redoslijed sastavnih dijelova makromolekula (Gross, 2004).

MS je analitička metoda temeljena na analiziranju molekula prema omjeru masa i naboja ( $m/z$ ). Molekule se prevode u ione koji se mogu fragmentirati na druge ionske fragmente. Sam uređaj se sastoji od ionskog izvora gdje nastaju ioni, analizatora masa koji nastale ione razdvaja prema omjeru  $m/z$ , detektora i sustava za obradu podataka. Rezultati se mogu prikazivati grafički spektrom masa koji prikazuje ovisnost relativnog intenziteta iona o njihovom  $m/z$  omjeru ili u obliku kromatograma za pojedinu specifičnu tranziciju, odnosno za pojedini analit (Budimir, 2016).

### 2.4.2 ESI ionizacija

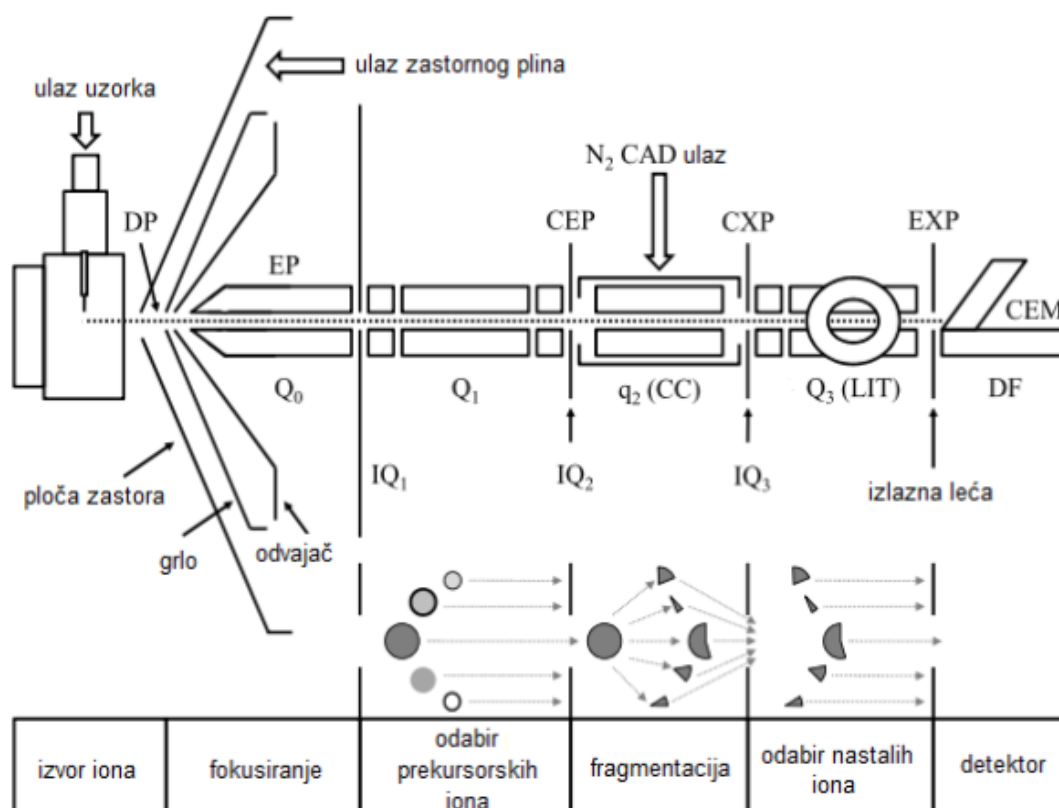
U vezanim LC-MS sustavima najčešći oblik ionizacije molekula je ESI (engl. - Electrospray ionization, Ionizacija elektroraspršenjem). Pomoću ESI (**Slika 7**) moguće je prevesti masivne, termolabilne i nehlapljive molekule u plinsku fazu kako bi se mogle analizirati u spektrometru masa. Zbog toga mu je glavna primjena u analizi bioloških molekula koje je teško prevesti u plinovito stanje i ionizirati. Ionizacija može biti pozitivna ili negativna, što ovisi o naponu na kapilari i elektrodi, ali i o svojstvima molekule koju želimo ionizirati. Optimalna temperatura je iznad 100 °C, pri atmosferskom tlaku i u struji inertnog plina (najčešće dušika ili argona) (Budimir, 2016).



**Slika 7** Princip rada ESI sustava (prilagođeno iz Banerjee i Matumdar, 2012)

### 2.4.3 Princip rada trostrukog kvadrupola

Trostruki kvadrupoli (QqQ, engl. Triple Quadrupole) mogu skenirati cijeli raspon mase (10 – 30000 Da) u desetinki sekunde i jedni su od najčešće korištenih za kvantifikaciju analita, a od svih izvedbi MS-a imaju najbolji LOD te se najčešće koriste za kvantifikaciju poznatih analita. Svaki kvadrupol se sastoji od četiri cilindrične elektrode koje su spojene u dva para jednako nabijenih elektroda. Suprotne elektrode su povezane i istovremeno imaju isti potencijal. Ion koji kroz otvor uđe u kvadrupol je privučen prema elektrodi sa suprotnim nabojem, a zbog brzine izmjene naboja, ion spiralnom putanjom nastavlja do sljedeće elektrode sve do zadnjeg kvadrupola, odnosno dok ne dođu do detektora (**Slika 8**) (Varga, 2010; Šarkanj, 2014). Prvi kvadrupol ( $Q_1$ ) odabire prekursorske ione analita koji se propušta dalje, a ostali analiti se neutraliziraju u dodiru s elektrodama, zbog čega ne prolaze do detektora. Drugi kvadrupol ( $q_2$ ) djeluje kao kolizijska ćelija (CC) u kojoj se kolizijski plin (najčešće dušik ili argon) sudara sa ionima propuštenim s prvog kvadrupola čime nastaju njihovi fragmenti. Nakon fragmentacije iona u drugom kvadrupolu uspostavlja se napon koji ih pokreće dalje na izlaznom dijelu kolizijske ćelije (CXP – eng. cell exit potential) i u ovisnosti o njihovom m/z omjeru se razdvajaju u trećem kvadrupolu ( $Q_3$ ) (Varga, 2010). Treći kvadrupol može biti različite izvedbe. Ako je MS/MS uređaj s trostrukim kvadrupolima (QqQ), u njemu se odvajaju i usmjeravaju specifični fragmenti traženog analita te se oni propuštaju do detektora, gdje se prate barem dvije tranzicije po analitu (za kvalitativnu i kvantitativnu potvrdu analita preko praćenja retencijskog vremena i specifičnog omjera signala za kvantifikaciju i kvalitativnu potvrdu). Treći kvadrupol ( $Q_3$ ) može biti i hvatač iona u koji se skupe svi fragmenti iz  $q_2$  što omogućuje bolju informaciju o analitu, moguće prepoznavanje nepoznatih analita, ali nešto nižu preciznost u kvantificiranju. U hvataču iona se dobije cijeli fragmentacijski spektar prekursorskih iona. Ioni koji prođu kroz zadnji kvadrupol udaraju po površini kontinuiranog množitelja elektrona (CEM – eng. Continuous Electron Multiplier), prelaze preko deflektora (DF) do detektora, a on te udarce broji po sekundi (cps – eng. counts per second) za određeni odnos m/z (Varga, 2010; Šarkanj, 2014).



**Slika 8** Princip rada MS/MS uređaja (Šarkanj, 2014)

### **3 EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1 ZADATAK

Cilj ovog rada bio je odrediti u kojem postotku ergot alkaloidi prelaze iz raži u proizvode mljevenja raži (raženo brašno, ražena krupica te ražene posije). Također, da li način, odnosno duljina fermentacije (brza fermentacija – direktni postupak zamjesa i produljena fermentacija od 24 h – indirektni postupak zamjesa tijesta) i proces pečenja kruha utječu na prijelaz ergot alkaloida u konačni proizvod (kruh) i poluproizvode (tijesto nakon fermentacije).

### 3.2 MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1 Uzorci, oprema i kemikalije

Za potrebe istraživanja je nasumičnim odabirom odabrano 10 uzoraka raži, iz različitih hrvatskih županija (Osječko-baranjska, Zagrebačka, Varaždinska, Bjelovarsko-bilogorska, Ličko-senjska, Zadarska, Splitsko-dalmatinska), žetve 2016. godine. Zrno je samljeveno na laboratorijskom mlinu IKA MF 10, nakon čega su se frakcije mekinja, krupice i brašna razdvojile pomoću vibrirajućih sita (Analysette, 3 PRO, Fritsch). Za izradu tijesta, osim brašna od različitih uzoraka raži, potrebni su voda, sol, šećer, kvasac te, za izradu kiselog tijesta, starter kultura *Lactobacillus plantarum*. Za analizu mikotoksina koristile su se sljedeće kemikalije HPLC ili MS čistoće: metanol (Merck), acetonitril (Merck), octena kiselina (Merck) i standard ergot alkaloida (Mix 6, Biopure).



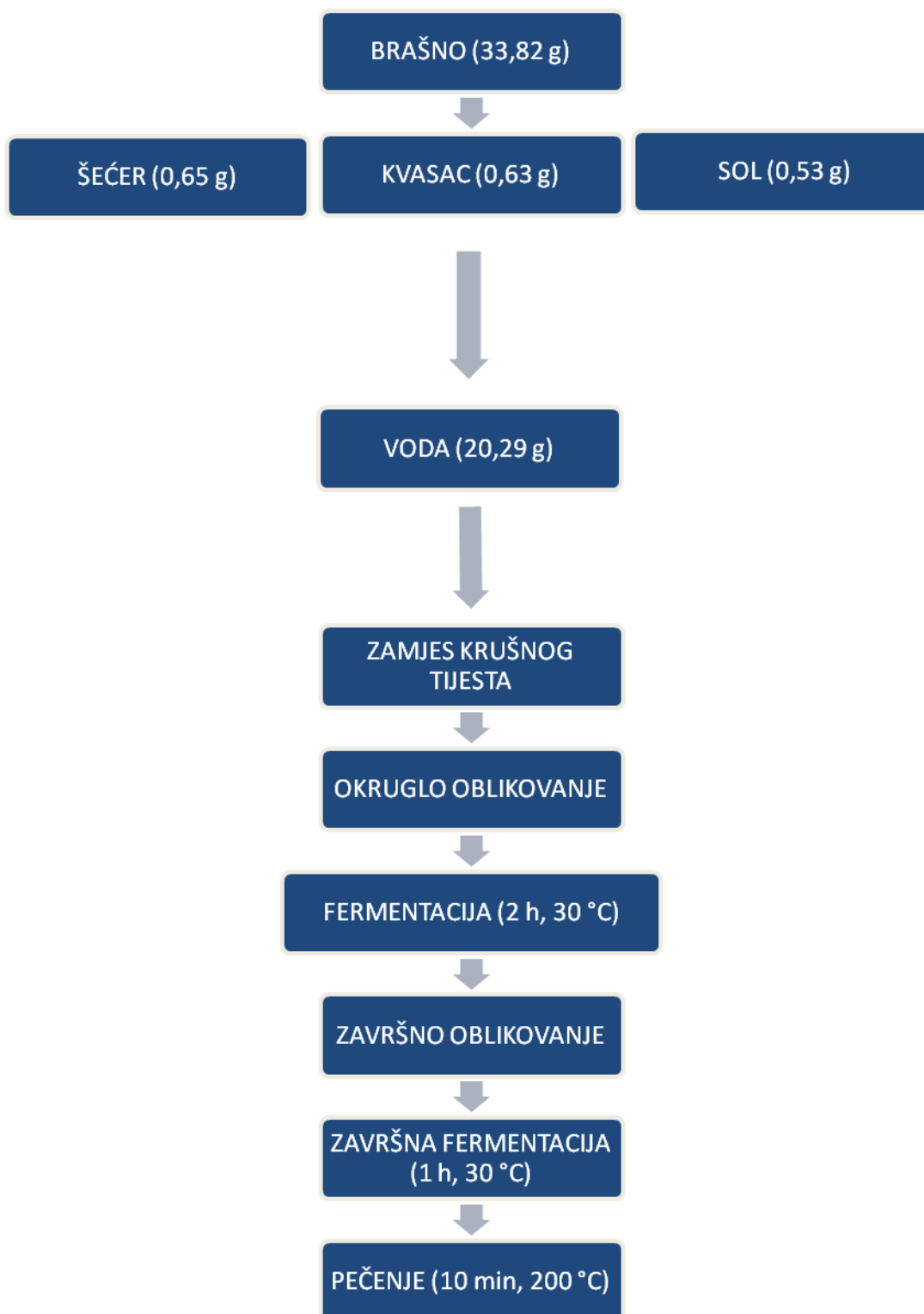
### 3.2.2 Priprema uzoraka

Raženo brašno dobiveno je mljevenjem i prosijavanjem usitnjenih uzoraka raži na vibracijskoj tresilici za sita (Analysette 3 PRO, Fritsch), pri čemu su korištena tri sita promjera 1,60 mm, 800  $\mu\text{m}$  i 250  $\mu\text{m}$ , amplitude trešnje 3,0 mm u trajanju od 5 minuta (**Slika 9**).

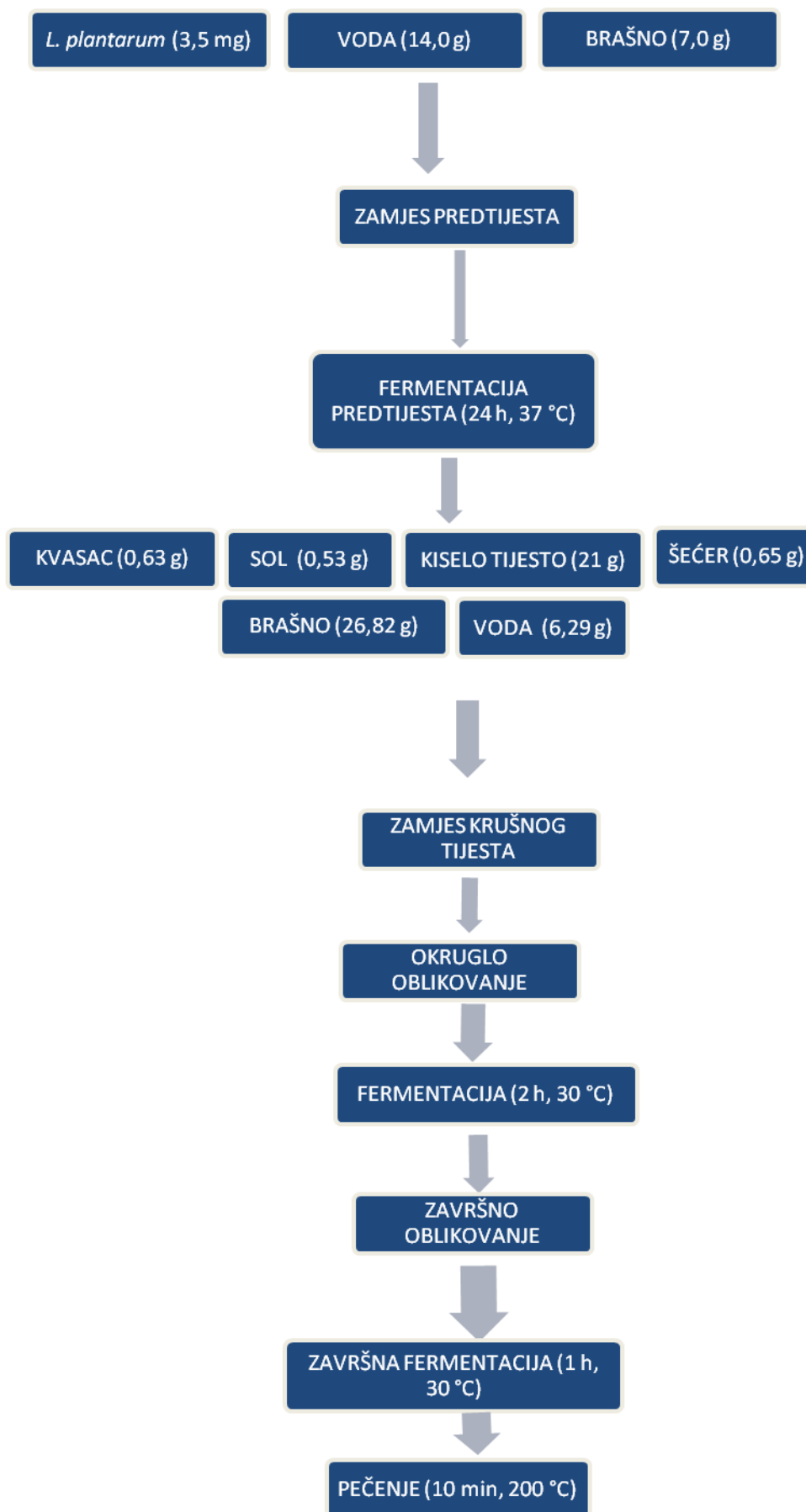


**Slika 9** Laboratorijska tresilica s vibrirajućim sitima (Analysette 3 PRO, Fritsch)

Za izradu raženog tijesta i laboratorijsko probno pečenje kruha korištena je mikro metoda (Shogren i Finney, 1984). Sirovine za pripremu tijesta prema indirektnom postupku su raženo brašno, pekarski kvasac, šećer, kuhinjska sol, voda i starter kultura *Lactobacillus plantarum* trgovačkog naziva Flora-Pan L-75 (Lallemand, Saint-Simon, Francuska), a količina pojedinih sirovina i postupak pripreme prikazani su shematski. Dio sirovina se koristi za izradu predtijesta, tj. predfermenta (brašno, voda, starter kultura *L. plantarum*). Predtijesto zatim ide na fermentaciju u trajanju 24 sata nakon čega služi kao jedna od komponenata za izradu krušnog tijesta. Kod direktnog postupka se sve sirovine predviđene za zamjes (brašno, voda, kvasac, kuhinjska sol, šećer) miješaju istovremeno. Zamjes sirovina provodi se u mjesilici miksografa (National Mfg. Co., Lincoln, NE) u trajanju od 3 minute. Nakon miješanja, tijesto se ručno oblikuje i razdijeli na 3 dijela, okruglo oblikuje i stavi u plastičnu posudu te na fermentaciju u trajanju od 2 sata pri 30 °C. Kada završi prva fermentacija, jedan po jedan komad tijesta se stanji valjkom za tijesto, koje se zatim preklopi tri puta, okrene za 90°, stanji valjkom za tijesto i urola se, tako da se dobiju cilindri (veknice). Veknice se stave u kalup za pečenje i na završnu fermentaciju (1 sat, 30 °C), nakon koje slijedi pečenje u pećnici (uz doziranje vodene pare) na 200 °C, 10 minuta (**Slika 10, Slika 11**).



**Slika 10** Shematski prikaz proizvodnje raženog tijesta (direktni postupak)



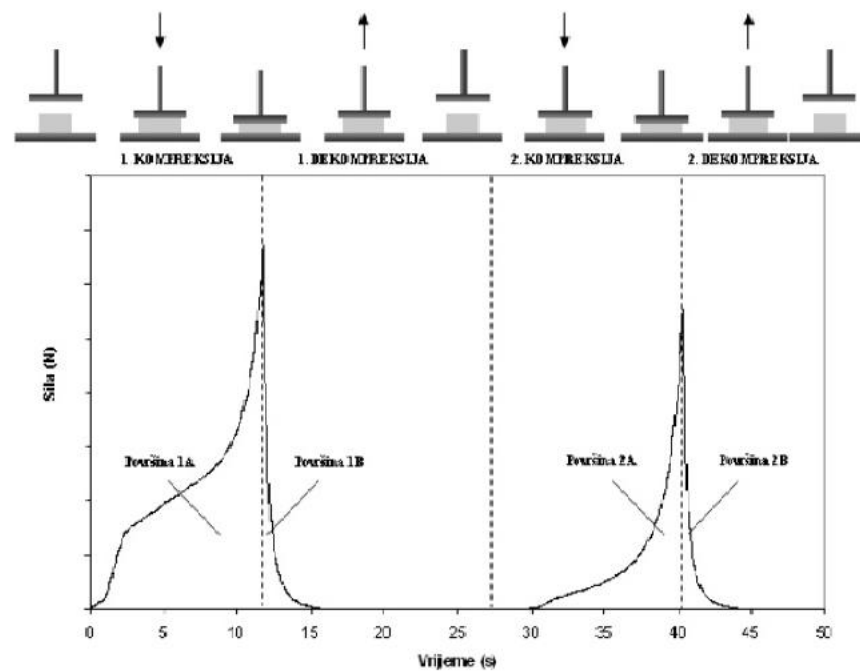
**Slika 11** Shematski prikaz proizvodnje raženog tijesta (indirektni postupak)

### 3.2.3 Analiza uzoraka i uvjeti rada LC-MS/MS-a

Analiza uzoraka je provedena na AB Sciex QTrap® 5500 LC-MS/MS uređaju (Foster City, CA) koji je opremljen s TurbolonSpray ionizacijom elektroraspršenjem (ESI) te UHPLC sistemom Agilent serije 1290 (Waldbronn, Njemačka). Optimalni „razrijedi i mjeri“ pristup je opisan u radu Malachová i sur. (2014.) prema kojemu su podešeni radni uvjeti. Analiti su razdvojeni na reverzno-faznoj koloni Gemini® C18 (150 x 4.6 mm, Phenomenex) s veličinom čestica od 4,6  $\mu\text{m}$  i pripadajućom predkolonom. Detaljne postavke UHPLC-a i MS-a su opisane u radu Malachove i sur. (2014). Kvalitativna analiza podataka odrađena je u Analyst 1.6.3. softveru, dok je kvantifikacija odrađena u Multiquant 3.0.2. softveru.

### 3.2.4 Određivanje teksturalnih svojstava

Za određivanje teksturalnog profila uzoraka korišten je uređaj TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Velika Britanija), a dobiveni podaci su analizirani s Texture Exponent 32 softverom (verzija 3.0.5.0.) (**Slika 12**). Mjerenje se provodi tako da se iz sredine vekne kruha izrežu dva uzorka oblika kocke (1 cm x 1 cm x 1 cm) koji se podvrgavaju dvostrukoj kompresiji cilindričnim nastavkom P/36R promjera 36 mm prema sljedećim parametrima: kalibracija visine 20 mm, brzina prije mjerenja 1 mm s<sup>-1</sup>, brzina mjerenja 1,7 mm s<sup>-1</sup>, brzina nakon mjerenja 5 mm s<sup>-1</sup>, dubina prodiranja cilindra 40 % (4 mm), vrijeme zadržavanja između dvije kompresije 5 s, potrebna sila za početni signal 5 g. Kada je sve podešeno, program zapisuje krivulju promjene sile potrebne za kompresiju uzorka u određenom vremenu prema parametrima podešenima prije analize. Nakon završetka mjerenja očitaju se čvrstoća (pokazuje visinu prvog pika (N ili g)), kohezivnost (snaga unutrašnjih veza materijala potrebnih da zadrže uzorak koherentnim pri deformaciji, definirana je omjerom površina ispod drugog i prvog pika), elastičnost (mjera oporavka uzorka od deformacije pri prvoj kompresiji, definirana je omjerom površine ispod krivulje tijekom prve dekompresije i površine ispod krivulje tijekom prve kompresije) i otpor žvakanju (energija potrebna za žvakanje uzorka, umnožak čvrstoće, kohezivnosti i odgođene elastičnosti (N ili g)).



**Slika 12** Tipična krivulja ispitivanja teksturalnog profila kruha metodom dvostruke kompresije

### 3.2.5 Određivanje boje sredine kruha

Boja sredine kruha određuje se kolorimetrom Chroma Meter Minolta CR-400 (**Slika 13**), metodom CIE 1976-Lab Color Space. Uređaj se sastoji od mjerne glave na kojoj se nalazi otvor mjernog promjera 8 mm, kroz koji pulsirajuća lampa baca difuzno svjetlo okomito na površinu uzorka.

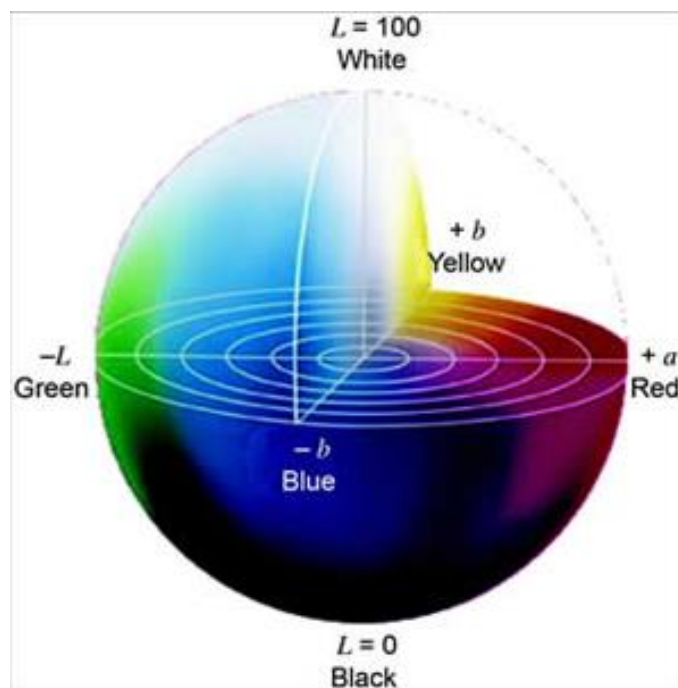


**Slika 13** Kolorimetar Chroma Meter Minolta CR-400 (Konica Minolta, 2017)

Boja je definirana pozicijom u trodimenzionalnom koordinatnom sustavu u kojem vrijedi:

- $L^*$  - vrijednosti daju ocjenu da li je nešto tamno ili svijetlo. Ako je  $L^* = 0$  tada je predmet crn, ako je  $L^* = 100$  tada je bijel;
- $a^*$  - vrijednost može biti pozitivna ili negativna; ako je pozitivna, tada je rezultat crvena boja, a ako je negativna tada je rezultat zelena boja;
- $b^*$  - vrijednost može također biti pozitivna ili negativna - ako je pozitivna, rezultat mjerenja je žuta boja, a ako je negativna tada je rezultat plava boja.

Boja se izražava u CIE-Lab parametrima kao:  $L^*$  (bijelo/crno),  $a^*$  (crveno/zeleno) i  $b^*$  (žuto/plavo) (**Slika 14**), a prije mjerenja uređaj je potrebno kalibrirati pomoću standardne bijele keramičke pločice (Maskan, 2001).



**Slika 14** CIE-Lab (ColorCodeHex, 2014)

### 3.2.6 Određivanje specifičnog volumena kruha i h/d omjera

Specifični volumen kruha ( $\text{g cm}^{-3}$ ) i omjer h/d određeni su pomoću laserskog uređaja Volscan Profiler (Stabler Micro Systems, Surrey, UK) (**Slika 15**). Omjer h/d ukazuje na oblik kruha (visoka vrijednost – loptasti kruh, niska vrijednost – pogačasti kruh). Određuje se mjerenjem visine i širine sredine vekne kruha i izračunavanjem njihovog omjera.



**Slika 15** Volscan Profiler - uređaj za određivanje volumena kruha i peciva (Spectrometer Technologies, 2017)



## **4    REZULTATI I RASPRAVA**

Analizom uzoraka frakcija raži i kruha proizvedenog od dobivenog raženog brašna, u ovom istraživanju detektirano je 16 ergot alkaloida: agroklaavin, kanoklaavin, ergin, ergokornin, ergokorninin, ergokristin, ergokristinin, ergokriptin, ergokriptinin, ergometrin, ergometrinin, ergozin, ergozinin, ergotamin, ergotaminin i paspalna kiselina. Prema EFSA - inim podacima, najznačajniji detektirani i kvantificirani ergot alkaloidi čije su koncentracije tražene za područje EU su: ergometrin, ergometrinin, ergozin, ergozinin, ergotamin, ergotaminin, ergokornin, ergokorninin, ergokriptin, ergokriptinin, ergokristin i ergokristinin. Limiti detekcije za najznačajnije EA su se kretali od 0,01 do 0,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dok je LOD za paspalnu kiselinu 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Postoji više publiciranih istraživanja o pojavnosti ergot alkaloida u različitim državama. Istraživanjem 34 uzoraka raženog brašna uzorkovanih u Danskoj u razdoblju od 2000. do 2005. godine detektirano je 10 ergot alkaloida (ergotamin, ergokristin, ergometrin, ergokornin, ergokriptin i njihovi –inin epimeri) HPLC-FLD metodom. Limiti detekcije za pojedine spojeve bili su u rasponu 0,2 – 1,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , pri čemu su ergot alkaloidi otkriveni u 32 od 34 uzorka u prosijeku 46  $\mu\text{g kg}^{-1}$  do maksimalnih 234  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Storm i sur., 2008). Istraživanje u Švicarskoj, provedeno je na 109 uzoraka kruha, brašna te pripravaka za dojenčad i djecu, koji sadrže pšenicu i raž, primjenom HPLC-FLD i HPLC-MS/MS metode. Detektirano je 16 ergot alkaloida (ergometrin, ergozin, ergotamin, ergokristin, ergostin, ergokornin, ergokristin, ergokriptin i njihovi –inin epimeri). Limiti detekcije su se kretali do 0,4 do 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Najveća koncentracija ergot alkaloida detektirana je u raženom brašnu (maksimalno, 519  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , median 172  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) i kruhu (maksimalno, 248  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , medijan 87  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Reinhard i sur., 2008). Lauber i sur. su 2005. godine usporedili koncentracije ukupnih ergot alkaloida u žitaricama (iz 2003. i 2004. godine) i proizvodima od raži pomoću HPLC-FLD metode. U uzorcima iz 2003. godine zabilježena je viša razina ergot alkaloida (maksimalan sadržaj 3280  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nego u uzorcima iz 2004. godine (maksimalan sadržaj 220  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), a razlike su bile prisutne zbog različitih klimatskih uvjeta tijekom tih dviju godina, zbog čega se preporuča redovita kontrola. Bavarska agencija za zdravlje i sigurnost hrane, izvijestila je 2006. godine u istraživanju o sadržaju ergot alkaloida u raženim proizvodima između 2004. i 2006. godine. Analizirano je 66 uzoraka LC-MS/MS-om, pri čemu je detektirano pet alkaloida (ergometrin, ergokornin, ergokriptin, ergokristin i ergotamin), a LOQ je iznosio 0,1 – 1,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Najveća količina ergot alkaloida određena je u raženom kruhu u koncentraciji od 258  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Burk i sur., 2006). Još jedno njemačko istraživanje o sadržaju ergot alkaloida provedeno je na 58 uzoraka sjemenki raži sakupljenih 2005. godine,

pri čemu je dobivena prosječna koncentracija od 397  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a najviše je detektirano ergotamina i ergokristina. Muller i sur. su 2009. godine proveli istraživanje na 39 uzoraka i proizvoda od raži (žetva 2006. i 2007. godine), pri čemu je detektirano 12 ergot alkaloida primjenom HPLC-FLD metode. Najviše alkaloida je određeno u grubo samljevenoj raži (740  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najznačajniji detektirani ergot alkaloidi su bili ergokristin i ergotamin (EFSA, 2012). Razine pojedinih EA u frakcijama brašna utvrđene u ovom istraživanju prikazane su u **Tablicama 1-3**, dok je suma svih EA i njihov omjer između frakcija brašna prikazan **Slikom 16**.

**Tablica 1** Koncentracija ergot alkaloida u raženom brašnu /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

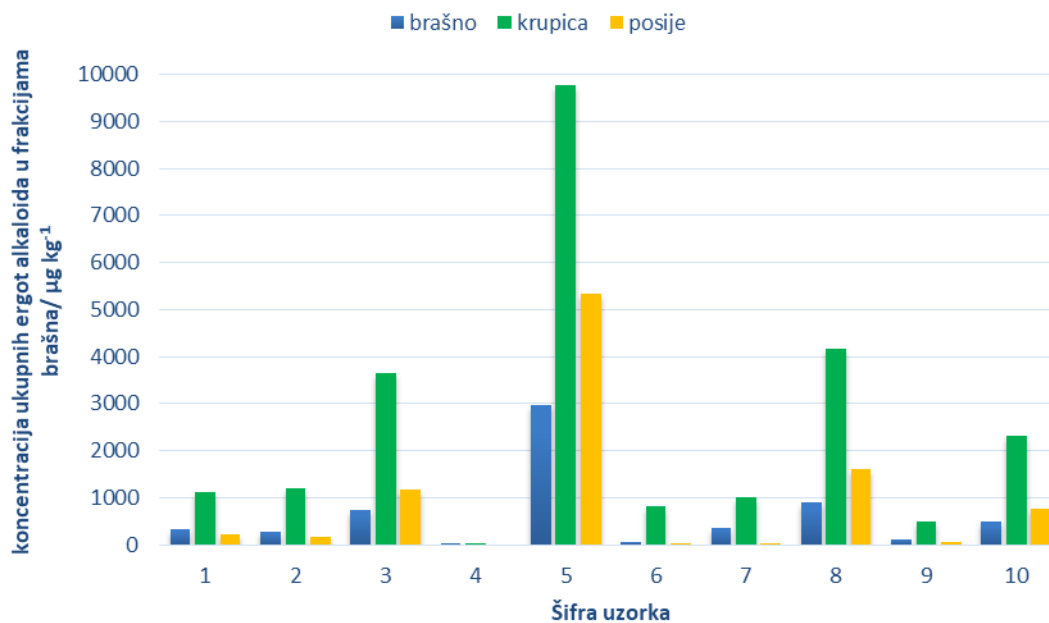
Šifra uzorka brašna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agroklavin	13,7	<LOD	3,17	<LOD	132	21,1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kanoklavin	1,44	1,87	6,65	<LOD	17,7	10,8	7,86	16,6	<LOD	3,38
Ergin	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	1,04	<LOQ	<LOD	0,46	<LOD	<LOQ
Ergokornin	<LOD	9,49	21,0	<LOD	21,7	<LOD	5,16	22,6	13,0	15,7
Ergokorninin	<LOQ	6,04	11,9	<LOD	11,8	<LOD	2,90	10,2	5,61	8,05
Ergokristin	45,3	39,0	123	<LOQ	365	9,06	45,8	146	<LOD	118
Ergokristinin	20,1	14,8	49,0	1,71	140	3,89	16,6	53,0	<LOD	45,1
Ergokriptin	43,3	28,3	43,7	<LOD	133	<LOD	24,8	94,7	22,3	21,3
Ergokriptinin	29,9	1,99	5,52	<LOD	8,25	<LOD	<LOQ	8,67	<LOQ	3,74
Ergometrin	<LOQ	64,1	141	<LOD	1456	32,3	141	175	14,7	36,8
Ergometrinin	<LOQ	6,8	18,1	<LOD	53,9	2,01	14,5	27,5	1,55	6,21
Ergozin	116	75,2	210	<LOD	398	8,99	75,4	227	45,4	148
Ergozinin	37,5	17,2	48,4	<LOD	190	2,61	17,4	57,0	9,25	37,2
Ergotamin	27,1	14,4	52,8	<LOD	157	3,61	18,1	71,0	<LOD	37,0
Ergotaminin	3,79	2,51	8,13	<LOD	21,8	<LOQ	2,67	9,98	<LOD	6,32
Paspalna kiselina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

**Tablica 2** Koncentracija ergot alkaloida u raženoj krupici /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka krupice	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agroklavin	7,08	<LOD	48,6	<LOD	452	23,5	<LOD	48,1	<LOD	23,5
Kanoklavin	1,87	10,5	18,9	<LOD	49,7	9,61	70,0	54,5	0,84	15,4
Ergin	0,55	0,74	1,87	<LOD	3,13	<LOQ	<LOQ	2,13	<LOD	0,59
Ergokornin	<LOD	66,5	54,5	<LOD	88,6	<LOD	11,1	82,6	15,9	102
Ergokorninin	<LOQ	45,4	36,1	<LOD	55,4	<LOD	7,34	53,4	9,05	58,5
Ergokristin	144	55,6	566	<LOD	981	118	136	552	<LOD	401
Ergokristinin	73,0	29,0	294	2,15	454	59,7	68,3	302	<LOQ	213
Ergokriptin	51,2	270	188	<LOD	550	<LOQ	52,1	324	68,2	122
Ergokriptinin	36,0	14,1	160	<LOD	63,4	<LOQ	4,02	30,3	<LOD	<LOD
Ergometrin	<LOQ	257	821	<LOD	4459	109	338	782	92,8	126
Ergometrinin	0,65	21,0	78,0	<LOD	130	12,7	43,0	113	10,2	22,1
Ergozin	305	309	906	<LOQ	1445	349	219	1219	214	849
Ergozinin	124	124	256	<LOD	970	96,9	72,0	427	75,5	238
Ergotamin	338	19,0	228	<LOD	481	50,6	57,1	236	<LOD	150
Ergotaminin	54,0	<LOD	45,9	<LOD	91,4	10,2	10,9	49,8	<LOD	26,0
Paspalna kiselina	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	2909	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD

**Tablica 3** Koncentracija ergot alkaloida u posijama raži /  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 

Šifra uzorka posija	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agroklavin	<LOD	<LOD	17,1	<LOD	973	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	12,0
Kanoklavin	<LOD	<LOD	21,9	<LOD	39,6	1,38	<LOQ	5,79	<LOD	5,99
Ergin	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	1,29	<LOD	<LOD	1,08	<LOD	<LOD
Ergokornin	<LOD	<LOQ	4,50	<LOD	19,1	<LOD	<LOD	68,9	<LOQ	3,26
Ergokorninin	<LOD	2,54	3,33	<LOD	17,5	<LOD	<LOD	44,1	1,22	3,68
Ergokristin	36,0	17,2	181	<LOD	379	<LOD	<LOD	195	<LOD	124
Ergokristinin	25,1	12,7	122	<LOD	254	<LOQ	<LOQ	120	<LOD	70,4
Ergokriptin	<LOQ	29,1	7,60	<LOD	245	<LOD	<LOD	240	13,8	9,31
Ergokriptinin	<LOQ	<LOD	2,42	<LOD	52,8	<LOD	<LOD	161	3,67	<LOQ
Ergometrin	<LOD	32,5	477	<LOD	2872	6,70	17,1	191	47,7	104
Ergometrinin	<LOD	2,32	42,0	<LOD	110	<LOQ	1,38	28,9	1,76	17,2
Ergozin	116	30,4	196	<LOD	799	<LOD	<LOD	293	<LOQ	252
Ergozinin	44,4	16,5	68,3	<LOD	461	<LOD	<LOD	123	1,26	99,6
Ergotamin	<LOD	9,69	63,1	<LOD	112	<LOD	<LOD	108	<LOD	57,8
Ergotaminin	<LOQ	1,58	14,8	<LOD	26,3	<LOD	<LOD	21,9	<LOD	13,2
Paspalna kiselina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD

**Slika 16** Koncentracija sume ergot alkaloida u frakcijama mljevenja raži ispitivanih uzoraka

Usporedbom ukupnih EA u frakcijama brašna najviše koncentracije su nađene u krupici, slijede posije dok su najniže koncentracije detektirane u frakciji brašna. Fajarado i suradnici (1995) su proveli slično istraživanje s većim brojem frakcija meljave pšenice (ukupno 19 frakcija), ali sa sličnom raspodjelom rezultata gdje su najviše količine nađena u frakciji krupice (promjer čestica <1600 μm i >250 μm, manje kod posija (>1600 μm) te najmanje kod brašna (<250 μm). U EFSA-inom izvješću rezultati su prikazani samo kao suma 12 najznačajnijih ergot alkaloida, te je njihova srednja koncentracija u žitaricama iznosila 227,2 μg kg<sup>-1</sup>, srednja koncentracija za raž kao sirovinu iznosila 3368 μg kg<sup>-1</sup>, dok je ona kod mljevenja raži za ljudsku potrošnju iznosila 198 μg kg<sup>-1</sup> (EFSA, 2017). Ukupna koncentracija ergot alkaloida u brašnu je u rasponu 27,2 – 3192 μg kg<sup>-1</sup>, prosječno ima najviše ergometrina (206 μg kg<sup>-1</sup>), a najmanje ergina (0,16 μg kg<sup>-1</sup>). Što se tiče sadržaja ergot alkaloida u krupici, raspon iznosi od 27,7 μg kg<sup>-1</sup> do 4358 μg kg<sup>-1</sup>, a također najviše ima ergometrina (699 μg kg<sup>-1</sup>) te najmanje ergina (0,91 μg kg<sup>-1</sup>). U mekinjama je ukupan sadržaj ergot alkaloida u rasponu od 25,4 μg kg<sup>-1</sup> do 6443 μg kg<sup>-1</sup>, s time da najviše ima ergometrina (374,91 μg kg<sup>-1</sup>), a najmanje ergina (0,24 μg kg<sup>-1</sup>). Navedene koncentracije ergot alkaloida u krupici i mekinjama u nekim slučajevima prekoračuju preporučene vrijednosti EFSA-e, a one iznose do 500 μg kg<sup>-1</sup> za neprerađene žitarice (EFSA, 2012; 2017).

U **Tablici 4** mogu se vidjeti koncentracije pojedinih EA u tijestu za kruh. Najviša koncentracija u pojedinog EA u tijestu je bila za ergometrin te je u uzorku 5 ona iznosila 639 μg kg<sup>-1</sup>. Da bi se koncentracije EA iz tijesta mogle usporediti s onima u brašnu, potrebno je preračunati na masu EA po masi brašna u tijestu, za što se koristi **Formula (1)**.

$$C(EA)_{\text{brašno}} = \frac{C(EA)_{\text{tijesto}} \cdot m(\text{tijesta})}{m(\text{brašna})} \quad (1)$$

Nakon proračuna i usporedbe razlike ukupnih EA u brašnu i tijestu vidljivo je da se nakon direktnog postupka zamjesa udio EA smanjuje u prosjeku za 16 % u odnosu na brašno (**Slika 17**). Takvo smanjenje moguće je zbog vezanja za staničnu stijenku kvasaca (Merrill i sur., 2007), kao što je slučaj s drugim mikotoksinima (Shetty i Jespersen, 2006), a s obzirom na ostale mikotoksine može se pretpostaviti da se ti vezani EA neće osloboditi u gastrointestinalnom traktu tijekom probave.

Pečenjem fermentiranog tijesta i dobivanjem kruha povećavaju se razine EA zbog promjene količine suhe tvari u kruhu u odnosu na tijesto (a ujedno i zbog specifičnog omjera kore naspram meke unutrašnjosti kruha kod malih vekni kruha od 10 g (Shogren i Finney, 1984)). Druga nespecifična pojava bila je povećanje koncentracije detektirane paspalne kiseline u kruhu dok je u tijestu za kruh nije bilo, odnosno njena koncentracija bila je ispod limita detekcije. Ne postoje druga istraživanja o prijenosu paspalne kiseline iz brašna u tijesto odnosno kruh, ali moguće je vezivanje u škrobu slično kao kod fumonizina (Rychlik i sur., 2014), dok se pečenjem oslobađa iz škroba. Drugi način koji objašnjava njen nastanak je enzimatska (Cagno i sur., 2003) i/ili termička degradacija viših EA koji imaju kompleksniju strukturu cijepanjem peptidne veze (Gänzle i sur., 2008) na poziciji 8 osnovne strukture lizergične kiseline te dobivanje kiselinskog ostatka odnosno paspalne kiseline. Od ostalih EA, ergometrin je ostao najviši pojedinačni EA s detektiranom koncentracijom od 2420  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , što se vidi u **Tablici 5**.

**Tablica 4** Koncentracija ergot alkaloida u tijestu za kruh od raženog brašna proizveden direktnim postupkom /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka tijesta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Agroklavin</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	45,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>Kanoklavin</b>	<LOD	<LOQ	1,13	<LOD	6,15	1,84	0,91	4,32	<LOD	0,63
<b>Ergin</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,87	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
<b>Ergokornin</b>	<LOD	6,96	6,62	<LOD	8,21	<LOD	<LOQ	8,25	4,02	6,60
<b>Ergokorninin</b>	<LOD	3,90	4,75	<LOD	5,41	<LOD	0,87	6,53	2,47	3,90
<b>Ergokristin</b>	19,5	23,3	58,2	<LOD	158	<LOQ	11,7	82,7	<LOD	76,4
<b>Ergokristinin</b>	8,24	8,77	21,2	<LOD	66,8	2,05	3,97	34,0	<LOD	30,6
<b>Ergokriptin</b>	22,3	15,5	20,9	<LOD	55,0	<LOD	7,47	34,9	7,05	13,6
<b>Ergokriptinin</b>	13,0	<LOQ	3,06	<LOD	3,83	<LOD	<LOD	3,16	<LOD	<LOQ
<b>Ergometrin</b>	<LOD	25,4	49,9	<LOD	639	14,2	39,9	108	<LOQ	22,4
<b>Ergometrinin</b>	<LOD	5,02	8,50	<LOD	64,5	0,91	6,47	17,8	0,72	3,58
<b>Ergozin</b>	16,3	14,5	26,9	<LOD	67,3	<LOQ	7,66	48,8	5,17	31,8
<b>Ergozinin</b>	11,5	10,2	19,0	<LOD	47,4	1,86	5,41	34,3	3,67	22,4
<b>Ergotamin</b>	8,80	7,27	15,3	<LOD	54,3	<LOQ	<LOQ	28,1	<LOD	10,8
<b>Ergotaminin</b>	1,35	<LOD	3,35	<LOD	10,8	<LOD	<LOD	6,07	<LOD	3,48
<b>Paspalna kiselina</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

**Tablica 5** Koncentracija ergot alkaloida u kruhu od raženog brašna proizvedenom direktnim postupkom /  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 

Šifra uzorka kruha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agroklavin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	126	4,69	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kanoklavin	0,46	<LOQ	4,02	<LOD	10,2	5,00	3,74	9,03	<LOD	0,99
Ergin	0,84	1,33	3,50	<LOD	5,35	0,48	0,87	4,12	<LOQ	0,72
Ergokornin	<LOD	6,09	7,50	<LOD	10,2	<LOD	<LOQ	8,18	4,09	4,77
Ergokorninin	<LOQ	4,75	6,14	<LOD	8,97	<LOD	2,18	8,09	2,96	3,97
Ergokristin	22,3	26,2	55,5	<LOD	179	7,55	19,5	83,5	<LOD	37,2
Ergokristinin	14,8	15,2	35,4	<LOD	107	4,55	12,8	49,3	<LOD	24,2
Ergokriptin	21,4	12,7	15,5	<LOD	73,2	<LOD	13,1	45,4	6,67	8,29
Ergokriptinin	20,8	<LOQ	2,86	<LOD	9,28	<LOD	<LOQ	5,71	<LOD	<LOQ
Ergometrin	9,29	135	463	<LOD	2420	54,6	381	688	23,4	89,6
Ergometrinin	<LOQ	4,32	10,2	<LOD	37,8	1,18	9,78	16,3	0,61	2,76
Ergozin	27,4	15,1	37,1	<LOD	85,8	6,98	15,0	55,6	7,77	19,6
Ergozinin	19,3	10,6	26,1	<LOD	60,3	4,93	10,6	39,1	5,49	13,8
Ergotamin	8,95	6,28	18,5	<LOD	56,6	3,56	6,20	27,8	<LOD	9,69
Ergotaminin	1,83	1,55	4,92	<LOD	14,3	1,01	1,37	7,87	<LOD	2,25
Paspalna kiselina	<LOD	<LOQ	2061	<LOD	5022	<LOQ	<LOQ	3108	<LOD	<LOQ

Indirektnim postupkom zamjesa tijesta zabilježeno je nešto slabije smanjenje ukupnih EA što se vidi u **Tablici 6** i na **Slici 15** te je ono iznosilo u prosjeku 14 %, što nije značajno različito u odnosu na direktni postupak zamjesa. Ergometrin je ostao EA s najvišom koncentracijom u tijestu, i vrlo visok u kruhu, dok je situacija s paspalnom kiselinom ista kao kod direktnog postupka zamjesa. Povećanje koncentracije paspalne kiseline je u slučaju indirektnog postupka bilo nešto niže te je iznosilo maksimalnih 2423  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (**Tablica 7**). Koncentracija ukupnih ergot alkaloida utvrđena kod tijesta proizvedenog direktnim i indirektnim postupkom pokazuje više koncentracije kod tijesta proizvedenog direktnim postupkom (304  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nego kod tijesta proizvedenog indirektnim postupkom (262  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Stoga se može pretpostaviti da je kod produljene fermentacije (indirektnog postupka zamjesa) došlo do vezanja ergot alkaloida za stanice kvasca (Pfiliegler i sur., 2015.) ili laktobacila (Franco i sur., 2011.), kao što je potvrđeno za druge mikotoksine (Karlovsky i sur., 2016). Drugi mogući razlog je da je došlo do vezanja ergot alkaloida u škrobnu strukturu i maskiranja na sličan način kao kod fumonizina (Bryła i sur., 2014; Berthiller i sur., 2013). Na **Slici 19** prikazan je reprezentativni kromatogram sa svih 16 detektiranih EA u realnom uzorku.

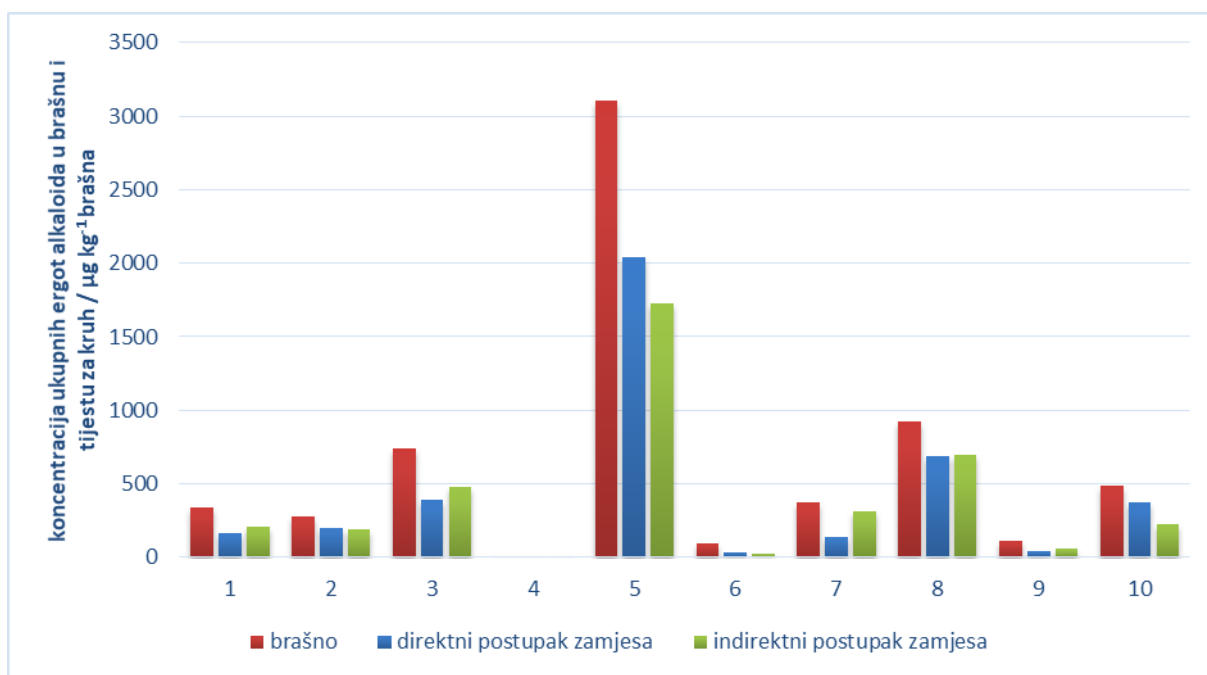
**Tablica 6** Koncentracija ergot alkaloida u tijestu za kruh od raženog brašna proizvedenom indirektnim postupkom /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

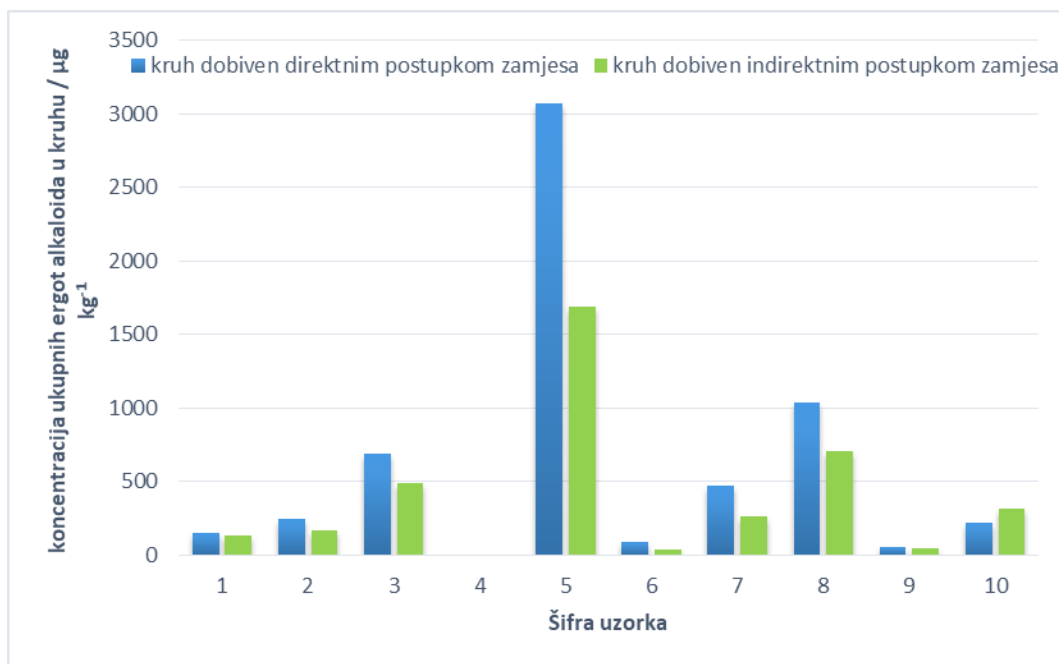
Šifra uzorka tijesta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agroklavin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	47,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kanoklavin	<LOD	<LOD	2,07	<LOD	5,77	0,92	2,62	5,65	<LOD	<LOD
Ergin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,42	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Ergokornin	<LOD	4,08	5,73	<LOD	8,81	<LOD	<LOQ	6,23	5,79	4,54
Ergokorninin	<LOD	3,30	4,59	<LOD	5,55	<LOD	1,74	5,77	3,88	2,93
Ergokristin	18,6	24,5	58,2	<LOD	170	<LOQ	25,9	86,5	<LOD	39,5
Ergokristinin	8,89	9,45	28,3	<LOD	70,3	1,62	11,7	38,8	<LOD	17,4
Ergokriptin	26,5	12,1	13,4	<LOD	56,3	<LOD	11,5	38,4	9,26	8,97
Ergokriptinin	16,4	<LOQ	<LOQ	<LOD	3,69	<LOD	<LOQ	5,21	<LOQ	<LOQ
Ergometrin	<LOQ	30,4	83,7	<LOD	469	7,94	90,4	100	6,76	18,1
Ergometrinin	<LOD	3,51	14,4	<LOD	45,4	0,74	12,4	21,8	0,84	3,60
Ergozin	24,3	12,4	35,3	<LOD	61,9	<LOQ	15,0	48,7	5,56	20,2
Ergozinin	17,1	8,72	24,9	<LOD	43,5	1,38	10,6	34,2	3,94	14,2
Ergotamin	11,6	6,73	12,8	<LOD	46,1	<LOD	7,44	23,4	<LOD	6,74
Ergotaminin	<LOD	1,30	5,78	<LOD	9,64	<LOD	2,14	8,41	<LOD	<LOD
Paspalna kiselina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD



**Tablica 7** Koncentracija ergot alkaloida u kruhu od raženog brašna proizvedenim indirektnim postupkom /  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 

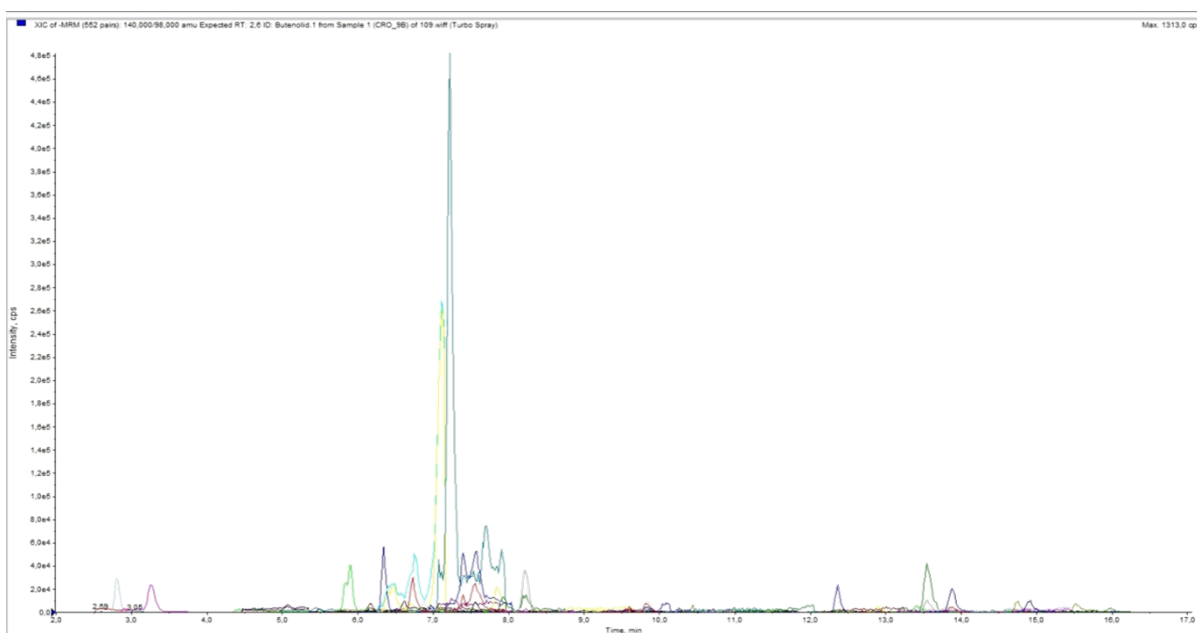
Šifra uzorka kruha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agroklavin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	75,5	1,75	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kanoklavin	<LOQ	0,85	2,98	<LOD	8,72	3,85	3,07	7,19	<LOD	1,47
Ergin	<LOQ	0,57	1,68	<LOD	2,47	<LOQ	<LOQ	2,20	<LOD	0,84
Ergokornin	<LOD	5,03	8,82	<LOD	7,79	<LOD	<LOQ	9,71	4,10	7,75
Ergokorninin	<LOQ	3,94	6,79	<LOD	6,39	<LOD	2,14	9,46	3,38	6,12
Ergokristin	20,6	24,1	73,8	<LOD	179	<LOQ	20,3	90,6	<LOD	69,3
Ergokristinin	12,2	13,1	44,1	<LOD	91,4	2,44	11,4	52,5	<LOD	39,1
Ergokriptin	23,	14,6	19,4	<LOD	51,0	<LOD	9,81	40,1	7,15	12,5
Ergokriptinin	19,1	<LOQ	3,09	<LOD	5,88	<LOD	<LOQ	6,72	<LOQ	2,78
Ergometrin	<LOQ	73,5	200	<LOD	1129	29,3	180	335	12,4	83,3
Ergometrinin	<LOQ	4,85	14,1	<LOD	40,2	0,95	10,3	21,4	0,89	4,47
Ergozin	23,8	14,3	49,0	<LOD	66,2	<LOQ	14,8	61,2	6,86	38,7
Ergozinin	16,7	10,1	34,5	<LOD	46,6	1,77	10,4	43,0	4,85	27,2
Ergotamin	12,8	4,03	22,0	<LOD	46,2	<LOQ	5,51	26,6	<LOD	14,6
Ergotaminin	1,87	1,20	6,28	<LOD	13,9	<LOQ	1,05	9,55	<LOD	4,73
Paspalna kiselina	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	2423	<LOD	<LOD	2003	<LOD	<LOQ

**Slika 17** Redukcija ergot alkaloida iz raženog brašna u tijestu za kruh nakon direktnog i indirektnog postupka



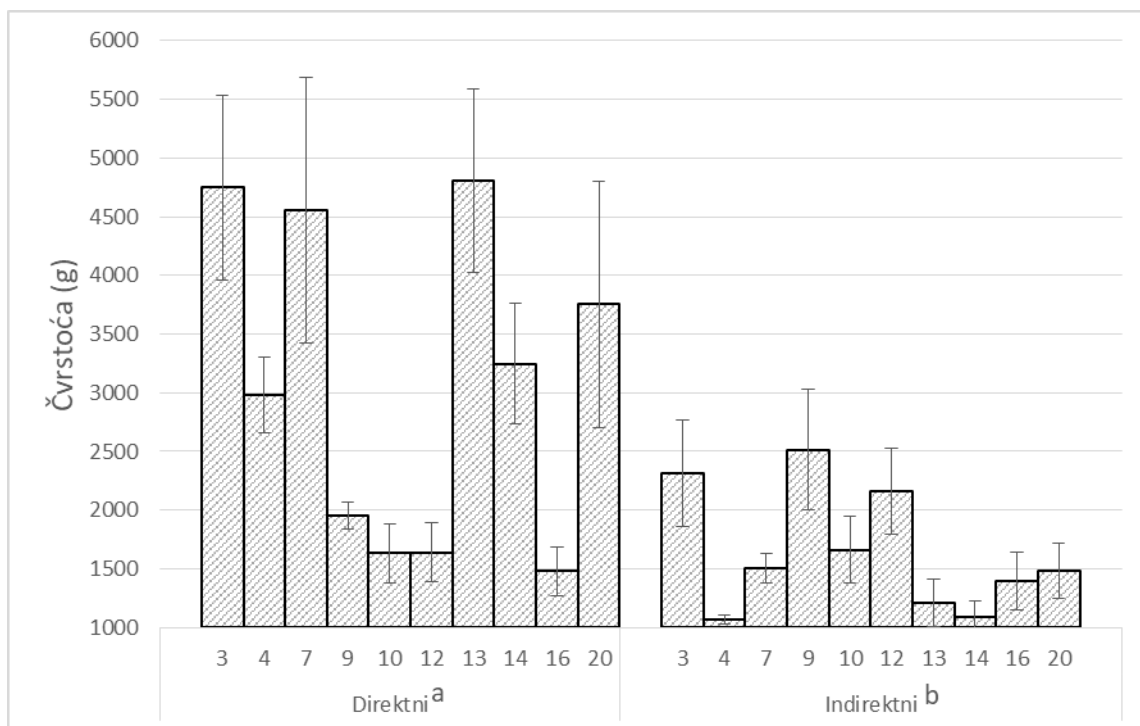
**Slika 18** Usporedba koncentracije ukupnih ergot alkaloida u kruhu od raženog brašna pripremljenom direktnim i indirektnim zamjesom

Usporedbom koncentracija ukupnih EA u kruhu nakon direktnog i indirektnog zamjesa može se vidjeti da se direktnim postupkom zamjesa više EA zadržava u finalnom proizvodu i to u prosjeku 36 % (**Slika 18**). Veća redukcija ukupnih EA indirektnim postupkom zamjesa vjerojatno je rezultat produljene fermentacije i kontakta sa staničnom stijenkom kvasaca i laktobacila koji mogu vezati i imobilizirati velik broj mikotoksina (Shetty i Jespersen, 2006).

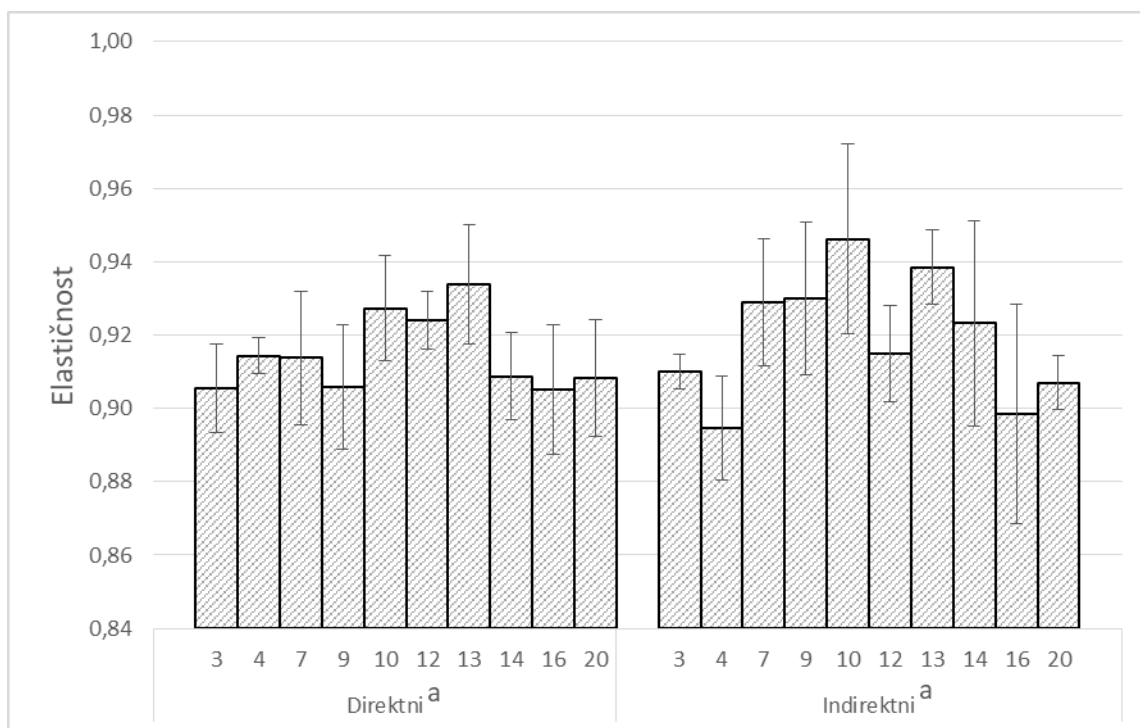


**Slika 19** Primjer kromatograma uzorka raži kontaminiranog ergot alkaloidima

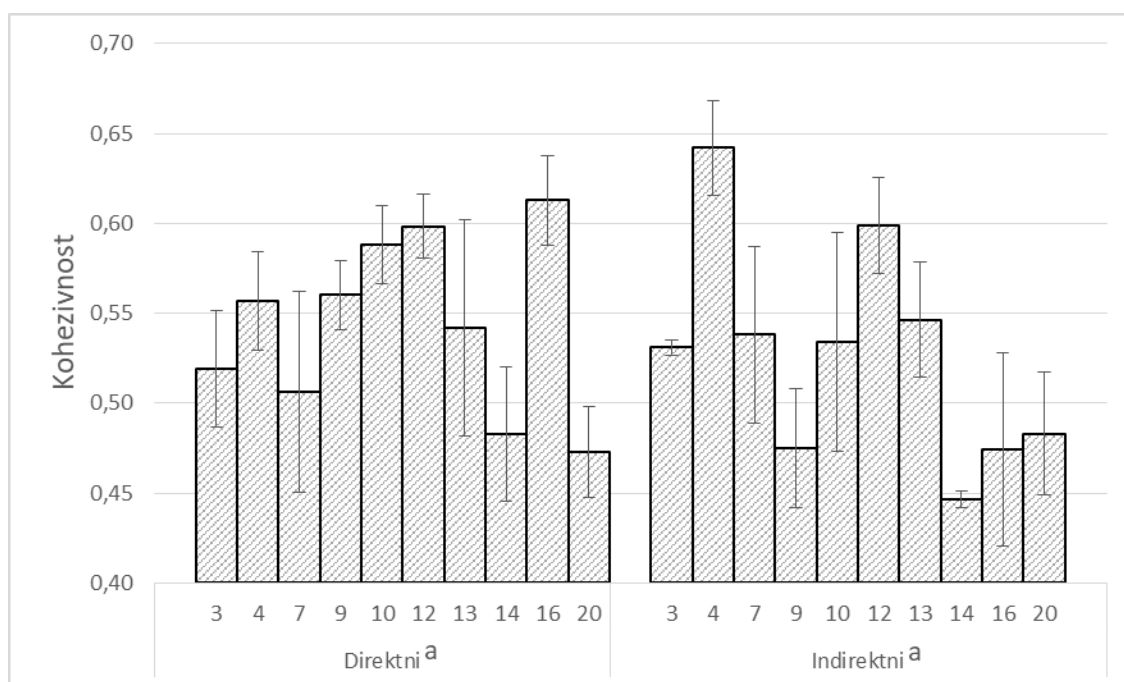
## 4.1 TEKSTURALNA SVOJSTVA



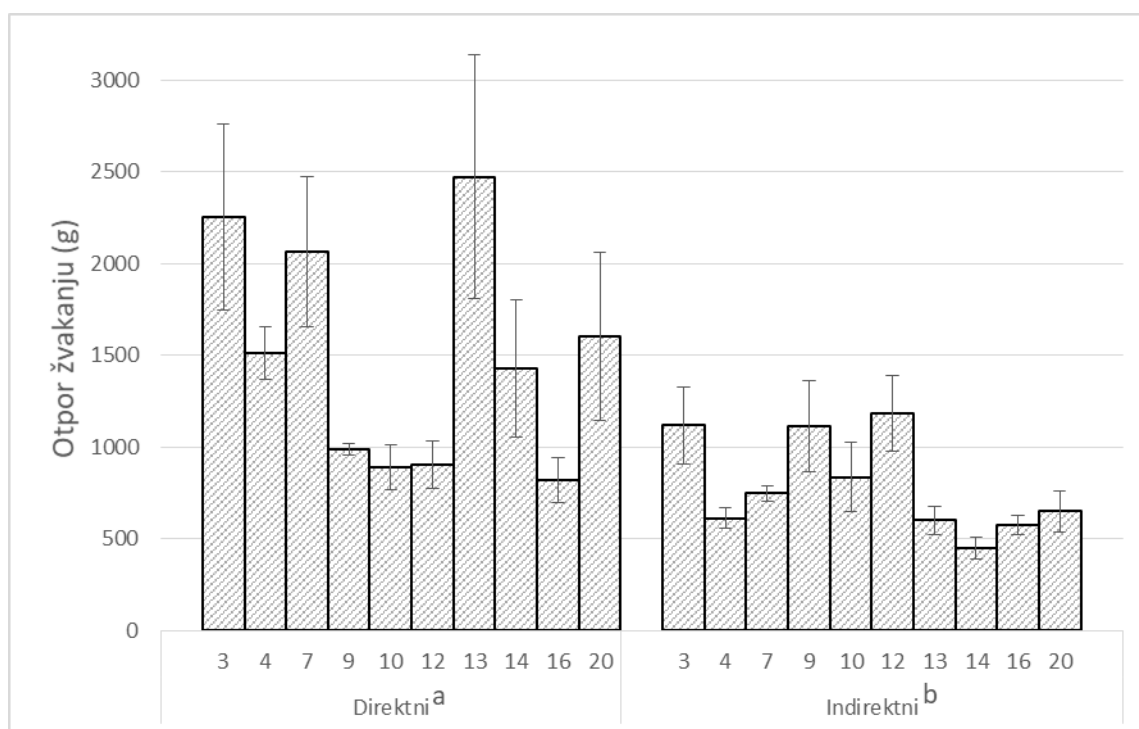
**Slika 20** Čvrstoća (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)



**Slika 21** Elastičnost (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)

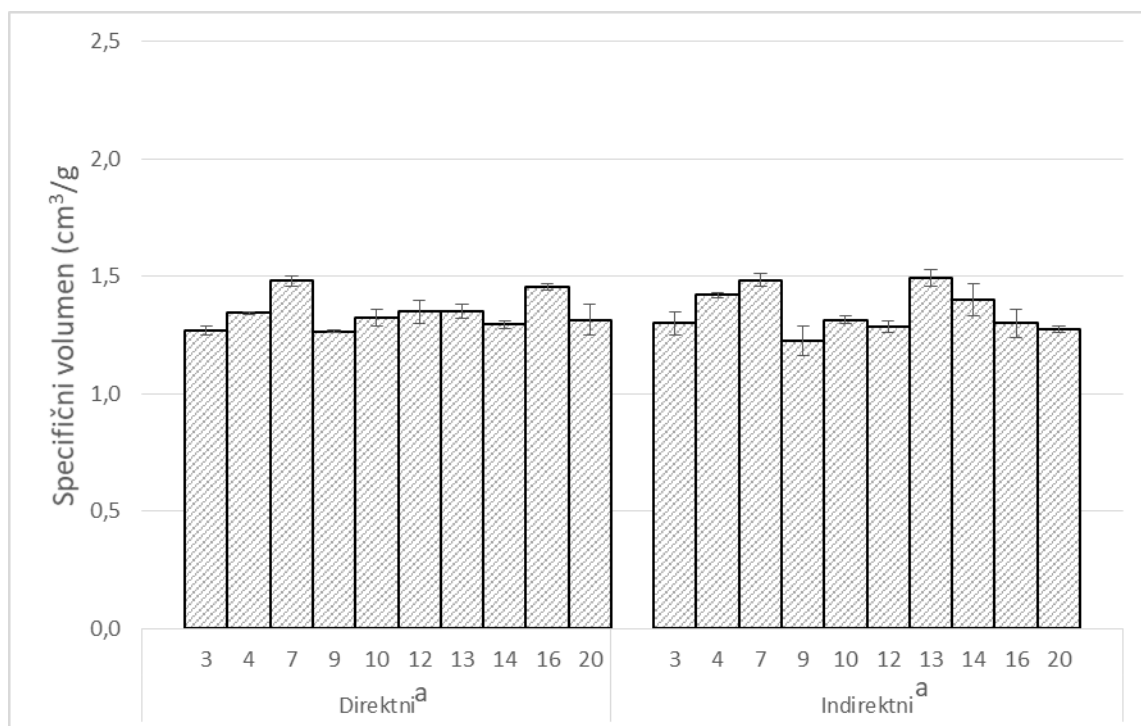


**Slika 22** Kohezivnost (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)

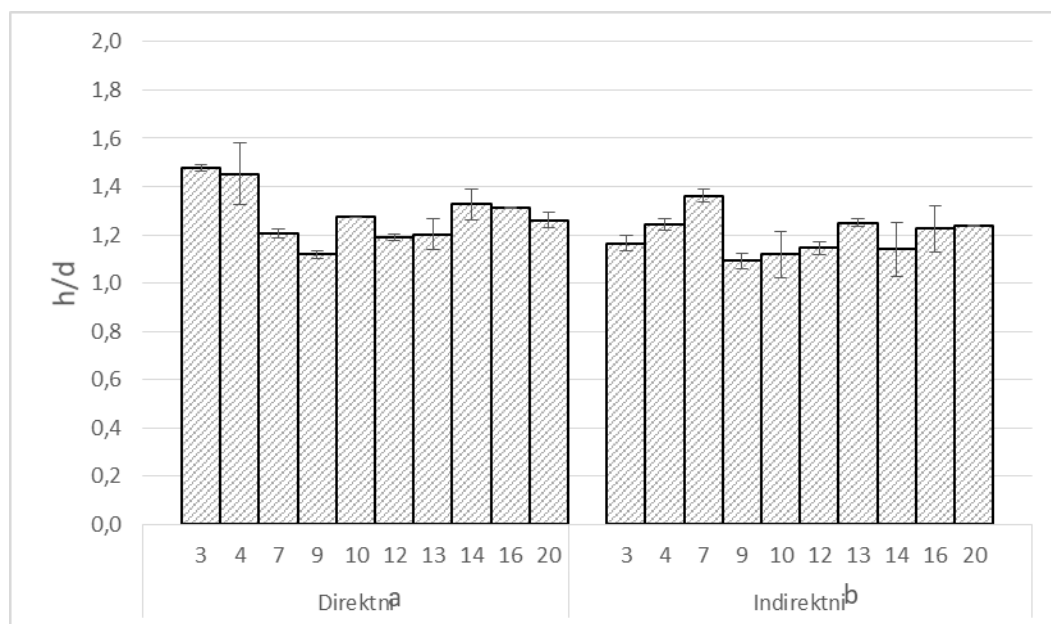


**Slika 23** Otpor žvakanju (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)

## 4.2 SPECIFIČNI VOLUMEN I OMJER h/d

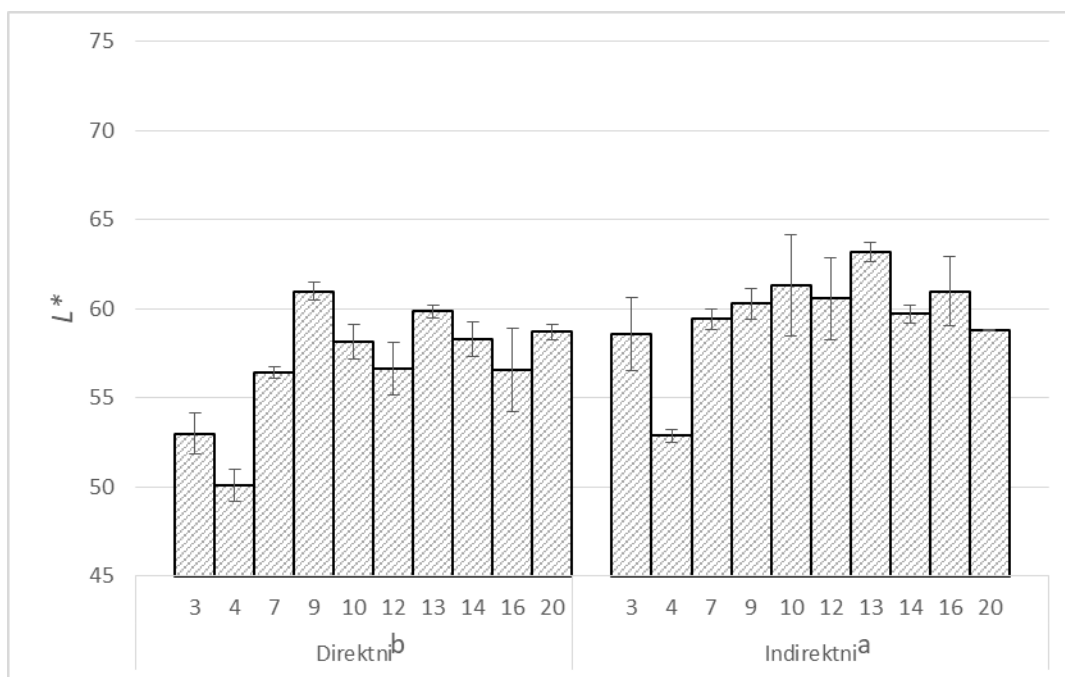


**Slika 24** Specifični volumen (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)

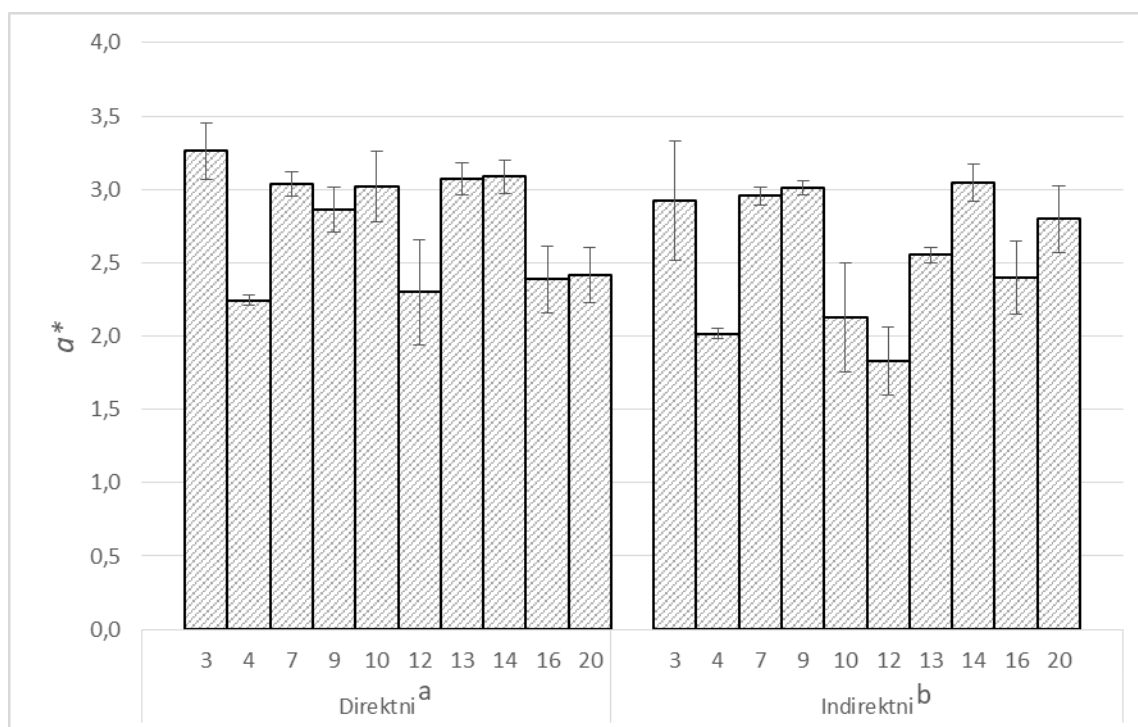


**Slika 25** Omjer h/d (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)

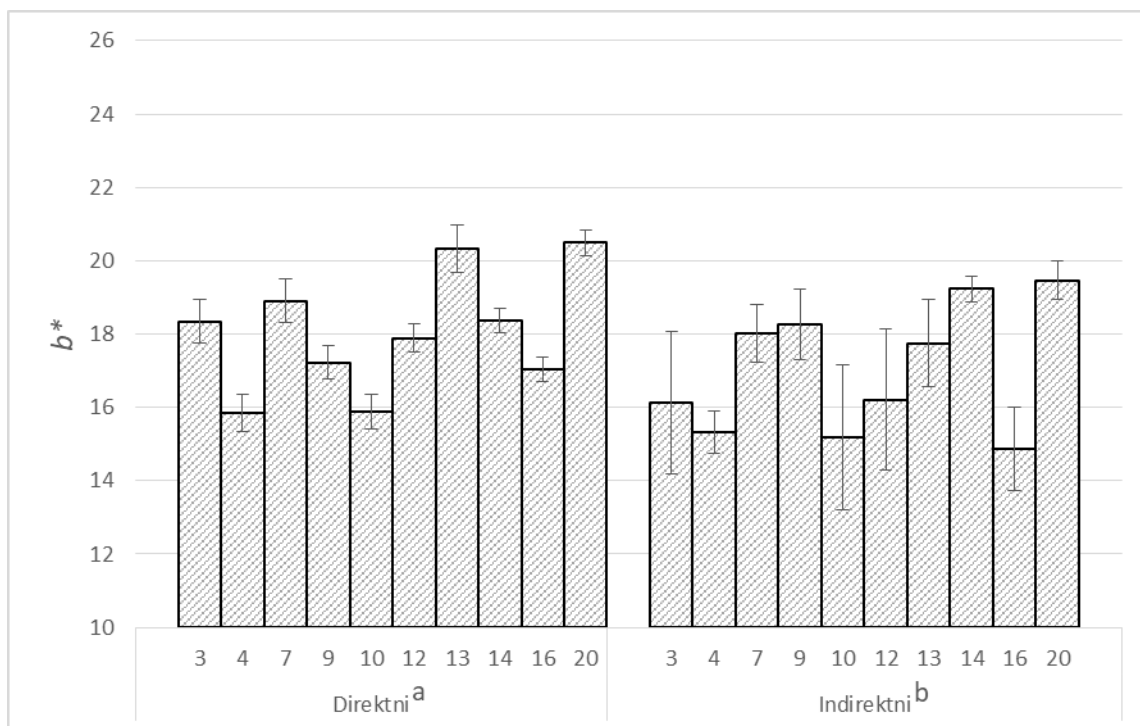
## 4.3 ODREĐIVANJE BOJE SREDINE KRUHA



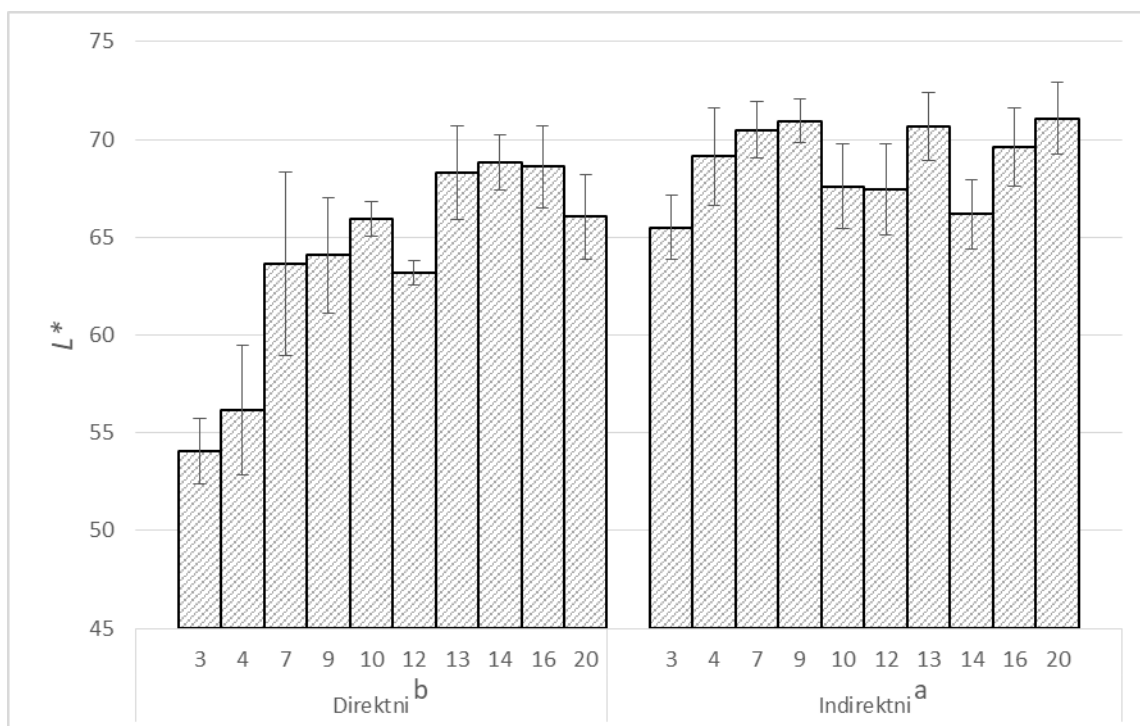
**Slika 26**  $L^*$  vrijednost sredine kruha (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)



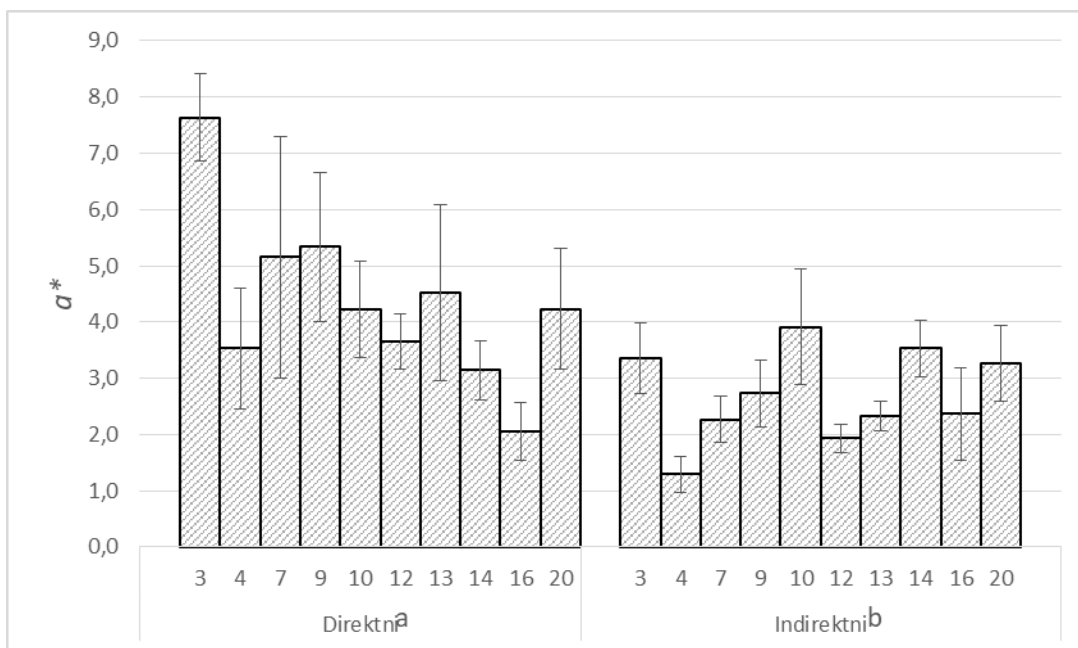
**Slika 27**  $a^*$  vrijednost sredine kruha (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)



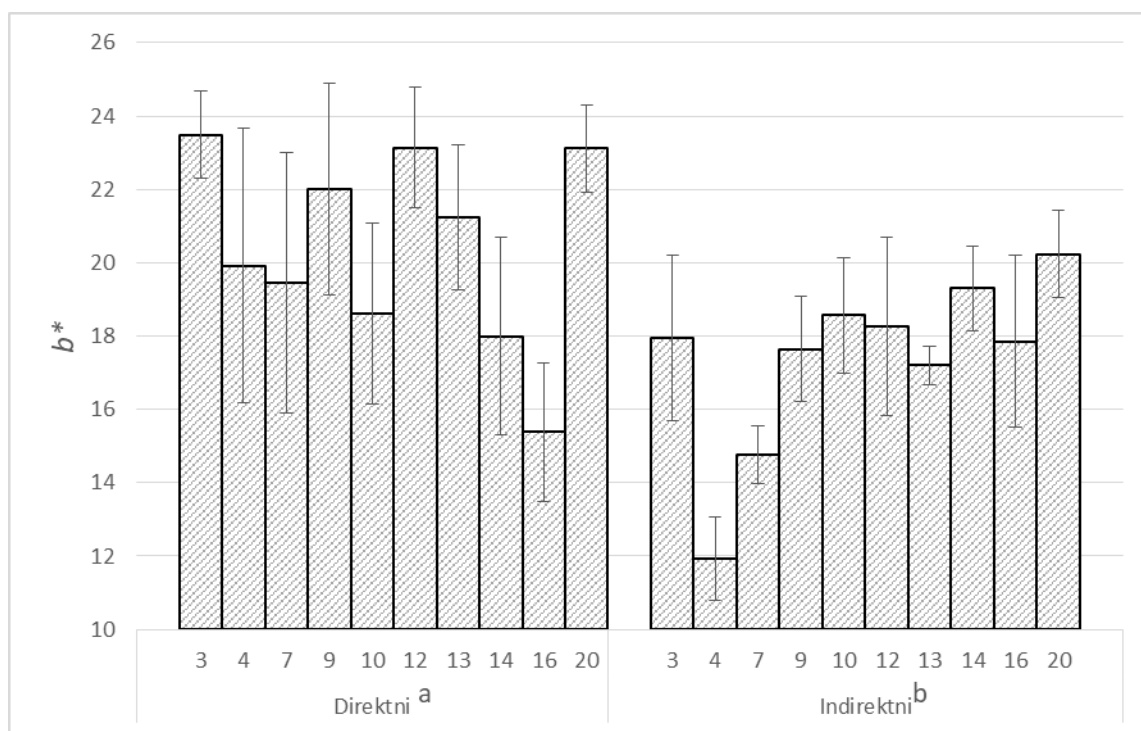
**Slika 28**  $b^*$  vrijednost sredine kruha (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)



**Slika 29**  $L^*$  vrijednost kore kruha (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)



**Slika 30**  $a^*$  vrijednost kore kruha (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)



**Slika 31**  $b^*$  vrijednost kore kruha (prikazani podaci su srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; vrijednosti označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ) prema analizi varijance)



Prema prethodnim dijagramima može se vidjeti slijedeće:

- čvrstoća se znatno razlikuje između raženog kruha proizvedenog direktnim i indirektnim postupkom, odnosno između kruha bez starter kulture (3079,0 g) i onog s kiselim tijestom (1638,8 g). Kruh s kiselim tijestom ima manju čvrstoću (manja je visina prvog pika), što je rezultat aktivacije proteolitičkih enzima - cerealne proteaze (razgrađuju gluten) koja omekšava tijesto (Cagno i sur., 2003);
- na svojstvo elastičnosti kiselo tijesto ne utječe značajno, odnosno nema veće razlike između tijesta proizvedenog direktnim postupkom (omjer površine ispod krivulje tijekom prve kompresije i prve dekompresije: 0,915) i indirektnim postupkom (omjer površine ispod krivulje tijekom prve kompresije i prve dekompresije: 0,919). S obzirom da raženo brašno daje kruh s neelastičnom sredinom, upravo zato je u istraživanju primijenjeno i kiselo tijesto, čiji je primarni efekt povećanje enzimske aktivnosti, odnosno povećanje elastičnosti kruha. No, u ovom slučaju ta razlika nije značajna, što se može pripisati nepovoljnom pH;
- u prosjeku, kohezivnost se također ne razlikuje znatno između tijesta proizvedenog indirektnim i direktnim postupkom (indirektni postupak: omjer površina ispod drugog i prvog pika: 0,527; direktni postupak: omjer površina ispod drugog i prvog pika: 0,544);
- kod otpora žvakanju izmjerena je značajna razlika između navedena dva postupka, otpor žvakanju je značajno veći kod tijesta proizvedenog direktnim postupkom (1494,2 g) nego kod kiselog tijesta 788,3 g);
- kiselo tijesto ne utječe značajno na specifični volumen (direktni postupak:  $1,34 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , indirektni postupak:  $1,35 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ), što ovisi o kiselosti kiselog tijesta – što je pH manji, ukupna kiselost raste, a to dovodi do proteolitičke razgradnje glutena i takav kruh ima manji volumen. No, ukoliko se primjenjuje kiselo tijesto srednje kiselosti, to povoljno utječe na sposobnost zadržavanja plina u tijestu, a time i na volumen kruha (Maleki i sur., 1979). Kiselo tijesto bi ipak trebalo značajnije utjecati na povećanje volumena konačnog proizvoda;
- na omjer h/d kiselo tijesto utječe u manjoj mjeri (direktni postupak: 1,28, indirektni postupak a: 1,20);

- L\* vrijednosti boje sredine kruha proizvedenog direktnim postupkom su u prosjeku manje u odnosu na vrijednosti proizvedenog indirektnim postupkom (direktni postupak: 56,87; indirektni postupak: 59,58), što ukazuje na svjetliju boju sredine kruha proizvedenog indirektnim postupkom;
- a\* vrijednosti boje sredine kruha proizvedenog direktnim postupkom su u prosjeku više nego kod kruha proizvedenog indirektnim postupkom (direktni postupak: 2,77; indirektni postupak: 2,57);
- b\* vrijednosti boje sredine kruha proizvedenog direktnim postupkom su u prosjeku značajno više nego kod kruha proizvedenog indirektnim postupkom (direktni postupak: 18,03; indirektni postupak: 17,05);
- L\* vrijednosti boje kore kruha proizvedenog direktnim postupkom su u prosjeku manje u odnosu na vrijednosti proizvedenog indirektnim postupkom (direktni postupak: 63,89; indirektni postupak: 68,88);
- a\* vrijednosti boje sredine kruha proizvedenog direktnim postupkom su u prosjeku više nego kod kruha proizvedenog indirektnim postupkom (direktni postupak: 4,35; indirektni postupak: 2,70);
- b\* vrijednosti boje sredine kruha proizvedenog direktnim postupkom su u prosjeku značajno više nego kod kruha proizvedenog indirektnim postupkom (direktni postupak: 20,44; indirektni postupak: 17,37).

## **5 ZAKLJUČCI**

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

1. U 10 različitih uzoraka raženog brašna detektirano je 16 ergot alkaloida, od kojih je najveća prosječna koncentracija ergometrina ( $206 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najmanja ergina ( $0,16 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).
2. Najveća prosječna ukupna koncentracija ergot alkaloida izmjerena je u krupici ( $2769 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), zatim u mekinjama ( $1080 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), dok je najmanja izmjerena u brašnu ( $677 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).
3. Ukupna prosječna koncentracija ergot alkaloida izmjerena kod tijesta proizvedenog direktnim postupkom je veća ( $305 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) nego kod tijesta proizvedenog indirektnim postupkom ( $263 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).
4. Kod kruha je zabilježeno povećanje koncentracije ergot alkaloida u oba postupka pripreme (kruh - direktna fermentacija:  $1677 \mu\text{g kg}^{-1}$ , kruh – indirektna fermentacija:  $868 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).
5. Usporedbom sume EA, indirektni postupak se pokazao boljim izborom zbog 36 % manje prosječne koncentracije ukupnih EA u kruhu od raženog brašna u odnosu na direktni postupak pripreme kruha.
6. Kiselo tijesto (indirektni postupak) značajno utječe na čvrstoću, otpor žvakanju i omjer h/d, dok na elastičnost, kohezivnost i specifični volumen ne utječe značajno u odnosu na tijesto proizvedeno direktnim postupkom.
7. Dodatak kiselog tijesta (indirektni postupak) daje tamniju sredinu kruha u odnosu na kruh proizveden direktnim postupkom.

## **6 LITERATURA**

- Banerjee S, Mazumdar S: Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012:282574, 2012.
- Bennett J.W, Klich M: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16(3): 497-516, 2003.
- Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald I P, Seefelder W, Speijers G, Stroka J: Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57:165-186, 2013.
- Bryła M, Roszko M, Szymczyk K, Jędrzejczak R, Słowik E, Mieczysław W: Effect of Baking on Reduction of Free and Hidden Fumonisin in Gluten-free Bread. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62:10341-10347, 2014.
- Budimir J: Određivanje granice kvantifikacije antibiotika u medu vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa. *Diplomski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
- Bürk G, Hobel W, Richt A: Ergot alkaloid in cereal products: results from the Bavarian Health and Food Safety Authority. *Molecular Nutrition and Food Research* 50:437 – 442, 2006.
- Color Code Hex: *Color Space Color Model*. Color Code, 2014.  
<https://www.colorcodehex.com/color-model.html> [23.08.2017.]
- Di Cagno R, De Angelis M, Corsetti A, Lavermicocca P, Arnault P, Tossut P, Gallo G, Gobbetti M: Interaction between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiology* 20: 67-75, 2003.
- EFSA, European Food Safety Authority: *Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed*. EFSA, Italy, 2012.
- EFSA, European Food Safety Authority: Scientific report: Human and animal dietary exposure to ergot alkaloids, EFSA, Italy, 2017.
- EFSA, European Food Safety Authority: *Survey on ergot alkaloid in cereals intended for human consumption and animal feeding*. EFSA, Belgium, 2011.
- Evolva: *Ergot*, 2017. <http://www.evolva.com/ergot/> [02.08.2017.]

- Fajarado JE, Dexter JE, Roscoe MM, Nowicki NW: Retention of Ergot Alkaloids in Wheat During Processing. *Cereal chemistry* 72: 291-298, 1995.
- Franco T S, Garcia S, Hirooka E Y, Ono Y S, Santos J S: Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 111:739-748, 2011.
- Gänzle MG, Loponen J, Gobbetti M: *Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality*. *Trends in Food Science & Technology* 19: 513-521, 2008.
- Gray R: *Did dinosaurs get HIGH? Fungus containing LSD compound is found on a 100-million-year-old fossilised blade of grass*. Mailonline, 2015. <http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2947385/Did-dinosaurs-HIGH-Fungus-containing-LSD-compound-100-million-year-old-fossilised-blade-grass.html> [02.08.2017.]
- Gross JH: *Mass spectrometry - A Textbook*. Springer, Berlin, 2004.
- Karlovsky P, Suman M, Berthiller F, De Meester J, Eisenbrand G, Perrin I, Oswald I P, Speijers G, Chiodini A, Recker T, Dussort P: Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research* 32: 179-205, 2016.
- Konica Minolta: *Chroma Meters CR-400 / CR-410*. Konica Minolta Sensing Europe B. V., 2017. <https://www.konicaminolta.eu/en/measuring-instruments/products/colour-measurement/chroma-meters/cr-400-410/introduction.html> [23.08.2017.]
- Lauber U, Schnauffer R, Gredziak M, Kiesswetter Y: Analysis of rye grains and rye meals for ergot alkaloids. *Mycotoxin Research* 21: 258-262, 2005.
- Madeira P, Florêncio M: *Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies*. In *Tandem Mass Spectrometry – applications and principles*. InTech, Rijeka, 2012.
- 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. *Journal of Chromatography A* 1362: 145 – 156, Austrija, Španjolska, 2014.
- Maleki M, Hosney R. C, Mattern P. J: Effects of Loaf Volume, Moisture Content, and Protein Quality on the Softness and Staling Rate of Bread. *Cereal Chemistry* 57:138-140, 1979.
- Maskan M: Kinetics of colour change of kiwi fruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering* 48:169-175, 2001.
- Medved I: *Zanimljivosti o raži*. Agroportal, 2016. <http://www.agroportal.hr/ratarstvo/15901> [15.08.2017.]
- Međimurec T: *Agrotehnika proizvodnje raži*. Zagreb, 2016. <http://www.savjetodavna.hr/adminmax/publikacije/AgrotehnikaRazi312017.pdf> [28.08.2017.]
- Merrill LM, Bohnert DW, Harmon DL, Craig MA, Schrick FN: The ability of a yeast-derived cell wall preparation to minimize the toxic effects of high-ergot alkaloid tall fescue straw in beef cattle. *Journal of Animal Science* 85:2596-2605, 2007.
- Müller C, Kemmlin S, Klaffke H, Krauthause W, Preiss-Weigert A, Wittkowski R: A basic tool for risk assessment: a new method for the analysis of ergot alkaloid in rye and selected rye products. *Molecular Nutrition & Food Research* 53:500-507, 2009.
- Official Journal of the European Union, Commission regulation (EU) 2015/1940, 2015. [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg2015\\_1940.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg2015_1940.pdf) [28.08.2017]
- Pasarić S: *Vodič kroz integralne žitarice*. Alternativa za Vas. <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/integralne-zitarice> [15.08.2017.]
- Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M: Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77:754-766, 1999.
- Pfliegler WP, Pusztahelyi T, Pócsi I: Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*: 805-818, 2015.
- Pratima NA, Shraddha B, Zibran S: Review of Ultra Performance Liquid Chromatography and its Applications. *International Journal of Research in Pharmacy and Science* 3:19-40, 2013.



- PubChem: *Ergoline*. National Center for Biotechnology Information, 2017.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6857537#section=Information-Sources> [03.08.2017.]
- Reinhard H, Rupp H, Zoller O: Ergot alkaloids: quantitation and recognition challenges. *Mycotoxin Research* 24:7-13, 2008.
- Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Kladdke H, Lorenz N: Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research* 30:197-205, 2014.
- Schünemann C, Treu G: *Tehnologije proizvodnje pekarskih i slastičarskih proizvoda*. TIM ZIP d.o.o., Zagreb, 2012.
- Scotnevins: *Ergot of Rye and Ergotism (St. Anthony's Fire)*. Scott Nevins Memorial, 2015.  
<https://scottnevinssuicide.wordpress.com/2015/01/26/ergot-of-rye-and-ergotism-st-anthonys-fire/> [02.08.2017.]
- Shety PH, Jespersen L: *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trend sin Food Science & Technology* 17:48-55, 2006.
- Shipton Mill: *Rye Flour – Organic Dark Rye Flour – Type 1350 (603)*. Shipton Mill Ltd, 2013.  
<https://www.shipton-mill.com/flour-direct-shop/flour/rye-flour> [15.08.2017.]
- Shogren MD, Finney KF: Bread-Making Test for 10 Grams of Flour. *Cereal chemistry* 61: 418 - 423, 1984.
- Spectrometer Technologies: VolScan Profiler. United Spectrometer Technologies (Ptyl) Ltd, 2017. <http://us-tech.co.za/volscan-profiler/> [03.10.2017.]
- Storm ID, Rasmussen PH, Strobel BW, Hansen HC: Ergot alkaloids in rye flour determined by solid-phase cation-exchange and high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Additives & Contaminants Part A* 25:338-346, 2008.
- Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapac T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2010.
- Šarkanj B: Utjecaj inhibitora glutation S – transferaze na proukciju aflatoksina plijesni *Aspergillus flavus*. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

- Taleuzzaman M, Ali S, Gilani SJ, Imam SS, Hafeez A: *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – A Review*. Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry, 2015.  
[https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjB-9SKjqjNAhWCESwKHf1FDaIQFggbMAA&url=http%3A%2F%2Ffaustinpublishinggroup.com%2Fanalytical-pharmaceutical-chemistry%2Fdownload.php%3Ffile%3Dfulltext%2Fajapc-v2-id1056.pdf&usg=AFQjCNFLIC8q3GrOqSIUnNKyrD6DuMerDQ&sig2=nJjmY\\_wRb3LO7Y2Fempg4A](https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjB-9SKjqjNAhWCESwKHf1FDaIQFggbMAA&url=http%3A%2F%2Ffaustinpublishinggroup.com%2Fanalytical-pharmaceutical-chemistry%2Fdownload.php%3Ffile%3Dfulltext%2Fajapc-v2-id1056.pdf&usg=AFQjCNFLIC8q3GrOqSIUnNKyrD6DuMerDQ&sig2=nJjmY_wRb3LO7Y2Fempg4A) [15.08.2017.]
- Tudzynski P, Correia T, Keller U: Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:593-605, 2001.
- Varga E: Validation and application of an LC-MS/MS based multi-target method for the determination of mycotoxins in nuts and dried grapes. *Diplomski rad*. University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Beč, 2010.