Mikotoksini u nusproizvodima nastalim tijekom proizvodnje slada i piva

Tajz, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:109:805016

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Lidija Tajz

MIKOTOKSINI U NUSPROIZVODIMA NASTALIM TIJEKOM PROIZVODNJE SLADA I PIVA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Osnove bioprocesnog inženjerstva
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 13. lipnja 2017.
Mentor: doc. dr. sc. *Kristina Mastanjević*
Komentor: doc. dr. sc. *Bojan Šarkanj*

Mikotoksini u nusproizvodima nastalim tijekom proizvodnje slada i piva

Lidija Tajz, 392-DI, 2015.

Sažetak:
Prilikom proizvodnje slada i piva nastaju nusproizvodi, voda za močenje, klica i korjenčić, pivski trop te otpadni kvasac. Vrlo je bitno utvrditi udio mikotoksina u navedenim nusproizvodima jer se kao izvor kvalitetnih proteina (izuzev vode za močenje) često koriste u ishrani stoke, a mogu se koristiti i kao zamijene ili dodaci u proizvodnji hrane za ljude. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti udio zaostalih mikotoksina u spomenutim nusproizvodima. Primjenjene metode uključuju standardne metode slađenja i proizvodnje piva, te mikotoksikološku analizu nusproizvoda na LC-MS/MS uređaju. Rezultati ovog istraživanja daju uvid u kvantitativnu distribuciju ispitivanih mikotoksina (deoksinivalenol, nivalenol, 3-acetildeoksinivalenol i T-2 toksin) u nusproizvodima nastalim tijekom slađenja i proizvodnje piva.

Ključne riječi: *Fusarium culmorum*, mikotoksini, nusproizvodi, pšenični slad

Rad sadrži: 41 stranica
16 slika
2 tablice
0 priloga
66 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

1.	izv. prof. dr. sc. Natalija Velić	Predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Kristina Mastanjević*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Bojan Šarkanj*	član-komentor
4.	prof. dr. sc. Vinko Krstanović	zamjena člana

Datum obrane: 22. siječnja 2018.

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

Graduate program of Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Basic of Bioprocess Engineering
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on June 13, 2017.
Supervisor: *Kristina Mastanjević*, *PhD*, *assist. prof*.
Co-supervisor: *Bojan Šarkanj, PhD, assist. prof.*

Mycotoxins in malting and brewing by-products

Lidija Tajz, 392-DI, 2015.

Summary: By-products steeping water, germ/rootlets, spent grain and yeast are produced during malting and beer brewing process. It is very important to determine the content of mycotoxins in these by-products because they are a source of high-quality protein (excluding steeping water), which is why they are often used as feed, and they can also be used as substitutes or additives in food production for humans. The aim of this study was to determine the concentration of residual mycotoxins in the mentioned byproducts. Applied methods include standard malting and brewing methods, and mycotoxicological by-product analysis on the LC-MS/MS. The results of this study give an insight into the quantitative distribution of the examined mycotoxins (deoxynivalenol, nivalenol, 3-acetildeoxynivalenol and T-2 toxin) in the by-products produced during malting and beer production.

Key words: *Fusarium culmorum*, mycotoxins, by-products, wheat malt

Thesis contains: 41 pages
16 figures
2 tables
0 supplements
66 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Natalija Velić*, PhD, assoc. prof.	chair person
2.	*Kristina Mastanjević*, PhD, assist. prof.	Supervisor
3.	*Bojan Šarkanj*, PhD, assist. prof.	Member-cosupervisor
4.	*Vinko Krstanović,* PhD, prof.	stand-in

Defense date: January 22, 2018.

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

Prije svega, zahvalila bih se svojoj mentorici doc. dr. sc. Kristini Mastanjević što mi je uvelike pomogla svojim prijedlozima, savjetima, a najviše time što je bila dostupna u svakom trenutku prilikom izrade ovog diplomskog rada. Nadalje, zahvaljujem se i komentoru doc. dr. sc. Bojanu Šarkanju na svakoj pomoći i strpljenju prilikom provođenja eksperimentalnog dijela rada. Također posebna zahvala ide mojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje, pomagali mi tijekom studiranja, te bili izuzetno velika podrška svih ovih godina.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. PŠENICA KAO PIVARSKA SIROVINA 4

2.2. PROIZVODNJA PŠENIČNOG SLADA 5

2.3. NUSPROIZVODI KOJI NASTAJU TIJEKOM PROIZVODNJE PŠENIČNOG SLADA I PIVA 6

2.4. PLIJESNI U INDUSTRIJI SLADA I PIVA 10

2.4.1. *Fusarium culmorum* 11

2.5. *FUSARIUM* MIKOTOKSINI U PROIZVODNJI SLADA I PIVA 12

2.6. *FUSARIUM* MIKOTOKSINI 15

2.6.1. Trihoteceni 15

3. EKSPERIMENTALNI DIO 21

3.1. ZADATAK 22

3.2. MATERIJALI I METODE 22

3.2.1. MIKROSLAĐENJE 22

3.2.2. PROIZVODNJA PIVA 25

3.2.3. ANALIZA MIKOTOKSINA U NUSPROIZVODIMA NASTALIM TIJEKOM SLAĐENJA I PROIZVODNJE PIVA 25

Priprema uzoraka za LC-MS/MS analizu 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 29

4.1. PRAĆENJE KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA KOJI NASTAJU PRILIKOM PROIZVODNJE SLADA I PIVA 30

5. ZAKLJUČCI 35

6. LITERATURA 37

Popis oznaka, kratica i simbola

3-AcDON	3-acetil deoksinivalenol
5'-AMP	adenozin monofosfat
5'-CMP	citidin monofosfat
5'-GMP	gvanozin monofosfat
5'-IMP	inozin monofosfat
5'-UMP	uridin monofosfat
15-AcDON	15-acetil deoksinivalenol
AFB1	aflatoksin B1
AFB2	aflatoksin B2
AFM1	aflatoksin M1
API	(Atmospheric pressure ionization) Ionizacija kod atmosferskog tlaka
aw	aktivitet vode
CIT	citrinin
DAS	diacetoksiscirpenol
DON	deoksinivalenol
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (eng. European Food Safety Authority)
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (eng. Food and Agriculture Organization)
FB1	fumonizin B1
FB2	fumonizin B2
FUS X	fuzarenon X
HAH	Hrvatska agencija za hranu
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. high performance liquid chromatography)
HT-2	HT-2 toksin
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija–tandem masena spektrometrija (eng. liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry)
LOD	(low of detection) - limit detekcije
MS	maseni spektrometar

MSG	natrijev glutamat
NIV	nivalenol
OTA	ohratoksin A
PAT	patulin
PCR	lančana reakcija polimerizacijom
RNA	ribonukleinska kiselina
SPE	ekstrakcija na krutoj fazi (eng. solid phase extraction)
T-2	T-2 toksin
TDI	tolerantni dnevni unos
ZEA	zearalenon

1. UVOD

Žitarice su biljke zrnastih, nutritivno vrlo bogatih plodova, što ih zapravo i čini temeljnom namirnicom u ljudskoj prehrani već desetke tisuća godina. Vrlo su rasprostranjene jer uspijevaju u raznim klimama i tlima, a kao sirovina koriste se u prehrambenoj industriji i ishrani životinja. Žitarice, pretežno ječam i pšenica, se upotrebljavaju za proizvodnju slada, što ih ujedno čini i osnovnom sirovinom za proizvodnju piva.

Tijekom proizvodnje slada i piva nastaju, u nutritivnom smislu, vrijedni nusproizvodi koji se uobičajeno koriste u ishrani životinja (stoka, peradi, svinje, ribe) ili kao dodaci u prehrambenim industrijama (npr. snack proizvodi). Ti nusproizvodi podrazumijevanju klicu/korjenčić nakon otklicavanja gotovog slada, trop nakon filtracije piva i otpadni kvasac koji se izdvaja nakon vrenja piva. Voda nakon močenja također je nusproizvod koji nastaje nakon procesa slađenja, ali se nikako ne može utilizirati nego se ispušta u otpadne vode.

Plijesni roda *Fusarium* su vrlo česti kontaminanti pšenice na polju, a posljedično tome završavaju i u industriji slada i piva. Iako se šarže koje pokazuju znakove kontaminacije plijesnima iz roda *Fusarium* odbacuju, odnosno ne ulaze u sladaru, ipak tijekom proizvodnje slada može doći do razvoja ovih plijesni. Osim ekonomske štete koju može uzrokovati ovakva šarža zrna, sladari se najviše pribojavaju kontaminacije mikotoksinima. Obzirom da se nusproizvodi nastali tijekom proizvodnje slada i piva koriste kao stočna hrana ili dodaci u prehrambenoj industriji, prisutnost mikotoksina predstavlja značaju opasnost za zdravlje životinja, ali i ljudi.

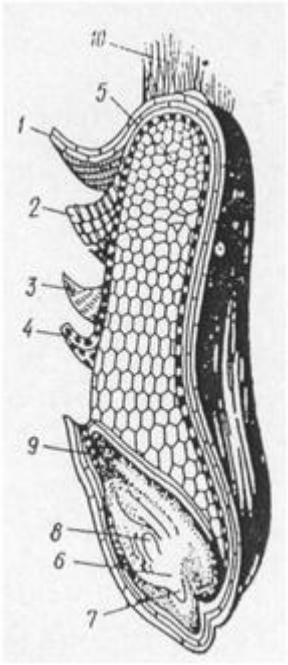
Za provedeno istraživanje, izdvojeni su važniji nusproizvodi koji nastaju prilikom proizvodnje slada i piva: voda od močenja, klica, pivski trop i pivski kvasac. Cilj istraživanja bio je LC-MS/MS tehnikom kvalificirati i kvantificirati mikotoksine koji mogu zaostati u nusproizvodima nastalim tijekom proizvodnje slada i piva, a sve u svrhu što boljeg poznavanja raspodjele i zadržavanja mikotoksina u frakcijama nusproizvoda iz industrije slada i piva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PŠENICA KAO PIVARSKA SIROVINA

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je svakako jedna od najzastupljenijih žitarica na svijetu te se kao škrobna sirovina upotrebljava u proizvodnji piva. Ovisno o klimatskim uvjetima, tlu pa i samoj sorti razlikujemo kemijski sastav zrna pšenice, stoga se u procesu proizvodnje piva ona koristi u više oblika, koji se mogu svrstati u dvije osnovne skupine, a to su slađena pšenica i neslađena pšenica. Neslađena pšenica je pšenica u kojoj je škrob ostao u prirodnom obliku (brašno, krupica, usitnjeni ili cjelovito zrno), kao i pšenični sirup ili pšenica u kojoj je škrob preželatiniziran. U proizvodnji piva, neslađena pšenica se najčešće koristi kao dodatak ječmenom sladu kako bi se postiglo povećanje ukupnog ekstrakta, što smanjuje troškove pri proizvodnji piva (Krstanović, 2000). Izuzev toga, upotrebljava se i u svrhu postizanja stabilnosti pjene, za poboljšanje punoće okusa, te kao sirovina za proizvodnju pšeničnih i drugih „ale“ piva. (Leskošek-Čukalović, 2002).

Zrno pšenice je izduženog, ovalnog oblika s uzdužnom brazdicom duboko usječenom u unutrašnjost endosperma. Pšenično zrno nakon žetve više ne posjeduje pljevicu što mu daje sposobnost brže apsorpcije vode. Zbog toga se, u odnosnu na ječam, javlja potreba za skraćenjem vremena namakanja tijekom slađenja (Leskošek-Čukalović, 2002). Dlačice, koje se nalaze na vrhu zrna nazivaju se bradica (Slika 1). Ona se sastoji od cjevastih dlačica koje predstavljaju produžetak epidermisa, a imaju vrlo važnu ulogu u apsorpcijskim procesima prilikom močenja. Nedostatak pljevice predstavlja problem tijekom klijanja, jer je zametak nezaštićen i može doći do odvajanja zrna. Najvrijedniji dio zrna, u nutritivnom smislu, predstavlja klica jer ona sadrži vitamine, enzime, esencijalne aminokiseline, kao i visok udio masti. To je ujedno čini i najosjetljivijim dijelom jer je podložna kemijskim i mikrobiološkim promjenama (Chandra, 1997).



Slika 1. Uzdužni presjek zrna pšenice: 1-3. Omotač ploda i sjemena, 4. Aleuronski sloj, 5. Endosperm, 6. Klica, 7. Začetak korjenčića, 8. Pupoljak, 9. Štitić, 10. Brazdica. (Web 1)

Klica i korjenčić se mogu koristiti i kao stočna hrana te je izrazito bitno osigurati njihovu zdravstvenu ispravnost jer su vrlo podložni mikrobiološkoj kontaminaciji plijesnima, ujedno i mikotoksinima koji mogu djelovati štetno na zdravlje životinja.

Endosperm predstavlja najveći udio zrna, koji je svakako i tehnološki najvažniji dio zbog mogućnosti modifikacije zrna tijekom slađenja, a kasnije i tijekom ukomljavanja (Chandra, 1997). Za potrebe slađenja, treba koristiti pšenicu koja sadrži manji udio proteina, jer je udio proteina čimbenik koji utječe na tijek samog procesa slađenja, a na kraju i na kakvoću gotovog slada i piva (Leskošek-Čukalović, 2002).

2.2. PROIZVODNJA PŠENIČNOG SLADA

Slađenje se može definirati kao proces klijanja pri umjetno stvorenim, kontroliranim uvjetima, gdje se postavljanjem procesnih uvjeta iniciraju i usmjeravaju fiziološki i biokemijski procesi u zrnu. Prilikom procesa slađenja dolazi do djelomične razgradnje zrna te sinteze novih ili aktivacije već prisutnih enzima. Slad služi kao prirodni izvor mnogih enzima kao što su amilolitički, proteolitički i citolitički enzimi.

Karakteristike dobrog pivarskog slada opisali su Štefanić i Marić (1990):

- ujednačena svijetlo-žuta boja,
- čist, svjež miris karakterističan za pojedini tip slada,
- cijela zrna, bez prisutnosti zrna stranog podrijetla, klice, prašine.

Prethodno navedene karakteristike nam govore kako je prije samoga slađenja potrebno pravilno provesti čišćenje, sortiranje i skladištenje. Na taj način se uvelike sprječava narušavanje kakvoće slada.

Tehnološki proces proizvodnje slada obuhvaća:

1. čišćenje i sortiranje zrna;
2. močenje zrna;
3. klijanje namočenog zrna;
4. sušenje zelenog slada te

Procesom slađenja zrno prolazi kroz tri osnovne faze:

1. apsorpcija vode (bubrenje),
2. rast klice i korjenčića (klijanje) i zaustavljanje rasta,
3. stabilizacija zrna slada (sušenje) (Marić, 1995).

Pšenica koja se koristi za slađenje mora biti mikrobiološki ispravna, u potpunosti zrela sa zadovoljavajućom klijavošću i energijom klijanja, a što je još važno, treba imati mali sadržaj proteina (do 12 %) (Krstanović, 2004).

2.3. NUSPROIZVODI KOJI NASTAJU TIJEKOM PROIZVODNJE PŠENIČNOG SLADA I PIVA

Prilikom proizvodnje slada i piva, nastaje velika količina nusproizvoda važnih za korištenje u ishrani životinja. Uobičajeni nusproizvodi koji nastaju prilikom proizvodnje piva su voda, pivski trop, kvasac, ugljikov dioksid i korjenčići pšeničnog slada (Šakić, 2008). Pivovarama nusproizvodi predstavljaju problem jer iz proizvodnje piva proizlaze u rasutom stanju, velikoj količini te sadrže visoke udjele vode pa je potrebno uložiti određene količine energije za sušenje što poskupljuje postupak zbrinjavanja takvog otpada. Glavno, i najčešće rješenje za odvoz nusproizvoda je za poljoprivrednu upotrebu, posebno za ishranu životinja

dok mali udio nusproizvoda završava kao poseban proizvod npr. ekstrakt kvasca. Već nekoliko godina se provode istraživanja alternativnih načina primjene ovog nusproizvoda. Neke od mogućih primjena uključuju: kompostiranje, anaerobnu digestiju mulja za oslobađanje energije, supstrate za uzgoj gljiva, mikrobni rast i bioremedijaciju, a moguća je i kombinacija sa papirnatim materijalima (Thomas i Rahman, 2006).

Nusproizvodi koji su se koristili za provedeno istraživanje su:

1. voda od močenja;
2. sladne klice;
3. pivski trop;
4. otpadni kvasac

Voda od močenja

Jedan od prvih nusproizvoda koji proizlaze iz industrije slada je voda od močenja. Pri proizvodnji slada koriste se jako velike količine vode, stoga bi bilo idealno kada bi se voda od močenja mogla ponovno upotrijebiti radi smanjenja troškova proizvodnje. Međutim, polarni mikotoksini se tijekom močenja prenose u vodu. Jako je bitno da se mikotoksini uklone iz vode za močenje jer su neki od mikotoksina koji zaostaju poznati kao inhibitori klijanja. Od širokog spektra različitih kemijskih spojeva koji su poznati kao inhibitori klijavosti, topljivi su mikotoksini DON, T-2 i ZEA (Schwarz i sur., 1995; EUREKA SWAN, 2003). Po 1hL proizvedenog piva, dobije se 6 - 15 hL otpadne vode koja se razlikuje po količini, a i sastavu, od pogona do pogona. U otpadnim vodama prisutan je sadržaj suspenzije i otopine smjese piva, sladovine, pivskog tropa, proteinskog taloga, otpadnog kvasca, dijatomejske zemlje, te sredstva za pranje i dezinfekciju. Prije obrade otpadne vode odvoji se pivski kvasac od proteinskog taloga što smanjuje koncentraciju dušičnih spojeva u otpadnoj vodi. Takva otpadna voda se miješa sa komunalnom otpadnom vodom i zatim podvrgava biološkoj obradi. Otpadna voda iz pivske industrije može se obraditi i procesom anaerobne digestije (Beluhan, 2001a).

U svrhu smanjivanja onečišćenosti otpadnih voda može se djelovati na više načina:

- smanjenjem ukupnog volumena otpadnih voda (recirkulacijom rashladne vode)
- daljnjom upotrebom nusproizvoda (otpadnog kvasca i taloga)
- izbjegavanjem izlijevanja i ispiranja proizvoda i međuproizvoda

- recirkulacijom vode tijekom pranja pogona
- modifikacijom osnovnog tehnološkog procesa u svrhu prilagođavanja obrade i recirkulacije otpadnih voda i nusproizvoda (Beluhan, 2001b).

U svakom pogonu otpadne vode se moraju podvrgnuti minimalnom tretmanu, koji objedinjuje različite tehnološke operacije (taloženje suspendiranih čestica, neutralizacija lužnatih voda (nakon pranja) uz pomoć otpadnog CO_2 nakon fermentacije) (Beluhan, 2001b).

Sladne klice

Sladne klice su nusproizvod dobiven odstranjivanjem klica i korjenčića od ječmenog slada, zajedno s dijelovima pljevice i ostalim dijelovima sladnog zrna (Kerby i Vrieskoop, 2017). Svjetska godišnja proizvodnja slada se procjenjuje na 17 milijuna tona, od čega sladne klice čine 4 - 5 % od proizvedene mase, budući da se na 100 kg slada, uz zrnasti otpad, proizvede od 4 do 5 kg sladnih klica. Sukladno tome, u jedinoj hrvatskoj sladari nastaje oko 2000 t sladnih klica (Beluhan, 2001a). Sladne klice su vrlo bogat izvor enzima, te je jedna od mogućnosti, njihova uporaba kao izvora enzima 5'-fosfodiesteraze. 5'-GMP i 5'-IMP (nastao deaminiranjem 5'-AMP-a) koriste u prehrambenoj industriji kao pojačivači okusa hrane, a 5'-CMP i 5'-UMP su važni za farmaceutsku industriju (Beluhan, 2001a).

Naime, 5'-GMP i 5'-IMP su uz natrijev glutaminat (engl. monosodium glutamate, MSG) sastavni dio umami (jap. jedinstven, neponovljiv) okusa i pojačavaju okus do razina viših od praga okusa, te se, kao pojačivači okusa hrani koriste u proizvodnji gotove ili smrznute gotove hrane (Nagodawithana, 1995). Kako se RNA može izolirati iz otpadnog pivskog kvasca, a 5'-fosfodiesteraza iz sladnih klica, dogovorom između pivovara i sladara, mogli bi se proizvoditi 5'-ribonukleotidi. Time bi se povećala ekonomičnost proizvodnje piva i slada te proizveo novi visokovrijedni proizvod (Beluhan, 2001a).

Pivski trop

Jedan od najznačajnijih nusproizvoda proizvodnje piva je pivski trop, koji nastaje nakon procesa komljenja, odnosno filtriranjem komine. To je najznačajniji proces u proizvodnji sladovine, tijekom kojeg se odvija miješanje vode i usitnjenog slada, što rezultira

ekstrakcijom topljivih sastojaka slada u sladovinu. Vodena otopina ekstrahranih sastojaka slada je sladovina, a ostali sastojci čine trop (Beluhan, 2001a).

Pivski trop može biti svježi (mokri) i suhi. Mokri pivski trop predstavlja ostatak prilikom proizvodnje piva, a sastoji se od ječmenog slada i zrna ječma. Sadrži visok postotak vode (75 – 80%). Kao takav, podložan je mikrobiološkoj kontaminaciji te se mora pohraniti u roku 4 do 6 dana jer inače može izazvati probavne probleme u životinja. Suhi pivski trop se dobije sušenjem svježeg/mokrog (Beluhan 2001a).

Trop je lignocelulozni materijal, bogat proteinima koji čine 20% i vlaknima koja čine 70% sastava pivskog tropa. Nakon ekstrakcije i ispiranja na svakih 100 kg slada upotrijebljenog za ukomljavanje zaostaje 125 - 130 kg vlažnog tropa (75 - 80% vode). U tropu, zaostaje 20 - 25% od ukupne suhe tvari slada. Industrije piva vlažni trop najčešće prodaju kao stočnu hranu ili ga suše tako što prešanjem uklone 40 - 50% prisutne vode, a zatim suše pri 60°C do 8 - 10% vode. Za sušenje 1 kg vlažnog tropa potrebno je oko 0,6 kg pare. Voda koja se pri tome izdvoji sadrži oko 5% fine proteinske tvari. Oko 65% se izdvaja centrifugiranjem i dodaje tropu kako bi se povećao njegov sadržaj proteina (Kerby i Vriesekoop, 2017). Pivski trop je nusproizvod koji nastaje u velikim količinama tokom cijele godine, a zbog svog visokog udjela proteina i ugljikohidrata se može koristiti i kao sirovina u biotehnologiji (za proizvodnju fenolnih kiselina, mliječne kiseline, bioplina, bioetanola, ksilitola, pululana te kao podloga za uzgoj mikroorganizama i proizvodnju enzima), ali i kao dodatak ili nosač za imobilizaciju stanica kvasca pri fermentaciji piva. Koristi se i kao hrana za stoku, dodatak proizvodima namijenjenim za ljudsku prehranu, sirovina za proizvodnju građevinskog materijala, ugljena, papira, energije, no ima i potencijal za primjenu kao adsorbent (Beluhan, 2001a).

Otpadni kvasac

Stanice kvasca se razmnožavaju za vrijeme fermentacije što rezultira znatno većom masom kvasca od one koja se inokulira na početku fermentacije. Na brzinu rasta kvasca utječu različiti fermentacijski uvjeti pojedine pivovare (Kerby i Vriesekoop, 2017). Nakon završetka vrenja, po 1 hL mladog piva, zaostaje 1,5 - 2,0 kg otpadnog (vlažnog) kvasca sa 12 - 15% suhe tvari. Talog otpadnog kvasca sadrži 45 - 60% piva, koje se separacijom ili filtracijom

izdvaja. Otpadni kvasac je visokovrijedan izvor proteina i vitamina, naročito B skupine, stoga se nakon sušenja koristi kao krmni ili prehrambeni kvasac. Kvasac koji je namijenjen za upotrebu u prehrambenoj industriji ispire se natrijevim bikarbonatom da bi se uklonila gorčina. Otpadni se kvasac koristi za proizvodnju kvaščevog ekstrakta, izolaciju 3,5' - nukleotida ili direktno u proizvodnji juha, umaka, keksa, kruha, mesnih prerađevina i medicinskih preparata (Beluhan, 2001b).

2.4. PLIJESNI U INDUSTRIJI SLADA I PIVA

Plijesni koje se najčešće mogu pronaći na polju, a kontaminiraju ječam i pšenicu, uključuju vrste rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Cladosporium*, pri čemu najveće probleme u sladarstvu i pivarstvu predstavljaju plijesni roda *Fusarium* (Papadopoulou i sur., 1999). Šarža zrna ječma ili pšenice koja je prihvatljiva po svim drugim pokazateljima kakvoće, a inficirana plijesnima iz roda *Fusarium*, odbija se na ulazu u sladaru (Schwarz, 1997). Primjena kontaminiranog slada u proizvodnji piva uzrokuje različite probleme, kao što su promjena u boji i sastavu sladovine, prisutnost metabolita plijesni (mikotoksini), ali i pojavu prekomjernog pjenjenja piva. Mikrobna kolonizacija zrna ječma većinom je usmjerena na vanjski sloj zrna, na pljevicu i na prostor između pljevice i perikarpa, no događa se da prodru i u endosperm (Van Nierop i Rautenbach, 2006). Plijesni roda *Fusarium*, prema istraživanju koje su proveli Schwarz i sur. (2002), sintetiziraju amilolitičke i proteolitičke enzime, točnije, primijećeno je da kod zrna ječma koja su inficirana plijesnima roda *Fusarium* dolazi do razgradnje škroba u endospermu, te da nedostaje proteinski matriks koji obavija granule škroba.

Neki od najvažnijih čimbenika koji utječu na razvoj plijesni su temperatura i sadržaj vode. Plijesni su većinom mezofili, tj. rastu pri sobnoj temperaturi. Optimalna temperatura za rast većine plijesni je između 25 i 30°C, dok nekolicina raste i na višim temperaturama od 35 do 37°C (Filtenborg i sur., 2004). Svim plijesnima potreban je optimalan aktivitet vode (aw) za njihov rast. Upravo zbog toga, plijesni napreduju tijekom procesa slađenja. Niske temperature (12 - 16°C) i visoka vlažnost zraka (>80%) tijekom močenja i klijanja uzrokuje proliferaciju micelija plijesni te produkciju mikotoksina. Do danas je otkriveno preko 100 000 vrsta plijesni, te se čak više od 400 vrsta smatra toksičnima, dok je samo za 5% poznato da

proizvode toksične tvari (mikotoksine), koje imaju neželjen učinak kako na životinje tako i na čovjeka (Oliveira i sur., 2013). Plijesni roda *Fusarium* su najčešće prisutne plijesni na žitaricama u našem podneblju koje uzrokuju kontaminaciju piva (Jurković i sur., 1998). Najvažniji predstavnici roda *Fusarium*: *F. acuminatum, F. avanceum, F. cerealis, F. chlamydosporum, F. culmorum, F. graminearum, F. heterosporum, F. oxysporum, F. poae, F. proliferatum, F. sambucinum, F. semitectum, F. sporotrichoides, F. roseum, F. tricintum, F. verticilioides*, i dr. (Logrieco i sur., 2003).

F. graminearum i *F. culmorum* najčešći su patogeni na našem području i nazivamo ih agresivnim plijesnima. *F. graminearum* je patogen odgovoran za povremene pojave fuzarioze klasa pšenice. Šarža zrna koja je prihvatljiva po svim drugim pokazateljima kakvoće, a kontaminirana je plijesnima, pogotovo iz roda *Fusarium*, smatra se nepogodnom za slađenje (Schwarz i sur., 1997). U Hrvatskoj je zastupljeno više vrsta plijesni roda *Fusarium*, a za područje Istočne Hrvatske prevalentna vrsta je *F. graminearum* (Jurković i sur., 1998; Krstanović i sur., 2005). Prilikom jake kontaminacije, prinosi mogu biti smanjeni i do 30% uz značajno pogoršanje pekarske, pivarske i stočne kvalitete zrna. Takve plijesni mogu preživjeti i duže od godinu dana u površinskom sloju tla i pri tome ostati aktivne (Teich, 1989). Prelaze iz tla u biljku u kojoj su latentno prisutne gdje luče svoje toksine od kojih je najrelevantniji deoksinivalenol koji direktno utječe na narušavanje kvalitete piva.

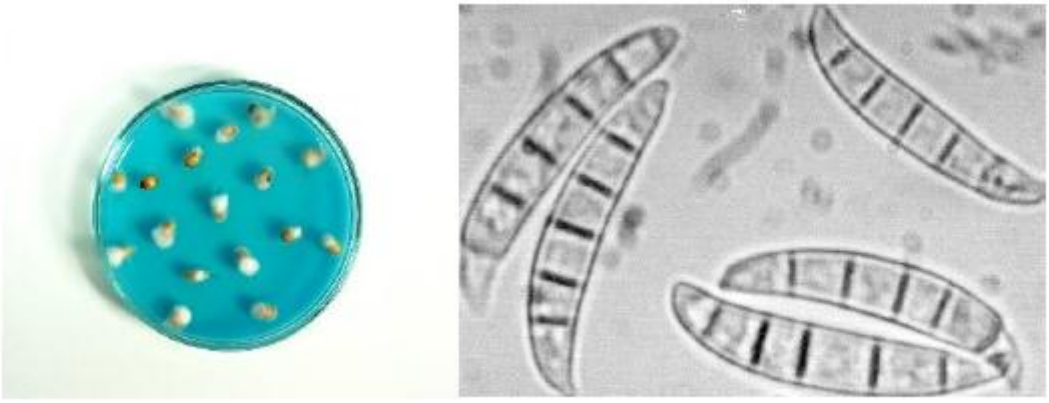
Identifikacija plijesni roda *Fusarium* je komplicirana zbog velike razlike u morfološkim i nemorfološkim karakteristikama rodova, zbog čega se za nedvosmisleno dokazivanje koriste molekularne metode poput PCR-a (lančane reakcije polimerazom).

2.4.1. Fusarium culmorum

Ovo istraživanje bavilo se utjecajem plijeni *F. culmorum* na mikotoksikološku ispravnost nuspoizvoda koji nastaju tijekom proizvodnje slada i piva. *F. culmorum* pripada sekciji Discolor i vrlo je čest kontaminant žitarica na našem području *F. culmorum* proizvodi kratke, zdepaste makrokonidije debelih stijenki (Slika 2) čija je površina sa prednje i stražnje zaobljena (Nelson i sur., 1983). Brzo stvara mnogobrojne klamidiospre, a može se pojaviti kao jedinka, u obliku nakupina (eng. *clumps*) ili lanaca. Rast bijelog zračnog micelija na krumpirovom agaru je izrazito brz. Mogu se javiti i crveno-smeđi ili narančasti pigmenti

tijekom starenja micelija, agarna podloga za to vrijeme poprima jarko crvenu boju (eng. *carmine red*). Inače, *F. culmorum* prevladava u hladnijim, sjevernijim dijelovima Europe (sjeverna, centralna i zapadna Europa) te u Kanadi (Demeke i sur., 2005), ali se obzirom na globalne klimatske promjene sve više povlači pred drugim čestim kontaminantom iz istog roda *F. graminarum*.

F. culmorum proizvodi spore (konidije) koje se vjetrom ili kišom raspršuju na žitarice u cvatnji. Uspješnost infekcije ovisi o klimatskim uvjetima iz godine u godinu, a najviše se oslanja na visoke temperature i visoku vlažnost zraka (Lacey i sur. 1999; Brennan i sur., 2005). Plijesan *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (telemorf nepoznat) uzrokuje različite probleme tijekom slađenja i proizvodnje piva: smanjuje kakvoću sirovine (slabija nalivenost zrna, smanjenje udjela endosperma, narušen odnos škrob:proteini), uzrokuje tehnološke gubitke (smanjen udio ekstrakta, pojačano pjenjenje piva), te sintetizira mikotoksine (trihotecene, zearalenon) koji narušavaju zdravstvenu ispravnost slada.



Slika 2. Zrna pšenice kontaminirane plijesni *F. culmorum* na selektivnoj podlozi i izgled njenih makrokonidija

2.5. *FUSARIUM* MIKOTOKSINI U PROIZVODNJI SLADA I PIVA

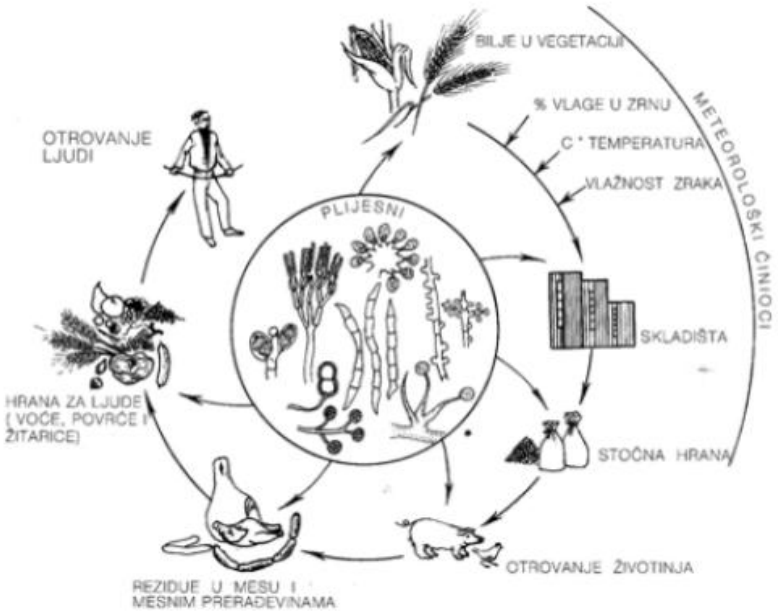
Mikotoksini (*mykes* - grč. gljiva, *toxikon* - grč. otrov) su toksični sekundarni metaboliti većeg broja plijesni koji putem kontaminirane hrane inficirane sporama, konidijama i/ili fragmentima micelija dospijevaju u organizam ljudi i životinja. Unosom toksina plijesni u

organizam ljudi i životinja nastaju intoksikacije, odnosno mikotoksikoze koje, s činjenicom da su vezane za hranu, mogu poprimiti široke razmjere (Bennet i Klich, 2003).

Mikotoksikoze se manifestiraju kao akutna i kronična toksičnost, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, citotoksičnost, teratogenost, kancerogenost, mutagenost i druge posljedice, te mogu dovesti i do smrti (Mayer i sur., 2008; Diaz, 2005). Do razvoja bolesti dolazi nakon unošenja mikotoksina hranom u organizam bilo gastrointestialnog trakta, udisanjem kontaminirane prašine putem pluća, preko oštećene kože ili intravenozno (kod korisnika onečišćenog heroina). Danas se akutne mikotoksikoze javljaju većinom u zemljama lošeg poljoprivredno - veterinarskog standarda, prerade, transporta i skladištenja hrane biljnog i životinjskog podrijetla (HAH, 2014).

Mikotoksini nemaju funkciju pri rastu i razvoju plijesni, ali su korisni u obrani od drugih organizama, što uključuje i druge plijesni. Biosinteza mikotoksina ovisi o uvjetima okoline, tj. o fizikalno - kemijskim parametrima (količini slobodne vode – aw, količini kisika, kemijskom sastavu, temperaturi, pH supstrata, razini oksidativnog stresa i inhibitorima/aktivatorima enzima za biosintezu sekundarnih metabolita kao i transkripcijskim faktorima), no ovisi i o genetskoj predispoziciji soja plijesni da stvori sekundarne metabolite na povoljnom supstratu, kao i epigenetskim faktorima (povećanje metilacije gena za sekundarni metabolizam kod povoljnih uvjeta za rast i razvoj plijesni bez prirodne kompeticije). Optimalna temperatura za proizvodnju većine mikotoksina je između 20 i 30°C, dok bi aktivitet vode trebao biti iznad 0,7. Plijesni rastu u širokom rasponu pH, iako im izrazito kisela ili bazična podloga ne odgovara (Bennett i Klich, 2003).

U prehrambenom lancu čovjeka ili životinja mogu se naći direktnom ili indirektnom kontaminacijom (Slika 3). Ako se radi o direktnoj kontaminaciji, prehrambeni materijal je kontaminiran mikotoksikogenim plijesnima, dok do indirektne kontaminacije dolazi najčešće konzumacijom jaja, mlijeka ili mesa životinja koje su konzumirale hranu kontaminiranu mikotoksinima. Budući da plijesni proizvode mikotoksine, jedini način da oni dospiju u hranu je prilikom kontaminacije hrane plijesnima. Ukoliko se uspješno spriječi porast plijesni pri svim stupnjevima proizvodnje hrane, problem kontaminacije mikotoksinima bi nestao (Murphy i sur., 2006).



Slika 3. Put mikotoksina u hranidbenom lancu

(Ožegović i Pepeljnjak,1995)

Na samom polju, ali i prilikom skladištenja, mikotoksini kontaminiraju žitarice, a neki od najznačajnijih jesu aflatoksini B1 i M1 (AFB1, AFM1), zearalenon (ZEA), ohratoksin A (OTA), fumonizini B1 i B2 (FB1, FB2), trihoteceni (deoksinivaleonol (DON), T-2 i HT-2 toksini), patulin (PAT), te citrinin (CIT). Neka istraživanja su pokazala da je čak više od 25% usjeva na svjetskoj razini kontaminirano mikotoksinima (Charmley i sur., 1995), dok su novija istraživanja pokazala da je ta brojka puno veća, odnosno da doseže čak 90% (Streit i sur., 2013). Kontaminirajući pšenicu i druge žitarice koje se koriste u proizvodnji piva, mikotoksini prelaze u sladovinu te u pivo. Njihova koncentracija tijekom proizvodnje se uglavnom smanjuje, ali neki vodotopljivi i termostabilni mikotoksini kao što su DON i ostali trihoteceni grupe B, zaostaju u svim fazama proizvodnje piva. Kako bi se osigurala zadovoljavajuća kvaliteta zrna, kontaminaciju plijesnima najbolje je spriječiti već u polju i to primjenom različitih mjera (genetska otpornost, zaoravanje žetvenih ostataka, primjena fungicida i izmjena usjeva), te onemogućiti njihov daljnji razvoj prilikom skladištenja i slađenja pšenice.

2.6. *FUSARIUM* MIKOTOKSINI

Plijesni roda *Fusarium* sintetiziraju slijedeće mikotoksine:

I. Fumonizini (*F. verticillioides, F. proliferatum*),
II. Zearalenon (*F. roseum, F. cerealis*),
III. Moniliformin (*F. subglutinaus, F. avenaceum*) i
IV. Trihoteceni (*F. culmorum, F. graminearum*):
    - T-2 i HT-2 toksin (*F. poae, F. sporotrichioides*),
    - Diacetoksiscirpenol (DAS) i monoacetoksiscirpenol (*F. poae, F. sporotrichioides*),
    - Neosolaniol (*F. sporotrichioides, F. poae, F. acuminatum*),
    - Deoksinivalenol (DON) (*F. graminearum, F. culmorum*),
    - Nivalenol (NIV) (*F. cerealis, F. poae, F. graminearum, F. culmorum*) (Logrieco, 1990).
    - Fuzarenon X (FUS X),
    - 3-acetildeoksinivalenol (3-AcDON) i 15-acetildeoksinivalenol (15-AcDON).

Najznačajniji *Fusarium* toksini uključuju nivalenol (NIV), deoksinivalenol (DON), T-2 toksin (T-2), HT-2 toksin (HT-2), zearalenon (ZEA), fuzarenon X (FUS X), diacetoksiscirpenol (DAS), 3-acetildeoksinivalenol (3-AcDON) i 15-acetildeoksinivalenol (15-AcDON) te fumonizine. Akutno trovanje fumonizinima kod domaćih životinja izaziva tzv. „konjsko ludilo“ (leukoencefalomalacija, fatalna bolest mozga) i svinjski pulmonarni edem. Akutno visoki unos T-2 toksina najčešće izaziva gastrointestinalne i imunotoksične posljedice. Više doze DON-a se povezuju s epidemijama bolesti probavnog trakta kod ljudi, a djeluje i imunotoksično. ZEA je endokrini disruptor zbog građe slične estrogenu (Klapec i Šarkanj, 2012).

2.6.1. Trihoteceni

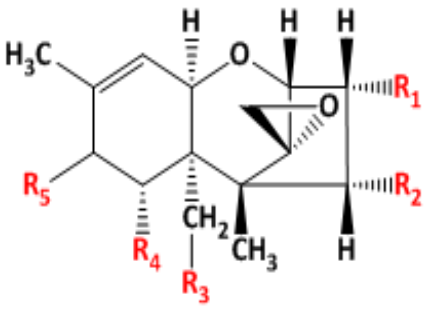
Trihotecene biosintetiziraju plijesni rodova *Fusarium* (*F. culmorum, F. graminearum*, *F. sporotrichioides, F. poae*), *Cylindrocarpon, Cephalosporium, Myrothecium, Trichothecium,*

Trichoderma, Stachybotrys i *Verticimonosporium*. Oko 170 različitih sekundarnih metabolita čine skupinu trihotecena (Duraković, 2003). Prvi toksin koji je bio izoliran iz ove skupine je trihotecen iz plijesni *Trichotecium roseum*, 1949. godine, iako je tada daljnje istraživanje, zbog njegove toksičnosti, bilo obustavljeno stoga se tek 1971. godine objavilo njegovo otkriće (Plavšić i Žuntar, 2006). Podijela trihotecena je na makrocikličke i nemakrocikličke trihotecene. Najčešći su nemakrociklički trihoteceni, a dijele se na grupe:

- Tip A, posjeduju vodik ili ester na C-8 poziciji, uključuju T-2 toksin, HT-2 toksin, neosolaniol, DAS;
- Tip B, sadrže keton i uključuju 3-AcDON, 15-AcDON, DON, NIV i fuzarenon X (Bennett i Klich, 2003).

Kemijska struktura trihotecena prikazana je na Slici 4. Treća grupa trihotecena ima na C-7, 8 ili C-9, 10 drugi epoksidni prsten, a četvrta skupina trihotecena (tip D) posjeduje makrociklički prsten između C-4 i C-15 s dvije ester veze (Eriksen, 2004). Rod *Fusarium* ne producira trihotecene tipa C i D (Eriksen, 2004).

Postoji osnovni spoj trihotekan, strukture tetracikličkog trpenoida koja uključuje šesteročlani prsten s kisikom, epoksid u položaju 12, 13 te u položaju 9,10 dvostruku vezu koja može biti supstituirana drugim epoksidom. Iz osnovnog spoja trihotekana se izvode svi trihoteceni što se može vidjeti na Slici 4 (da Rocha i sur., 2014). Trihoteceni također imaju i supstituente koji u jednom ili više položaja (3, 4, 7, 8, 15) sadrže kisik, te mogu biti esterificirani na hidroksilnoj, keto ili epoksidnoj skupini ili njihovoj kombinaciji. (Desjardins i Proctor, 2007).



Trihoteceni		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
A	HT-2	-OH	-OH	-OAc	-H	$-OCOCH_2CH(CH_3)_2$
	T-2	-OH	-OAc	-OAc	-H	$-OCOCH_2CH(CH_3)_2$
	DAS	-OH	-OAc	-OAc	-H	-H
B	DON	-OH	-H	-OH	-OH	=O
	3-AcDON	-OAc	-H	-OH	-OH	=O
	NIV	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
	FUSX	-OH	-OAc	-OH	-OH	=O

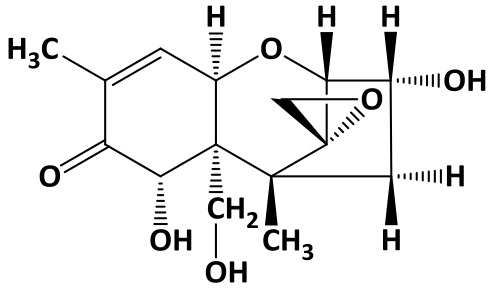
Slika 4. Struktura trihotecena

U žitaricama kao što su pšenica, ječam, raž, zob i kukuruzu se većinom nalaze trihoteceni, te tako dospijevaju i u prehranu čovjeka (brašno, slad, pivo, kukuruzne pahuljice, hrana za novorođenčad i ostalo) ali i u ishranu životinja (krmne smijese). Nakon konzumacije pšenice, kukuruza ili riže koji su kontaminirani nekim trihotecenom (DON, NIV, T-2, HT-2), potrebno je otprilike sat vremena do pojave prvih simptoma trovanja kao što su abdominalni bolovi, dijareja, mučnina, povraćanje te vrtoglavica (Peraica i Domijan, 2008).

Trihoteceni su snažni inhibitori sinteze proteina kod eukariota, oštećuju stanice timusa, crijeva, slezene te limfnih žlijezda (Šarkanj i sur., 2010). T-2 se smatra najtoksičnijim trihotecenom koji već pri 0,5 mg ima akutno djelovanje na imunološki sustav životinje, dok je DON predstavnik koji je manje toksičan te pri unosu malih koncentracija uzrokuje samo odbijanje hrane kod životinja (Ehling i sur., 1997).

Deoksinivalenol (DON)

Molekularna formula DON-a je $C_{15}H_{20}O_6$, njegov kemijski naziv 12,13-epoksi-3α,7α,15-trihidroksi trihotec-9-en-8-on, a kemijska struktura je prikazana na Slici 6. Prilično je stabilan kada se radi o visokoj temperaturi (120°C) koja se postiže prilikom prerade, mljevenja i skladištenja. Deoksinivalenol je topljiv u svim polarnim otapalima, npr. vodi, etanolu, acetonitrilu, etilacetatu.



Slika 5. Kemijska struktura deoksinivalenola, DON

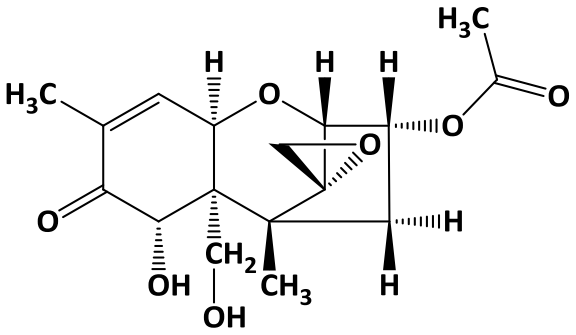
Deoksinivalenol (Slika 5), poznat i pod nazivom vomitoksin, je sekundarni metabolit kojeg produciraju plijesni *F. culmorum, F. graminearum* i ostale. U samoj proizvodnji hrane,

DON dospijeva u prehrambene proizvode (pivo, slad, kruh) upotrebom žitarica koje su kontaminirane jer je prisutan u žitaricama kao što su pšenica, kukuruz, ječam, raž, zob i riža. Također se DON može pronaći i u proizvodima životinjskog podrijetla (npr. mlijeko i meso) u značajno nižim koncentracijama (Cavret i Lecouer, 2006). Razine DON-a u žitaricama koje su prerađene (pekarski proizvodi, kruh, tjestenina) razina zastupljenosti DON-a je znatno niža od vrijednosti koje se mogu naći u neprerađenim žitaricama ili u samim proizvodima neprerađenih žitarica (EFSA 2013).

Izloženost DON-u u zemljama Srednjeg Istoka i Afrike, prema FAO, 2016., iznosi 0,77-2,4 μg/kg tjelesne mase, dok je u Americi taj broj manji 0,49 μg/kg tjelesne mase (Sudakin, 2003; US Department of Agriculture, 1996). Za ljudsku populaciju privremeni prihvatljivi dnevni unos (TDI) DON-a je 2002. godine postavio Znanstveni odbor za hranu (Scientific Committee on Food), a on iznosi 1 μg/kg tjelesne mase u danu (EFSA, 2013). Kronična doza DON-a u životinja bi bila između 3,9 i 43,3 μg/kg tjelesne mase, dok se za akutnu dozu procjenjuje da je to između 11,6 i 137,9 μg/kg tjelesne mase (EFSA, 2013).

Od svih mikotoksina koje produciraju plijesni roda *Fusarium*, jedan od najvažnijih pokazatelja kvalitete i sigurnosti slađenja pšenice je deoksinivalenol (Salas i sur., 1999). Mikotoksini koji su prisutni u sirovini (pšenici ili ječmu) prelaze u slad, te u daljnjem procesu proizvodnje lako završavaju u konačnom proizvodu (pivo), a tada je pivo kontaminirano ovim mikotoksinom moguća prijetnja za ljudsko zdravlje. (Vaughan i sur., 2005). Istraživanje je pokazalo da 80-93% DON-a iz slada može prijeći u pivo (Schwarz i sur., 1995).

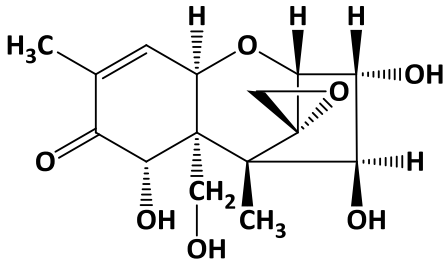
3-acetil-deoksinivalenol (3-AcDON)



Slika 6. Strukturna formula 3-acetil-deoksinivalenola

Molekulske formule $C_{17}H_{22}O_7$ i relativne molekulske mase 338,4 g/mol. Strukturna formula 3-AcDON molekule je prikazana na Slici 6. 3-AcDON se uz DON najčešće pojavljuje u žitaricama (Berthiller i sur., 2012). Topljiv je u organskim otapalima (metanol, acetonitril, etil acetat) dok je u vodi njegova topljivost nešto lošija nego kod DON-a (Weidenbomer, 2001).

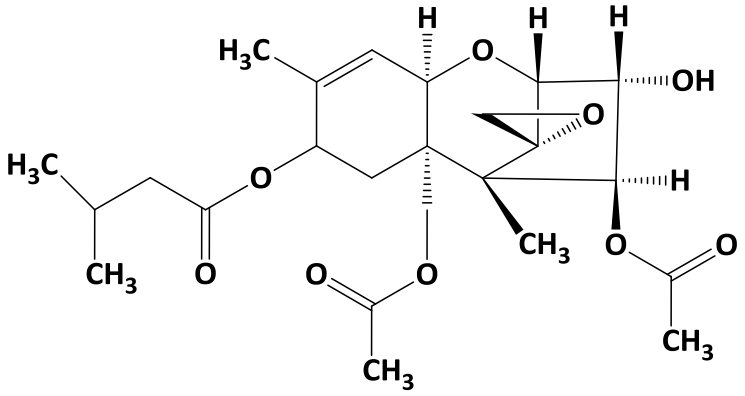
Nivalenol (NIV)



Slika 7. Strukturna formula nivalenola

Molekulske formule $C_{15}H_{20}O_7$ i relativne molekulske mase 313,2 g/mol. Nivalenol (Slika 7) ima štetno djelovanje zato što je imunotoksičan, hematoksičan, embrio i fetotoksičan, te uzrokuje smanjenu želju za unosom hrane kod ljudi i životinja, a time i smanjenje tjelesne mase (Rai i Varma, 2010). Kao i 3-AcDON, manje je topljiv u vodi u odnosu na DON, a u metanu i diklormetanu je dobro topljiv (Weidenbomer, 2001).

T-2 toksin



Slika 8. Struktura T-2 toksina (R_1=OAc)

Molekulske formule $C_{24}H_{34}O_9$ i relativne molekulske mase 466,57 g/mol (Slika 8). Dobro topljiv u metanolu, diklormetanu i dimetilsulfoksidu, a slabo topljiv u vodi. Vjeruje se da kod životinja i ljudi uzrokuje zaostatak u rastu, povećanu podložnost raznim infekcijama, leukopeniju/smanjenu produkciju antitijela.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je pomoću LC-MS/MS tehnike ustanoviti utjecaj infekcije pšenice s plijesni *Fusarium culmorum* na mikotoksikološku ispravnost nusproizvoda koji nastaju tijekom proizvodnje slada i piva (vode od močenja, klice, pivskog tropa i pivskog kvasca).

Provedeno je mikroslađenje uzoraka pšenice koja je na polju tretirana sa 4 različita tretmana.

3.2. MATERIJALI I METODE

Analize koje su se provodile, rađene su na dva hrvatska genotipa pšenice dobivene sa Poljoprivrednog Instituta Osijek. Inokulacija sporama plijesni *F. culmorum* je izvršena na polju, rasprskavanjem makrokonidija u fazi cvatnje. U ovom su istraživanju analizirani genotip OSK. 110/09, osjetljiviji na infekciju plijesni iz roda *Fusarium* i Lucija, manje osjetljiv genotip na plijesni roda *Fusarium*. Primijenjeni fungicid bio je Prosaro® 250 (protiokonazol (125 g/L), tebukonazol (125 g/L)) (Bayer Crop Science, Njemačka). Nusproizvodi dobiveni nakon provedenog slađenja i proizvodnje piva su analizirani za mikotoksine kako je opisano u daljnjem tekstu.

Svaki genotip tretiran je na polju s četiri tretmana:

- kontrolni uzorak (1),
- tretiran s fungicidom Prosaro® 250 (2),
- inficirano *F. culmorum* sporama (10^6 konidija po mL) i tretirano fungicidom Prosaro® 250 (3),
- inficirano *F. culmorum* sporama (10^6 konidija po mL) (4)

3.2.1. MIKROSLAĐENJE

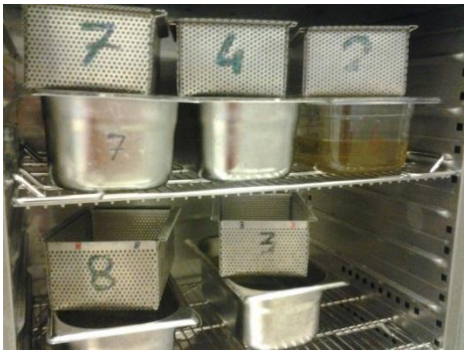
Mikroslađenje (MEBAK®, 2011) je provedeno u laboratorijskom inkubatoru (ClimaCell, MMM MedcenterEinrichtungen, München, Njemačka; Slike 9 i 10). Petsto grama

pšenice natopljeno je u 500 mL vode iz slavine prema standardnom postupku opisanom u MEBAK-u® (2011).

Standardno mikroslađenje je provedeno postupkom mikroslađenja koji je usvojila Srednjeeuropska komisija za pivarsku analitiku - Middle European Brewing Analysis Commission (MEBAK®). Mikroslađenje je postupak koji je razrađen za pivarski ječam te se za potrebe slađenja pšenice moraju izvršiti male korekcije vlažnosti (MEBAK®, 2011). Korekcije se izvršavaju jer zrno pšenice ne sadrži pljevicu, posljedično tome, takvo zrno može vrlo brzo primiti vodu te se vrijeme namakanja može skratiti, a stupanj relativne vlažnosti zraka pri klijanju smanjiti (Sacher, 1998). Prilikom provođenja modificiranog postupka slađenja promijenjeni su parametri temperature klijanja i vrijeme zadržavanja zrna na pojedinoj temperaturi. Sušenje je provedeno u sušioniku sa ventilacijom (UFE 500, Memmert, Njemačka) prema MEBAK® (2011) shemi sušenja. Otklicavanje, uklanjanje korijenčića i sladne klice, izvršeno je ručnim postupkom.



Slika 9. CLIMACELL komora



Slika 10. Slađenje pšenice u CLIMACELL komorici

Za ovo istraživanje proveden je modificirani postupak mikroslađenja za pšenicu u kojima su mijenjani pojedini parametri što je opisano u tablici 1.

Tablica 1. Shema mikroslađenja pšenice za proizvodnju pšeničnog slada

Močenje					
Procesni parametri					
t / h	T / °C	$t_{pod\ vodom}$ / h	$t_{na\ zraku}$ / 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 klijalištu; (3) močenje orošavanjem					
Klijanje					
Procesni parametri					
t / h	T / °C	Rh_{zraka} / %	Napomena		
72	14	85	(3); (4); (5)		
(3) močenje orošavanjem; (4) podešavanje vlažnosti zrna do udjela vode od 44,5% prskanjem; (5) prevrtanje gomile dva puta dnevno					
Sušenje					
Procesni parametri					
t / h	T / °C	Napomena			
16	50	(6)			
1	60 (H_2O < 10%)				
1	70				
1	80				
(6) vrijeme sušenja 19 h, prema standardnom postupku sušenja za svijetli slad prema MEBAK-u					

Voda dobivena nakon močenja je smrznuta do postupka analize. Slad je nakon sušenja u sušioniku odvojen od klice/korjenčića, te pakiran u papirnate vrećice i čuvan na

sobnoj temperaturi tri tjedna kako bi postigao ravnotežnu vlažnost. Klice/korijenčići su pakirani i smrznuti do postupka analize.

Pšenično pivo proizvedeno je prema MEBAK® (2011). Ukomljavanje i fermentacija provedeni su kako je dolje opisano.

3.2.2. PROIZVODNJA PIVA

Osušeni pšenični slad je samljeven u laboratorijskom mlinu (Newman Industries, Sale Creek, TN). Na 50 g slada pšenice dodano je 200 mL vode (45±1°C). Mješavina je stavljena u vodenu kupelj (Lochner Labor und Technic, Berching, Njemačka) kroz 30 minuta uz stalno miješanje (80-100 o/min). Tijekom idućih 25 minuta, temperatura komine povećana je na 70°C, što je približno povećanje temperature od 1°C po minuti. Kada je postignuta odgovarajuća temperatura, dodano je 100 mL vode temperature 70°C. Komina se držala na toj temperaturi sat vremena nakon čega je ohlađena na sobnu temperaturu i filtrirana kroz nabrani filter papir. Uzorci pivskog tropa zamrznuti su do daljnje mikotoksikološke analize.

Vrenje sladovine provedeno je prema metodi određivanja graničnog stupnja prevrenja sladovine i piva (MEBAK®, 2011). U erlenmeyerovu tikvicu preneseno je 200 mL sladovine i inokulirano s 15 g kvasca *Saccharomyces uvarum* (dobiven iz Osječke pivovare). Na tikvicu je postavljena vrenjača. Fermentacija na sobnoj temperaturi je uslijedila uz stalno miješanje kroz 24 sata. Nakon što je fermentacija završena, pivo je dekantirano od otpadnog kvasca. Uzorci otpadnog kvasca su zamrznuti su do daljnje analize.

3.2.3. ANALIZA MIKOTOKSINA U NUSPROIZVODIMA NASTALIM TIJEKOM SLAĐENJA I PROIZVODNJE PIVA

Analiza mikotoksina provedena je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayer u Osijeku, u laboratoriju Katedre za biokemiju i toksikologiju. Prilikom analize korišten je standard trihotecena skupina A i B + ZEA u acetonitrilu Mix 4 (Biopure, Romer Labs, Tulln, Austrija). Ultra čista voda za pripremu otopina i mobilne faze je pročišćena reverznom osmozom i Millipore Simplicity System (EMD Milipore Darmstadt, Njemačka) uređajem. Organska otapala (acetonitril, metanol) korištena za ekstrakciju,

pripremu kalibracijskih otopina i/ili mobilnih faza bila su HPLC čistoće (J.T. Baker, Ceveted, Nizozemska). Također su korištene mravlja kiselina i amonijak HPLC čistoće.

Priprema uzoraka za LC-MS/MS analizu

Uzorci pšenice Lucija i OSK. 110/09 pripremljeni su prema metodi koju su u svom radu koristili Ren i sur. (2007). Prema protokolu, 10 g uzorka (klica, kvasac i trop) samljeveno je korištenjem laboratorijskog mlina tijekom 1 minute (M20, Ika, Staufen, Njemačka). Zatim je dodano 40 mL acetonitrila (92%-nog) te je izvršena ekstrakcija u laboratorijskom blenderu (LB10S, Waring, USA) u trajanju od 3 min (Slika 11). Dobivenoj smjesi je prije filtracije dodano 40 mL acetonitrila te je sve filtrirano preko filter papira (Glass Microfibre Filters, Whatman International Ltd Maidstone, Engleska).



Slika 11. Ekstrakcija u laboratorijskom blenderu

Zatim je, 15 mL dobivenog filtrata pročišćeno na SPE koloni (AflaZon 226+; Romer Labs, Tulln, Austrija), a 6 mL eluata podvrgnuto otparavanju na termobloku (Labnet, AccuBlock, USA) na 50 °C u struji dušika analitičke čistoće (5.0) (Messer, Hrvatska). Dobiveni kristalići su rekonstituirani sa 400 µL mobilne faze (A (vodena otopina mravlje kiseline koncentracije 10 mmol/L) : B (metanolna otopina mravlje kiseline koncentracije 10 mmol/L) u omjeru 50 : 50). Nakon rekonstitucije uzorak je analiziran na LC-MS/MS uređaju. Ovim postupkom pripremljeni su svi kruti uzorci.

Tekući uzorci pripremljeni su na način da je 15 mL uzorka miješano u laboratorijskom mikseru sa 15 mL acetonitrila tijekom 3 minute. Nakon toga se slijedila prethodno opisana procedura. Uzorci koji su sadržavali CO_2 prethodno su podvrgnuti otplinjavanju tijekom 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin, Sonorex Super RK 100 H).

LC-MS/MS sustav se sastojao od Perkin Elmer Series 2000 binarne pumpe s autosamplerom, kolonskom pećnicom (45° C), vakuum rasplinjačem i masenog spektrometra API 2000 Triple-quadrupole MS (Sciex, Foster City, California, USA) opremljenog Analyst version 1.4.2 softverom.

Tablica 2. LC-MS/MS uvjeti optimizirani za kvantifikaciju odabranih *Fusarium* mikotoksina

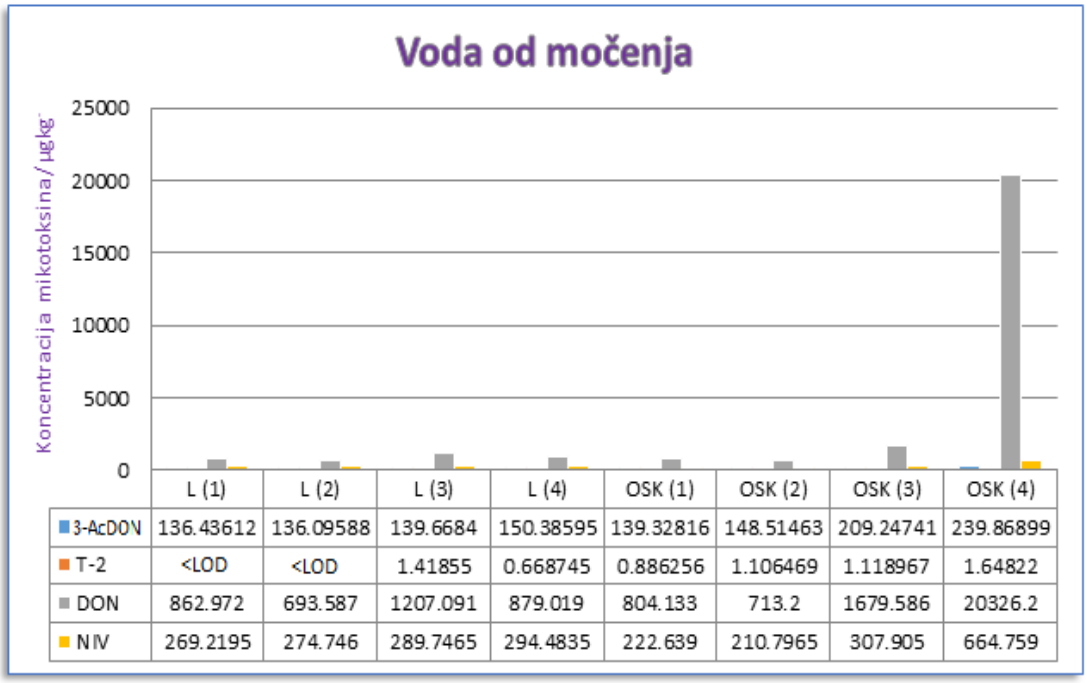
Mikotoksin	Polarizacija ionizacije	Vrijeme zadržavanja / min	DP / V	FP / V	EP / V	CE / V	CXP / V	LOD µg/ kg	LOQ µg/ kg	REC %
NIV	-	2.39	-19.5	-367.9	-9.8	-16.5	-17.0	0.65	2.17	60
DON	-	2.49	-15.4	-353.3	-6.9	-16.0	-15.2	1.86	6.19	100
FUS-X	+	2.61	19.4	370.8	9.1	13.5	9.1	0.04	0.14	66
3-ADON	+	3.11	36.2	392.1	5.4	19.3	10.1	0.34	1.12	90
DAS	+	14.86	14.0	374.6	8.6	22.4	8.2	1.55	5.15	84
HT-2	+	18.40	44.7	247.2	8.1	28.1	11.4	0.34	1.12	64
T-2	+	19.60	55.4	271.7	10.1	47.3	13.2	0.02	0.07	60
ZEA	-	19.80	-152.0	-395.7	-4.5	-38.2	-52.2	0.65	2.17	15

DP¸= Napon za razbijanje; FP = Napon za lokaliziranje; EP = Ulazni napon; CE = Kolizijska energija; CXP = Izlazni potencijal kolizijske ćelije; LOD = (limit of detection) granica detekcije; LOQ = (limit of quantification) granica kvantifikacije; REC = recovery

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRAĆENJE KONCENTRACIJA MIKOTOKSINA KOJI NASTAJU PRILIKOM PROIZVODNJE SLADA I PIVA

Za potrebe ovog istraživanja postavljeni su pokusi u polju na dva genotipa pšenice kako je opisano u poglavlju materijali i metode. Dobiveni uzorci pšenica slađeni su prema modificiranom postupku za slađenje ječma po MEBAK-u (2011), nakon čega su se prema MEBAK postupku proizveli sladovina i pivo. Provedene su analize određivanja mikotoksina u nusproizvodima koji nastaju tijekom procesa proizvodnje slada i piva: voda od močenja, klica/korjenčić, pivski trop te pivski kvasac. Dobiveni rezultati analize odabranih pokazatelja kakvoće slada prikazani su grafički na slikama 12. - 16.

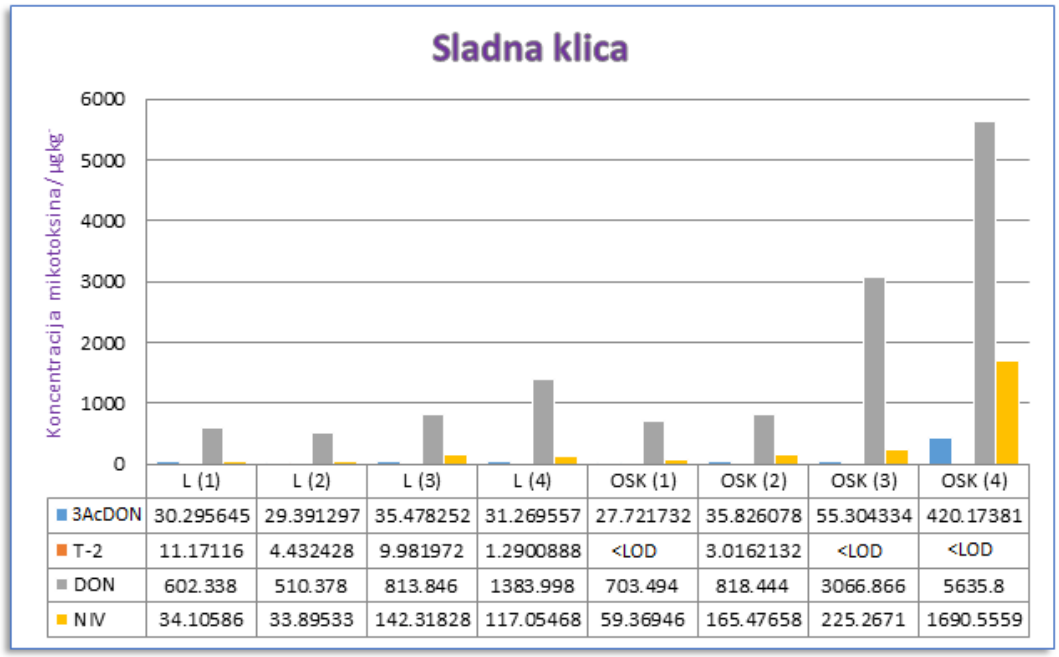


	L (1)	L (2)	L (3)	L (4)	OSK (1)	OSK (2)	OSK (3)	OSK (4)
3-AcDON	136.43612	136.09588	139.6684	150.38595	139.32816	148.51463	209.24741	239.86899
T-2	<LOD	<LOD	1.41855	0.668745	0.886256	1.106469	1.118967	1.64822
DON	862.972	693.587	1207.091	879.019	804.133	713.2	1679.586	20326.2
NIV	269.2195	274.746	289.7465	294.4835	222.639	210.7965	307.905	664.759

Slika 12. Grafički prikaz koncentracije mikotoksina u vodi od močenja pšenica u ovisnosti o genotipu pšenice i tretmanu.

Slika 12. prikazuje rezultate analize mikotoksina u uzorcima vode za močenje nakon slađenja. Iz rezultata je vidljivo da u vodi za močenje najviše zaostaje mikotoksin DON, dok u manjim koncentracijama zaostaju mikotoksini NIV i 3-AcDON (u posljednja dva uzorka OSK (3

i 4)). Unakrsna kontaminacija zrna plijesnima događa se tijekom močenja, kada putem vode za močenje dolazi do prelaska kontaminanta sa kontaminiranog zrna na nekontaminirano, uslijed oslobađanja klonidija, micelija i askospora (Schwartz i sur., 1995). Kako su navedeni mikotoksini topivi u vodi, većina ih i zaostaje u vodi nakon močenja pšenice, što prikazani rezultati i potvrđuju. To je posebno vidljivo u uzorku OSK 4 gdje je koncentracija DON-a bila izuzetno visoka, iznad 20 mg/kg.



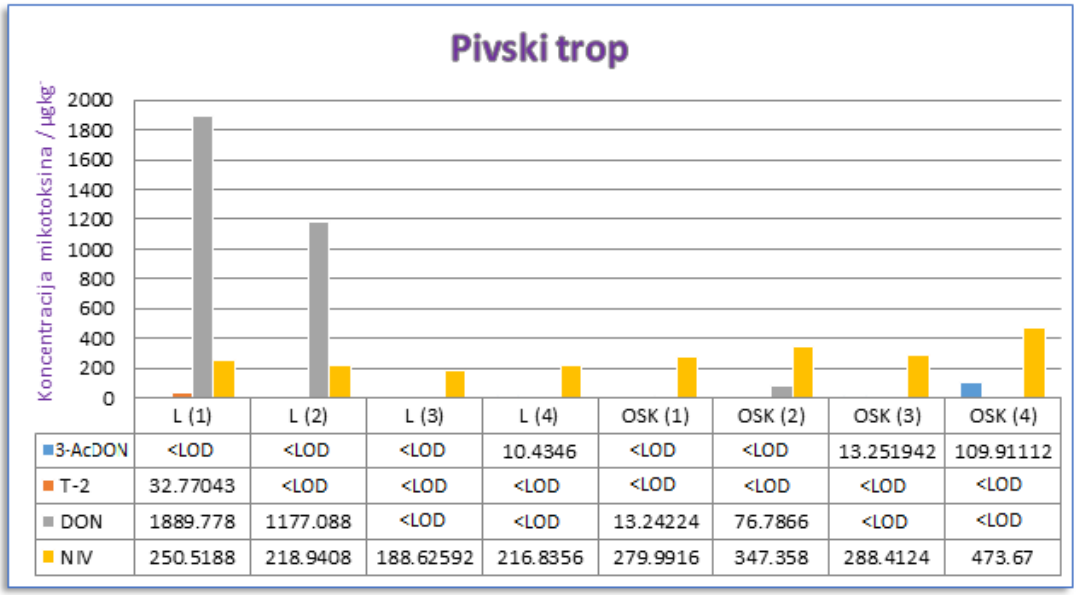
	L (1)	L (2)	L (3)	L (4)	OSK (1)	OSK (2)	OSK (3)	OSK (4)
3AcDON	30.295645	29.391297	35.478252	31.269557	27.721732	35.826078	55.304334	420.17381
T-2	11.17116	4.432428	9.981972	1.2900888	<LOD	3.0162132	<LOD	<LOD
DON	602.338	510.378	813.846	1383.998	703.494	818.444	3066.866	5635.8
NIV	34.10586	33.89533	142.31828	117.05468	59.36946	165.47658	225.2671	1690.5559

Slika 13. Grafički prikaz koncentracije mikotoksina u klicama slada u ovisnosti o genotipu pšenice i tretmanu.

Na slici 13. prikazani su rezultati analize mikotoksina u uzorcima klice i korjenčića nakon otklicavanja gotovog slada. Vidljivo je da u klici najviše zaostaju mikotoksini DON, NIV i vrlo malo 3-AcDON-a. U uzorcima OSK (3 i 4), koji su kontaminirani sporama plijesni *F. culmorum*, pojavljuju se izrazito velike koncentracije mikotoksina, naročito DON-a, što je i u skladu sa literaturom (Cavaglieri i sur., 2009). Posebno su visoke koncentracije pronađene u uzorcima 3 (3.07 mg/kg) i 4 (5.64 mg/kg) kod genotipa OSK. Koncentracije NIV su također bile povišene u istim uzorcima genotipa OSK, uzorcima 3 (225 µg/kg) i 4 (1.70 mg/kg).

Slično istraživanje koje su proveli Habschied i sur. (2011) pokazalo je da mikotoksin zearalenon također najviše zaostaje u klicu i korjenčiću tijekom proizvodnje slada. Habler i sur. (2016) su u svom istraživanju također zaključili da klica/korjenčić zadržavaju veće količine trihotecena tipa B kojima pripadaju i mikotoksini određeni u ovom istraživanju. Kako je ova frakcija nusproizvoda izuzetno meke teksture i bogata hranjivim tvarima, pretpostavlja se da je prva koju će plijesan kolonizirati tijekom slađenja.

Kao što je vidljivo prema rezultatima, klica i korjenčić koji zaostaju tijekom proizvodnje slada, također mogu biti kontaminirani, a zbog svoje hranidbene vrijednosti (visok udio proteina i vlakana) i niske cijene koriste se u prehrani stoke. To je razlog zašto je vrlo važno voditi računa o koncentraciji mikotoksina koji se mogu nalaziti u njima (Flanningan, 1996; Cavaglieri i sur., 2009).



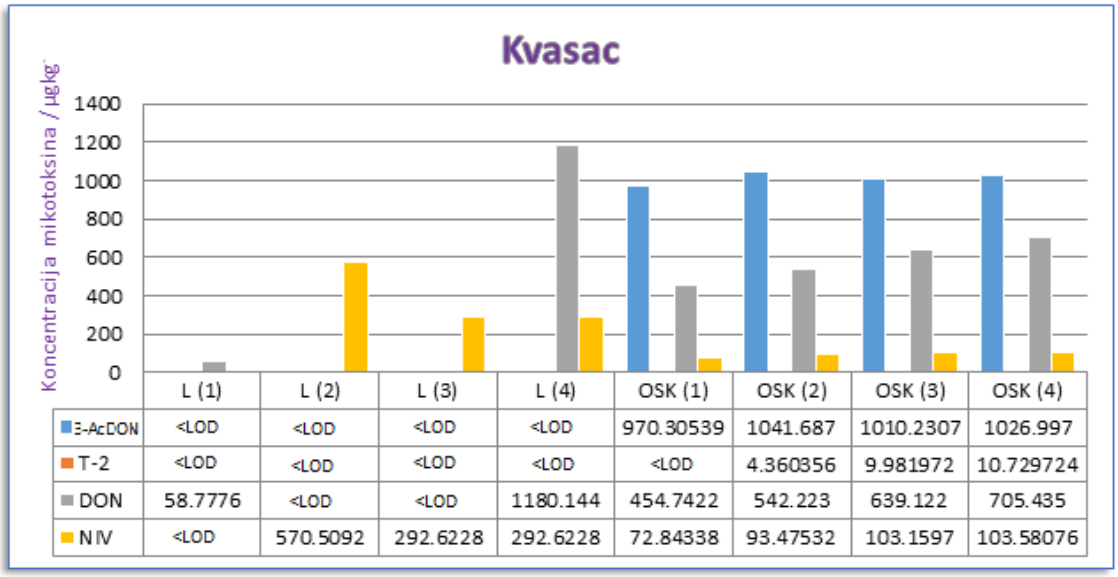
	L (1)	L (2)	L (3)	L (4)	OSK (1)	OSK (2)	OSK (3)	OSK (4)
3-AcDON	<LOD	<LOD	<LOD	10.4346	<LOD	<LOD	13.251942	109.91112
T-2	32.77043	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
DON	1889.778	1177.088	<LOD	<LOD	13.24224	76.7866	<LOD	<LOD
NIV	250.5188	218.9408	188.62592	216.8356	279.9916	347.358	288.4124	473.67

Slika 14. Grafički prikaz koncentracije mikotoksina u pivskom tropu u ovisnosti o genotipu pšenice i tretmanu.

Na slici 14. prikazani su rezultati analize mikotoksina u uzorcima tropa nakon procesa proizvodnje sladovine. Prema rezultatima, vidljivo je da u tropu najviše zaostaje mikotoksin NIV, a u nešto manjoj mjeri zaostaju 3-AcDON i DON, od kojih su koncentracije DON-a izraženije u uzorcima (1 (1.89 mg/kg)) i (2 (1.18 mg/kg)) genotipa Lucija nego u preostalim uzorcima gdje se DON javlja u vrlo niskim koncentracijama ili uopće nije detektiran (<LOD).

Koncentracije zaostalih mikotoksina u tropu nisu prelazile koncentracije propisane pravilnikom za stočnu hranu (NN 80/2010).

Derivati DON-a, poznati i kao modificirani mikotoksini, su primjerice 3- i 15- acetil-DON, DON-3-di-glukozid, DON-3-mono-glukozid, te su predmet intenzivnih istraživanja. Nastaju reakcijama mikotoksina s drugim spojevima koji se nalaze u žitaricama (npr. šećerima, aminokiselinama ili sulfatnim grupama), pri čemu produciraju derivate koji su manje toksični te tako dovode do prividnog smanjenja prvotne koncentracije mikotoksina (Galaverna i sur., 2009). Značajno povećanje koncentracije konjugata DON-a događa se tijekom ukomljavanja slada, tako da je u sladovini koncentracija konjugata deset puta viša nego u meljavi slada. Stoga možemo pretpostaviti da se DON konvertirao u neki od derivatnih oblika koji nisu analizirani u ovom istraživanju te se nije detektirao.

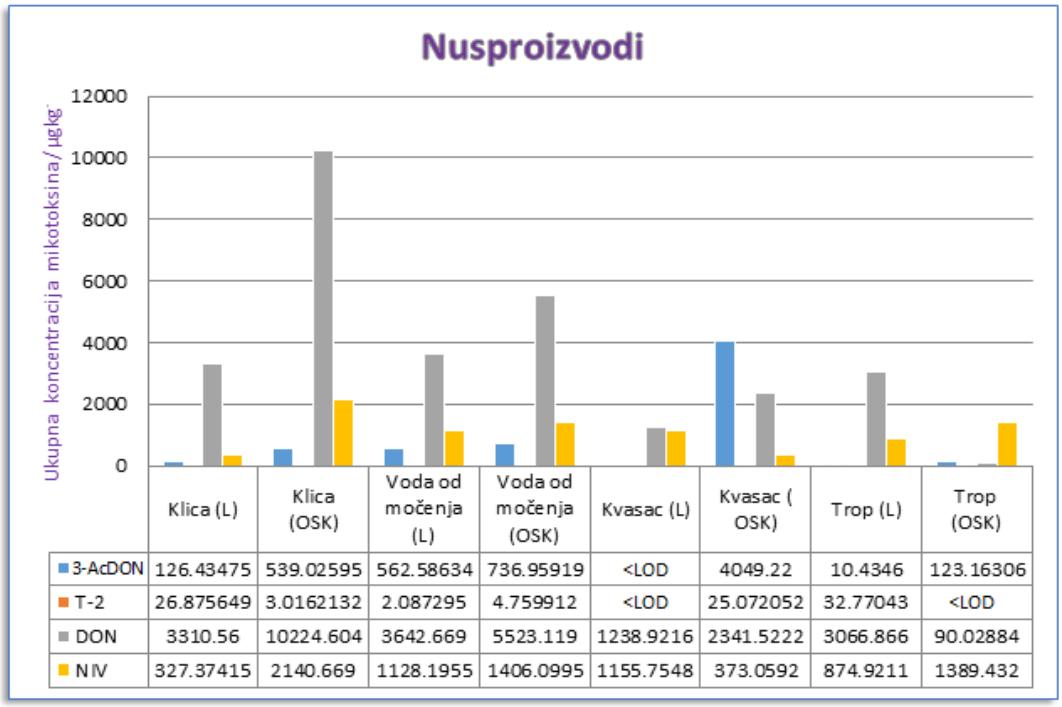


	L (1)	L (2)	L (3)	L (4)	OSK (1)	OSK (2)	OSK (3)	OSK (4)
3-AcDON	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	970.30539	1041.687	1010.2307	1026.997
T-2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.360356	9.981972	10.729724
DON	58.7776	<LOD	<LOD	1180.144	454.7422	542.223	639.122	705.435
NIV	<LOD	570.5092	292.6228	292.6228	72.84338	93.47532	103.1597	103.58076

Slika 15. Grafički prikaz koncentracije mikotoksina u kvascu u ovisnosti o genotipu pšenice i tretmanu.

Slika 15. prikazuje rezultate analize mikotoksina u uzorcima izdvojenog kvasca nakon filtracije mladog piva. Iz rezultata je vidljivo da u otpadnom kvascu u visokim koncentracijama zaostaju mikotoksini 3-AcDON očitovani samo u uzorcima genotipa OSK. 110/09. DON i NIV kvantificirani su u nešto nižim koncentracija kod genotipa OSK, dok su kod genotipa Lucija pronađeni u nešto višim koncentracijama. Iz priloženih rezultata možemo

vidjeti i da je kod genotipa Lucija, očitana prisutnost mikotoksina NIV u (2, 3 i 4), dok je u uzorku (4) zaostala viša koncentracija DON-a nego u svim ostalim uzorcima (1.1 mg/kg).



	Klica (L)	Klica (OSK)	Voda od močenja (L)	Voda od močenja (OSK)	Kvasac (L)	Kvasac (OSK)	Trop (L)	Trop (OSK)
3-AcDON	126.43475	539.02595	562.58634	736.95919	<LOD	4049.22	10.4346	123.16306
T-2	26.875649	3.0162132	2.087295	4.759912	<LOD	25.072052	32.77043	<LOD
DON	3310.56	10224.604	3642.669	5523.119	1238.9216	2341.5222	3066.866	90.02884
NIV	327.37415	2140.669	1128.1955	1406.0995	1155.7548	373.0592	874.9211	1389.432

Slika 16. Grafički prikaz ukupnih koncentracija mikotoksina u ovisnosti na ispitivane nusproizvode s obzirom na različite genotipove pšenica Lucija (L) i OSK. 110/09 (OSK)

Iz rezultata koje prikazuje slika 16 pokazan je značajno veći udio mikotoksina u uzorcima genotipa OSK. 110/09 koji ima slabiju genetsku otpornost na infekciju plijesnima roda *Fusarium*, u odnosu na genotip Lucija. Također se vidi i da, od prikazanih mikotoksina, DON zaostaje u nusproizvodima u najvećoj koncentraciji s eventualnom iznimkom 3-AcDON-a u kvascu kod uzoraka s visokom kontaminacijom DON-a.

5. ZAKLJUČCI

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

- Tijekom faze močenja došlo je do unakrsne kontaminacije uzoraka s plijesni *F. culmorum* preko vode za močenje, što je rezultiralo visokom zastupljenosti mikotoksina DON, NIV I 3-AcDON-a u svim ispitivanim uzorcima vode za močenje neovisno o početnom stupnju kontaminiranosti genotipa pšenica.

- Visoku koncentraciju DON-a imali su i uzorci klice/korjenčića, stoga se postupkom otklicavanja smanjuje toksikološka kontaminiranost slada. Budući se klica/korjenčić koriste kao stočna hrana, vrlo je bitno osigurati njihovu zdravstvenu ispravnost.

- U svim uzorcima nusproizvoda nastalih nakon slađenja i proizvodnje piva genotipa pšenice OSK. 110/09 vidljive su izraženije koncentracije ispitivanih mikotoksina u usporedbi sa drugim genotipom, te možemo zaključiti kako genotip OSK. 110/09 ima slabiju genetsku otpornost na kontaminaciju plijesnima roda *Fusarium* u odnosu na genotip pšenice Lucija.

6. LITERATURA

Beluhan, S: Nova valorizacija sladnih klica, nusproizvoda sladara. *Svijet piva 6*, 35:10-13, 2001a.

Beluhan, S: Okusne supstancije iz pivskog kvasca. *Svijet piva 6*, 37:09-13, 2001b.

Bennett JW, Klich M: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16:497-516, 2003.

Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J: Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research* 57:165-186, 2012.

Bhat RV i Miller JD: *Mycotoxins and food supply*. FAO Corporate document repository, 2016. http://www.fao.org/docrep/U3550t/u3550t0e.htm [11.1.2018.]

Brennan JM, Egan D, Cooke BM, Doohan FM: Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathology* 54:156–160, 2005.

Cavaglieri LR, Keller KM, Pereya CM, Gonzalez 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.

Cavret S, Lecoeur S: Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology* 44: 444-453, 2006.

Chandra GS, Proudlove MO, Bamforth CW, Thornton JM, Tillett IJL, Palmer GHO: The efect of morphological structure on the digestibility of barley and wheat endosperms. *Home Grown Cereals Authority*, Project report 144E, 1997.

Charmley LL, Trenholm HL, Prelusky DB, Rosenberg A: Economic losses and decontamination. *Natural Toxins* 3:199-203, 1995.

da Rocha MEB, da Chagas O, Freire F, Maia FEF, Guedes MIF, Rondina D: Mycotoxins and their effect on human and animal health. *Food Control* 36:159-165, 2014.

Demeke T, Clear RM, Patrick SK, Gaba D: Species-specific PCR based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology* 103:271–284, 2005.

Desjardings AE, Proctor RH: Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119:47-50, 2007.

Diaz D: *The Mycotoxin Blue Book*, Nottingham University Press, Thrumpton UK, 2005.

Duraković S, Duraković L: *Mikologija u biotehnologiji*, Kugler, Zagreb, 2003.

EFSA, European Food Safety Authority: *Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure*. EFSA, Parma, Italy, 2013.

Ehling G, Cockburn A, Snowdon P, Buchhaus H: The significance of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health. *Cereal Research Communications* 25: 433-447, 1997.

Eureka Swan: *Reduction of water use in the EU Malting Industry* AR-0916, 2003 (http://sciencesearch.defra.gov.uk/Default.aspx?Menu=Menu&Module=More&Location=None&Completed=0&ProjectID=12449) [9.1.2018.]

Filtenborg O, Frisvad JC, Samson AR: Specific association of fungal to foods and influence of physical environmental factors. U *Introduction to food- and air-borne fungi* (str. 306-320). Centraalbureau voor Shimmelcultures, Baarn-Delft, 2004.

Flannigan B: The microflora of barley and malt. U *Brewing Microbiology*. Elsevier Applied Science, London, 1987.

Flannigan B: Mycotoxins in malting and brewing. U *Mycotoxins in cereals: An emerging problem? Handbook for fourth SAC conference* (str. 45-55). Edinburgh, 1996.

Habschied K, Šarkanj B, Klapec T, Krstanović V: Distribution of zearalenon in malted barley fractions dependent on *Fusarium graminearum* growing conditions. *Food Chemistry* 129:329-332, 2011.

HAH, Hrvatska agencija za hranu: *Mikotoksini u hrani*. HAH, 2014. http://www.hah.hr/zanimljivosti.php?cid=4&id=400&page=1 [9.1.2018.]

Jurković D, Culek M, Ćosić J: Mycopopulation of the treated winter wheat seed in eastern Croatia. *Cereal Research Communications* 26:67-72, 1998.

Kerby C, Vrieskoop F: An Overviews of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries, *Beverages* 3:12-24, 2017.

Klapec T, Šarkanj B: *Opasnosti vezane uz hranu - Kemijske i fizikalne opasnosti*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.

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

Krstanović V: Istraživanje postupaka slađenja domadih sorti pšenica. *Doktorska disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2004.

Krstanović V: Utjecaj zamjene dijela slada kukuruznom krupicom i pšenicom na pokazatelje kakvoće i koloidnu stabilnost piva. *Magistarski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2000.

Lacey J, Bateman GL, Mirocha CJ: Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology* 134:277–283, 1999.

Leskošek-Čukalović J: *Tehnologija piva (I.deo) - Slad i nesladovane sirovine*, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2002.

Logrieco A, Bottalico A, Mule G, Moretti A, Perrone G: Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathol*ogy 109:645-667, 2003.

Logrieco A, Bottalico A, Ricci V: Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in cereal grains from some Mediterranean countries. *Phytopathologia Mediterranea* 29:81-89, 1990.

Marić V, Nadvornik Z: *Pivo - tekuća hrana*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.

Mayer S, Engelhart S, Kolk A, Blome H: The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin research* 24:151-164, 2008.

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

Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM: Food mycotoxins: An update. *Journal of Food* Science 71:51-65, 2006.

MZSS - Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH: *Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani*. Narodne novine 80/10, 2010.

Nagodawithana TW, Reed G: Enzymes, Biomass, Food and Feed. U *Biotehnology*, VCH Weinheim, 1995.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasa WFO: *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsyilvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983.

Oliveira CAF: Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospect*s 1: 59-62, 2013.

Ožegović L, Pepeljnjak S: *Mikotoksikoze.* Školska knjiga, Zagreb, 1995.

Papadopoulou A, Wheaton L, Muller R: The control of selected micro-organism during the malting process. *Journal of the Institute of Brewing* 106: 179-188, 1999.

Peraica M, Domijan AM, Miletić-Medved M, Fuchs R: The involvement of mycotoxins in the development of endemic nephropathy. *Wien Klinische Wochenschrift* 120:402–407, 2008.

Plavšić F, Žuntar I: *Uvod u analitičku toksikologiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006.

Rai M, Varma A: *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*. Springer Heidelberg Dordrecht London, New York, 2010.

Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z: Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1143:48-64, 2007.

Romer Labs: http://www.romerlabs.com/sr/products/mycotoxins/immunoaffinity-columns/ [11.1.2018.]

Sacher B: Trials for the optimisation of use of soft-wheat varieties in malting and brewing. *Dissertation*. TU München-Weihenstephan, München, 1998.

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, Jones BL, Steffenson BJ: Enzymes associated with *Fusarium* infection of barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 60: 130-134, 2002.

Streit E, Naehrer K, Rodriguez I, Schatzmayr G: Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials woeldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:2892-2899, 2013.

Sudakin DL: Trichotecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143: 97-107, 2003.

Šakić N: *Tehnologija proizvodnje piva*. Privredna/Gospodarska komora Federacije Bosne i Hercegovine, Sarajevo, 2008.

Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapec T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2010.

Štefanić K, Marić V: *Pivarski priručnik*. Jugoslavensko udruženje pivovara, Beograd, 1990.

Teich AH: Epidemiology of Wheat Scab Caused by *Fusarium* spp. *U Topics in Secondary Metabolism, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier Science, Amsterdam, 1989.

Thomas KR, Rahman PKSM: Brewery wastes. Strategies for sustainability. A review. *Aspects of Applied Biology* 80:147-153, 2006.

US, Department of Agriculture, 1996 (https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/1995-1996/index.php) [12.1.2018.]

Van Nierop SNE, Rautenbach M: The impact of microorganisms on barley and malt quality – a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 64:49-78, 2006.

Vaughan A, O'Sullivan T, van Sinderen D: Enhancing the microbiological stability of malt and beer. *Journal of the Institute of Brewing* 111:355-37, 2005.

Weidenbomer M: *Encyclopedia of food mycotoxins*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2001.

WHO, World Health Organization. *Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot.* Environmental Health Criteria 105, Geneva, Švicarska, 1990.

Web 1: http://www.obz.hr/vanjski/CD_AGBASE2/HTM/psenica.htm [3.1.2018.]