

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij  
Zaštita prirode i okoliša

mr. sc. Jasenka Petrić

**POJAVNOST ERGOT ALKALOIDA U RAŽI U REPUBLICI HRVATSKOJ I  
UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA NJIHOVO PRISUSTVO U HRANI**

Doktorska disertacija

Osijek, 2020.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij  
Zaštita prirode i okoliša

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarne biotehničke znanosti (izborna polja: 4.01. poljoprivreda i 4.05. prehrambena tehnologija)

### POJAVNOST ERGOT ALKALOIDA U RAŽI U REPUBLICI HRVATSKOJ I UTJECAJ TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA NA NJIHOVO PRISUSTVO U HRANI

mr.sc. *Jasenka Petrić*

**Doktorska disertacija je izrađena u:** Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** *izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj*, Sveučilište Sjever, Sveučilišni centar Koprivnica

**Komentor:** *prof.dr.sc. Karolina Vrandečić*, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

#### **Sažetak doktorske disertacije:**

Ergot alkaloidi (EA) su mikotoksini koje primarno proizvode gljivice roda *Claviceps*, a mogu uzrokovati ozbiljne toksične učinke kod ljudi i životinja. Najčešće kontaminiraju žitarice i proizvode od žitarica, posebice raž i proizvode od raži. Ovo istraživanje obuhvatilo je sve uzorke neobrađene raži u Republici Hrvatskoj, uzorkovane tijekom žetve 2016. g., kao i proizvode na bazi raži pripremljene od uzoraka neobrađene raži u kojima je utvrđeno prisustvo ergot sklerocija, poznatog kao glavnog uzročnika kontaminacije hrane s EA. Uzorci su analizirani na najznačajnije EA i njihove epimere, te je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u pojavnosti EA ovisno o načinu proizvodnje raži (konvencionalan ili ekološki). Također, analizom uzoraka neobrađene raži i proizvoda na bazi raži po prvi puta do sada se sistematski pratio utjecaj pojedinih tehnoloških postupaka koji se koriste u procesiranju hrane na retenciju EA u finalnim proizvodima na bazi raži koje ljudi konzumiraju. Utvrđeno je kako se mljevenjem raži najveći dio EA koncentrira u raženoj krupici, a najmanji u raženom brašnu. Fermentacijom, kuhanjem i pečenjem dolazi do redukcije EA, dok ekstruzijom dolazi do povećanja koncentracija EA u proizvodu.

**Broj stranica:** 117

**Broj slika:** 54

**Broj tablica:** 20

**Broj literaturnih navoda:** 130

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Gljučne riječi:** ergot alkaloidi, raž, tehnološki postupci, sigurnost hrane, mikotoksini

**Datum obrane:** 16.6.2020.

#### **Povjerenstvo za obranu:**

1. *prof. dr. sc. Bojan Stipešević*, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2. *dr. sc. Ines Sviličić Petrić*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
3. *prof. dr. sc. Jurislav Babić*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
4. *prof. dr. sc. Jasenka Ćosić*, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (zamjena člana)

**Rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Ruđer Bošković Institute, Zagreb  
Postgraduate Interdisciplinary University Doctoral Study of  
Environmental Protection and Nature Conservation

PhD thesis

**Scientific Area:** Biotechnical Sciences

**Scientific Field:** Interdisciplinary Biotechnical Sciences (Fields: 4.01. Agriculture and 4.05. Food Technology)

### THE PREVALENCE OF ERGOT ALKALOIDS IN RYE IN REPUBLIC OF CROATIA AND THE IMPACT OF TECHNOLOGICAL PROCEDURES ON THEIR PRESENCE IN FOOD

*Jasenka Petrić, M.Sc.*

**Thesis performed at** Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** *Bojan Šarkanj*, PhD, University North, University Center Koprivnica

**Co-supervisor:** *Karolina Vrandečić*, PhD, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

#### Summary

Ergot alkaloids (EA) are mycotoxins primarily produced by *Claviceps* species and can cause serious toxic effects in humans and animals. Mostly they contaminate cereals and cereal products, especially rye and rye products. This study includes all samples of unprocessed rye in the Republic of Croatia, sampled during the harvest in 2016, as well as rye based products produced from samples of unprocessed rye where the presence of ergot sclerotia, known as the major source of food contamination with EA, has been found.

Samples were analyzed for the most significant EAs and their epimers, and no statistically significant difference in the incidence of EAs depending and the way of cultivation (conventional or ecological) has been found. Also, it is for the first time ever that analysing samples of unprocessed rye and rye based products, the impact of certain technological processes used in food processing on the retention of EA in final rye based products consumed by humans was systematically monitored. It has been found that, by grinding rye, most EA is concentrated in semolina, and least in rye flour. Fermentation, cooking and baking reduce the EA, while extrusion increases the concentrations of EA in product.

**Number of pages:** 117

**Number of figures:** 54

**Number of tables:** 20

**Number of references:** 130

**Original in:** Croatian

**Key words:** ergot alkaloids, rye, technological procedures, food safety, mycotoxins

**Date of the thesis defense:** 16.6.2020.

#### Reviewers:

1. *Bojan Stipešević*, PhD, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

2. *Ines Sviličić Petrić*, PhD, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

3. *Jurislav Babić*, PhD, Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

4. *Jasenka Ćosić*, PhD, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Tema rada prihvaćena je na sjednici Sveučilišnog vijeća za sveučilišne poslijediplomske studije dana 5. rujna 2019.

*Zahvaljujem mentoru rada izv. prof. dr. sc. Bojanu Šarkanju na nesebičnoj pomoći, mnogobrojnim stručnim savjetima i strpljenju pri izradi disertacije.*

*Najljepša hvala i komentorici rada prof.dr.sc. Karolini Vrandečić na korisnim savjetima i riječima podrške.*

*Posebno zahvaljujem mojoj obitelji na podršci, strpljenju i razumijevanju za sve vrijeme koje nisam mogla provesti s njima. Svima hvala od srca jer moj uspjeh ne bi ništa značio bez vas.*

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO .....	4
2.1. Ergot alkaloidi .....	5
2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva .....	5
2.1.2. Podrijetlo ergot alkaloida u gljivama i biljkama domaćina.....	7
2.1.3. Utjecaj klimatskih promjena na rast mikotoksikogenih gljiva i produkciju mikotoksina	9
2.1.4. Povijest ergot alkaloida .....	11
2.1.5. Toksikokinetika i toksikodinamika .....	13
2.1.6. Primjena ergot alkaloida kao lijekova .....	15
2.1.7. Pojavnost ergot alkaloida u hrani.....	16
2.1.7.1. Zakonska regulativa .....	17
2.2. Raž i proizvodi od raži.....	19
2.2.1. Proizvodnja brašna i kruha od raži.....	21
2.2.2. Proizvodnja tjestenine.....	22
2.2.3. Proizvodnja snack proizvoda .....	24
2.2.4. Proizvodnja keksa .....	25
2.3. UHPLC-ESI-MS/MS.....	26
2.3.1. UPHLC .....	27
2.3.2. Masena spektrometrija .....	27
2.3.3. ESI ionizacija.....	28
2.3.4. Princip rada trostrukog kvadrupola .....	29
3. MATERIJALI I METODE.....	31
3.1. Uzorkovanje.....	32
3.2. Priprema uzoraka.....	35
3.2.1. Proizvodnja kruha.....	35
3.2.2. Proizvodnja tjestenine.....	38
3.2.3. Proizvodnja snack proizvoda .....	41
3.2.4. Proizvodnja keksa .....	44
3.3. Analiza uzoraka i uvjeti rada LC-MS/MS-a .....	45
3.4. Statistička obrada podataka .....	46
4. REZULTATI.....	47
4.1. Pojavnost EA u raži ovisno o načinu proizvodnje raži .....	48
4.2. Vremenske prilike tijekom proizvodnje raži.....	52
4.3. Utjecaj tehnoloških postupaka na prisustvo ergot alkaloida.....	54
4.3.1. Mljevenje .....	54
4.3.2. Fermentacija.....	56

4.3.3. Ekstruzija.....	59
4.3.4. Kuhanje .....	65
4.3.5. Pečenje .....	69
4.3.6. Fermentacija i pečenje.....	75
5. RASPRAVA.....	80
5.1. Pojavnost ergot alkaloida u raži u RH .....	81
5.2. Pojavnost ergot alkaloida ovisno o načinu proizvodnje raži .....	82
5.3. Vremenske prilike tijekom proizvodnje raži.....	83
5.4. Utjecaj tehnoloških postupaka na prisutnost ergot alkaloida.....	84
5.4.1. Mljevenje .....	84
5.4.2. Fermentacija.....	86
5.4.3. Ekstruzija.....	87
5.4.4. Kuhanje .....	89
5.4.5. Pečenje .....	90
5.4.6. Fermentacija i pečenje.....	92
6. ZAKLJUČCI.....	97
7. LITERATURA .....	99
8. PRILOZI .....	109
8.1. Popis oznaka, kratica i simbola .....	110
8.2. Popis slika.....	110
8.3. Popis tablica .....	113
9. ŽIVOTOPIS .....	115

## **1. UVOD**



Ergot alkaloidi (EA) su produkti gljivica raznih rodova od kojih je u Europi najrasprostranjenija vrsta *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. U oboljeloj biljci, glavica raži zamjenjuje zdrava zrna sa sklerocijem (ES) koji u sebi sadržava EA-e. Do danas je poznato preko 50 EA-a, a od posebnog značaja su: ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin, ergokornin i njihovi odgovarajući epimeri koji nisu zakonski regulirani u hrani i hrani za životinje. Fiziološki učinci EA poznati su od davnina kada je, uslijed konzumacije kontaminiranih žitarica te njihovih proizvoda (brašna i kruha) dolazilo do pojave čestih masovnih trovanja. Prilikom konzumacije manjih količina kontaminiranih žitarica, dolazi do probavnih smetnji. Veće količine uzrokuju ergotizam, bolest koja se manifestira halucinacijama, grčevitim napadima te snažnim vazokonstrikcijama koje naposljetku dovode do pojave suhe gangrene te odumiranja udova. Također, zabilježena su trovanja domaćih i divljih životinja. Tijekom 2010. i 2011. god. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) u suradnji s nekoliko institucija provela je veliko istraživanje o EA-ima u žitaricama i proizvodima od žitarica, pri čemu je sudjelovalo 13 zemalja Europske unije. Iako zaključci istraživanja nisu ukazivali na zabrinutost za zdravlje ljudi i životinja, rezultati istraživanja su ipak utvrdili povećanu prisutnost EA-a u hrani i hrani za životinje. Stoga je 2012. godine izdana *Preporuka Europske komisije o praćenju prisutnosti EA u hrani i hrani za životinje (2012/154/EU)*. Temeljem te Preporuke, Hrvatska agencija za hranu (HAH) je od 2014. do 2016. godine provela istraživanje o prisutnosti EA u hrani i hrani za životinje. Rezultati istraživanja su se koristili za donošenje *Znanstvenog mišljenja o ergot alkaloidima u hrani i hrani za životinje* (HAH, 2017), a također su poslani u EFSA-u, kao doprinos europskoj bazi podataka u svrhu donošenja prijedloga za najveće dopuštene količine (NDK) za EA u pojedinoj hrani. Podaci o koncentraciji EA u žitaricama i proizvodima od žitarica također su značajni i za nacionalni program praćenja (monitoring) hrane koji se provodi sukladno propisanim člancima 41.-43. Uredbe (EZ) br. 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o službenim kontrolama koje se provode radi provjeravanja poštivanja propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja i temeljem Odluke Komisije od 21. svibnja 2007. o smjernicama za pomoć državama članicama u pripremi jedinstvenog integriranog višegodišnjeg nacionalnog plana kontrola predviđenog Uredbom (EZ) br. 882/2004.

Kako bi se mogla napraviti procjena rizika za EA u hrani nužno je poznavati u kojim se koncentracijama EA nalaze u sirovinama (žitaricama) te u kojem udjelu zaostaju u hrani koju konzumiramo, gdje može doći do promjena koncentracija zbog različitih uvjeta tehnoloških postupka tijekom procesiranja. Procesiranjem hrane može doći do oslobađanja modificiranih oblika mikotoksina (vezanih za druge biomolekule koje ih maskiraju, ili zarobljene u škrobnom matriksu), ili do redukcije uslijed degradacije molekula mikotoksina na manje toksične produkte, koncentriranja u nusproizvodima koji se ne koriste za hranu ili vezanja za biomolekule u maskirani oblik. U HAH-ovom znanstvenom mišljenju o EA nije bilo moguće napraviti procjenu rizika za EA iz sirovine i poluproizvoda jer ne postoji dovoljno podataka o utjecaju različitih tehnoloških postupaka na njihovo prisustvo u hrani, ali i na njihova svojstva.

Mišljenje je stoga rezultiralo preporukom koja je išla u smjeru provedbe daljnjeg istraživanja koje će se dodatno fokusirati na utjecaj tehnoloških postupaka obrade (mljevenje, termička obrada i sl.) na prisustvo EA u finalnim proizvodima.

U ovoj doktorskoj disertaciji po prvi puta do sada se sistematski pratio utjecaj pojedinih tehnoloških postupaka (mljevenje, fermentacija, ekstruzija, pečenje i kuhanje) koji se koriste u procesiranju hrane na retenciju EA u finalnim proizvodima na bazi raži koje ljudi konzumiraju. Rezultati analiza sirovina, poluproizvoda i proizvoda od raži na prisustvo EA dobivenih preradom raži u različite proizvode dati će detaljniji uvid u raspodjelu ovih mikotoksina u pojedine proizvode te se iz navedenih rezultata mogu donijeti zaključci koje proizvode od raži je najsigurnije konzumirati kada se očekuje veća kontaminacija raži EA. Također, ovo je prema literaturnim saznanjima prvo istraživanje u kojem su se pratile promjene EA tijekom procesa ekstruzije dok su ostala istraživanja većinom bila usmjerena na regulirane mikotoksine. Rezultati istraživanja dat će i doprinos oskudnom broju podataka o utjecaju načina proizvodnje raži (konvencionalan ili ekološki) na pojavnost EA.

Na temelju navedenoga određeni su slijedeći ciljevi istraživanja:

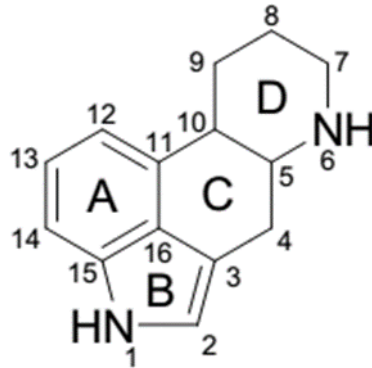
1. Utvrditi utjecaj različitih tehnoloških postupaka koji se koriste u procesiranju hrane (mljevenje, fermentacija, ekstruzija, pečenje i kuhanje) na retenciju najznačajnijih EA i njihovih epimera u proizvodima na bazi raži.
2. Utvrditi utjecaj načina proizvodnje raži (konvencionalan ili ekološki) na pojavnost EA u raži u Republici Hrvatskoj (RH).

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Ergot alkaloidi

### 2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva

Ergot alkaloidi (EA) su po kemijskom sastavu amidi terpenoidnog derivata indola - D-lizerginske kiseline koje karakterizira tetraciklički ergolinski prsten (**Slika 1**).



**Slika 1.** Tetraciklički ergolinski prsten (Coufal-Majewski i sur. 2016)

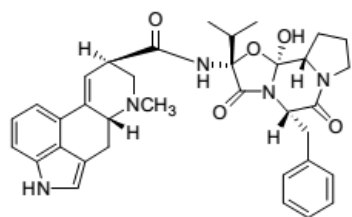
Ovisno o supstituciji na C-8 atomu, EA su podijeljeni u 4 glavne grupe (Crews i sur. 2009; EFSA, 2012):

- klavin alkaloidi i 6,7-sekoergoleni
- jednostavni derivati lizergične kiseline
- ergopeptin alkaloidi - ciklol ergot alkaloidi
- ergopeptam alkaloidi - laktam ergot alkaloidi

U većini prirodno prisutnih EA, bez obzira kojoj od četiri grupe pripadaju, prsten je metiliran na N6, supstituiran na C8 i posjeduje dvostruku vezu na položaju C8/C9 ( $\Delta$ 8,9-ergoleni) ili C9/C10 ( $\Delta$ 9,10-ergoleni) s asimetričnim centrima na C5/C10 ili C5/C8. Vodik na C5 uvijek je u P-konfiguraciji; dok je u  $\Delta$ 8,9-ergolenima vodik na C10 uvijek u trans ( $\alpha$ ) na C5-H, asimetrični centar na C8 u  $\Delta$ 9,10-ergolenima daje dva epimera,  $\beta$ -A9,10-ergoleni (naznačeno sufiksom -in) i  $\alpha$ -A9,10-izoergolena (naznačeno sufiksom -inin).

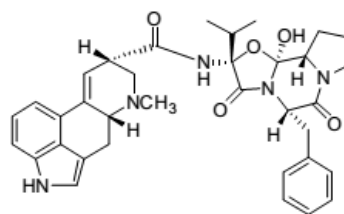
Do danas je identificirano više od 50 različitih EA, a pojavnost i koncentracije pojedinih EA variraju između soja gljivica, geografskog područja i biljke domaćina (Crews i sur. 2009; EFSA, 2012). Najznačajniji EA koji su uvršteni u europsko zakonodavstvo i analizirani u ovom radu su (**Slika 2**):

- ergometrin/ergometrinin,
- ergotamin/ergotaminin,
- ergozin/ergozinin,
- ergokristin/ergokristinin,
- ergokriptin/ergokriptinin,
- ergokornin/ergokorninin.



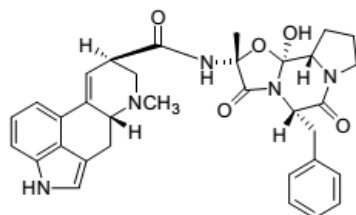
**Ergokristin**

Mol. masa: 609.7 g/mol



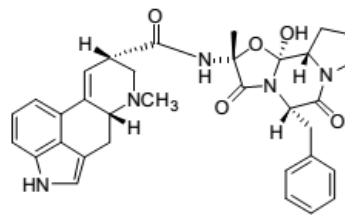
**Ergokristinin**

Mol. masa: 609.7 g/mol



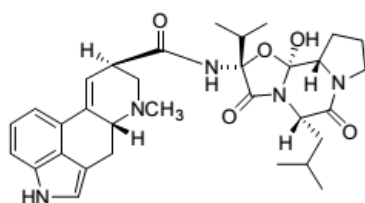
**Ergotamin**

Mol. masa: 581.7 g/mol



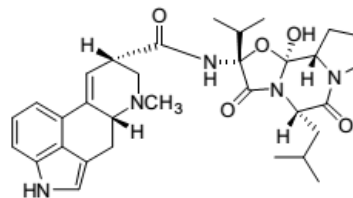
**Ergotaminin**

Mol. masa: 581.7 g/mol



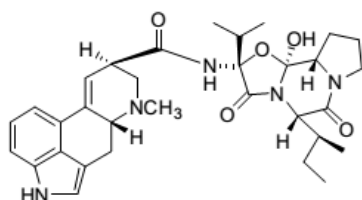
**α-ergokriptin**

Mol. masa: 575.7 g/mol



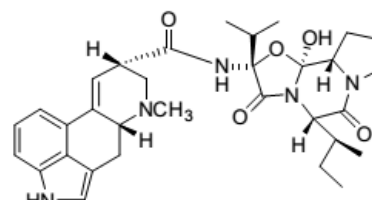
**α-ergokriptinin**

Mol. masa: 575.7 g/mol



**β-ergokriptin**

Mol. masa: 575.7 g/mol



**β-ergokriptinin**

Mol. masa: 575.7 g/mol

**Slika 2.** Kemijske strukture i molekulske mase najznačajnijih EA i njihovih –inin epimera (Tittlemier i sur. 2015)

Čisti EA tvore bezbojne kristale koji su topljivi u organskim otapalima kao što su metanol, acetonitril ili u smjesama pufera i organskih otapala. Neki od njih (posebno oni iz skupine ergoklavina i jednostavnih derivata lizergične kiseline) su slabo topivi u vodi. Pozitivno su nabijeni pri niskim pH vrijednostima ili su bez naboja pri neutralnim i visokim pH-vrijednostima (EFSA, 2012).

Epimerizaciji su podložni  $\Delta 9,10$  – ergoleni u odnosu na asimetriju kod atoma C-8, dok  $\Delta 9,10$  - dvostruka veza više podliježe preraspodjeli putem enolizacije gdje je ovaj proces potaknut vodenom otopinom pri niskim ili visokim pH-vrijednostima. Omjer izvornog EA (tzv. (*R*)-epimera) i njegovog -inin epimera (tzv. (*S*)-epimera), uglavnom se određuje temeljem prirode odgovarajućih ostataka amida koji su prisutni u reakciji. Ovaj omjer, promatran u uzorku ili ekstraktu hrane, može se značajno razlikovati ovisno o strukturi EA, uvjetima skladištenja, izloženosti svjetlu, ekstrakciji ili primijenjenoj analitičkoj metodi. Istraživanje provedeno 2010. godine na *Bundesinstitut für Risikobewertung* (BfR) u Berlinu je dokazalo da unutar jednog laboratorija rad s uzorkom od strane različitih zaposlenika tog istog laboratorija utječe na omjer svakog para EA i njegovog epimera, dok se suma oba epimerna oblika ne mijenja. To je razlog zašto kvantitativni analitički pristup uvijek treba pokriti oba C8 - epimera svakog ergopeptida (EFSA, 2012).

Držanje EA u smeđim staklenim bočicama pri sobnoj temperaturi održava stabilnost svih glavnih ergopeptidnih EA (ergozina, ergotamina, ergokornina,  $\alpha$ -ergokristina, ergokristina) u kloroformu obzirom na epimerizaciju i degradaciju. Kod ostalih otapala ili njihove mješavine u kojima se testirala postojanost, uočeni su različiti stupnjevi epimerizacije na C-8 atomu i/ili degradacije pojedinačnih ergopeptid EA. Suprotno tome, jednostavni derivat lizergične kiseline, ergometrin, nije pokazao gotovo nikakvu epimerizaciju u ergometrinin pri testnim uvjetima (EFSA, 2012). Kako bi se izbjegla značajna epimerizacija ili razgradnja EA u acetonitrilu ili drugim otapalima, EA treba čuvati na temperaturi nižoj od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i izbjegavati ponovno smrzavanje/odmrzavanje. Skladištenje EA u ekstrakcijskom puferu (acetonitril/amonijev karbonatni pufer) u posudama za automatsko uzorkovanje prije analize (koji bi mogao trajati do 18 sati) pokazalo je prihvatljive rezultate u smislu C8 epimerizacije, ali se preporučuju automatski uzorkivači uz hlađenje uzoraka (EFSA, 2012).

### 2.1.2. Podrijetlo ergot alkaloida u gljivama i biljkama domaćina

Ergot alkaloidi su mikotoksini koje produciraju gljivice roda *Claviceps*, najčešće *Claviceps purpurea* (glavnica ili glavica raži) poznata u kontekstu sigurnosti hrane širom svijeta, uglavnom kao uzročnik bolesti žitarica. Ova parazitska gljivica obavlja primarne infekcije uz pomoć askospora nastanjanjem na biljku domaćina te se ubraja u obligatne parazite. Najrasprostranjenija je *Claviceps* vrsta a pripada porodici *Clavicipitaceae*, pododjelu *Ascomycota*. Može kontaminirati više od 400 biljnih vrsta, uključujući neke ekonomski važne žitarice kao što su raž, pšenoraž (tritikale), pšenica, ječam i zob, gdje se u klasu na mjestu zaraze ne razvija pšeno, već crna srpasta tvorevina (tzv. sklerocij) koja u sebi sadržava EA (**Slika 3**)(Miedaner i Geiger, 2015).



**Slika 3.** Ergot sklerocij na klasu raži (Andrašek, 2017)

Prisustvo i količina pojedinih alkaloida u sklerociju u velikoj mjeri varira zbog razlika u zrelosti sklerocija, soju gljivice, biljci domaćinu, geografskom području i vremenskim uvjetima (EFSA, 2017). Sklerociji obično klijanju u vrijeme cvjetanja biljke. Općenito, sklerocij od *C. purpurea* zahtijeva 4-8 tjedana na 0–10 °C za početak klijanja, a više temperature (> 25 °C) produljuju klijanje.

Optimalan raspon temperature klijanja sklerocija je 18–20 °C, iako je dokumentirano da do klijanja može doći i na temperaturi između 9 i 15 °C. Nadalje, zabilježeno je da do klijanja može doći bez razdoblja hlađenja, ali pro hladno i vlažno vrijeme, osobito tijekom cvatnje, pogoduje ostvarenju infekcije (Coufal-Majewski i sur. 2016). Literaturni podaci pokazuju da ukupni sadržaj EA u sklerociju može varirati između 0,01 i 0,5 % (Bryła i sur. 2015). Dužina ergot sklerocija je najčešće između 1 i 3,5 cm, a širina oko 0,3 cm. Unutar dobro zaštićenog tijela ES se nalazi kompaktna masa micelija, sklerocij najčešće tijekom zime otpadne s biljke i tako zaštićen debelom stjenkom čeka toplije vrijeme za rast. Tijekom toplijeg vremena, ES proizvodi sitne strome (**Slika 4**) koje nose peritecije. Tvorbom peritecija, dolazi do razvoja askusa s askosporama koje se u povoljnim uvjetima izbacuju kroz peritecij i dalje šire zrakom do nove biljke domaćina, čime zatvaraju životni ciklus (Brajdić, 2014). U životnom ciklusu gljive prisutan je i konidijski stadij, a konidije također kao i askospore mogu zaraziti zdrave biljke u cvjetanju.



**Slika 4.** Strome ne ergot sklerociju (Menzies i Turkington, 2014)



**Slika 5.** Zrno raži zaraženo ergot sklerocijem  
(Menzies i Turkington, 2014)

Kako se tijekom žetve sklerociji sakupljaju zajedno sa žitaricama ili travom, može doći do kontaminacije hrane i hrane za životinje na bazi žitarica (**Slika 5**). Upravo je sklerocij od *C. purpurea* poznat kao glavni uzročnik kontaminacije hrane s EA u Europi. Glavni EA koje proizvodi *C. purpurea* su ujedno i najznačajniji EA koji su uvršteni u europsko zakonodavstvo (ergokristin, ergotamin, ergokornin, ergokirptin, ergometrin, ergozin i njihovi epimeri), a njihova količina jako varira. Iako su epimeri EA opisani kao biološki neaktivni na neuroreceptorskim mjestima, može doći do interkonverzije u lužnatim ili kiselim uvjetima, pa se oba oblika EA trebaju razmatrati prilikom procjene rizika.

### **2.1.3. Utjecaj klimatskih promjena na rast mikotoksikogenih gljiva i produkciju mikotoksina**

Klimatske promjene smatraju se jednim od pokretača problema vezanih uz sigurnost hrane i hrane za životinje. Njihov utjecaj na prisutnost mikotoksina u hrani i hrani za životinje predstavlja veliku zabrinutost diljem svijeta posebice jer su ti gljivični metaboliti važni uzročnici kronične toksičnosti uzrokovane hranom (Battilani i sur. 2016).

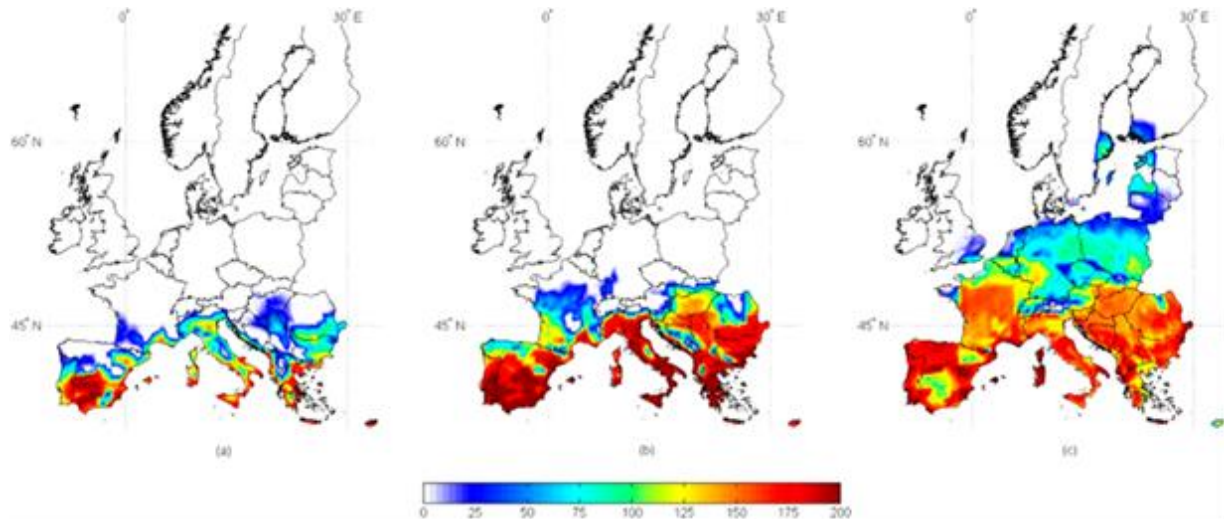
Na rast i razvoj gljiva u biljnom organizmu i sintezu mikotoksina utječu različiti faktori kao što su: temperatura okoline, aktivitet vode, relativna vlaga zraka i vlaga tla, koncentracija CO<sub>2</sub>, pH sredine, prisustvo/odsustvo kisika, prisustvo/odsustvo kompetitora, sposobnost izolata gljive za produkciju mikotoksina, količina inokuluma, ishrana biljaka, prisustvo/odsustvo štetnika i primjena fungicida kao i njihova međusobna interakcija (Miraglia i sur. 2009; Ćosić i sur. 2013; Medina i sur. 2017). Do produkcije mikotoksina dolazi u svim klimatskim zonama, pa je geografska rasprostranjenost mikotoksina vezana uz klimatske uvijete rasta pojedinih plijesni. Primjerice, aflatoksine (AF, koje većinom sintetiziraju plijesni roda *Aspergillus*) češće i u većim koncentracijama nalazimo u žitaricama, orašastim plodovima i začinima u tropskom i subtropskom području (Afrika, Oceanija, Indonezija i Južna Amerika), dok okratoksine (OTA), zearalenon (ZEN) i trihotecene (koje većinom sintetiziraju plijesni rodova *Penicillium* i *Fusarium*) češće možemo naći u umjerenom klimatskom području (Europa, Azija i Sjeverna Amerika). Također, u svakom koraku proizvodnje hrane i hrane za životinje na bazi žitarica okolišni uvjeti utječu na kontaminaciju mikotoksinima. U polju su to visoke temperature u



kombinaciji s previše ili premalo vlage, a u skladištima su temperatura i vlaga zrna (Grbeša i sur. 2014). Globalno zatopljenje i suša tako utječu na povećanje učestalosti i jačinu kontaminacije zrna kukuruza s plijesni *Aspergillus flavus* Link:Fr. u fazi cvatnje i nalijevanja zrna kada je zrnu potrebno puno vode (Battilani i sur. 2016). Prirodno sušenje i skladištenje žitarica u otvorenim silosima omogućuje razvoj plijesni *Aspergillus flavus* i *Penicillium* sp. Stoga se u silazama u aerobnim uvjetima često mogu naći silažne plijesni kao npr. *Penicillium roqueforti* (Grbeša i sur. 2014). Istraživanja su pokazala da tijekom kišnih godina s izraženim temperaturnim promjenama značajno poraste onečišćenje žitarica plijesnima uzrokujući pojačanu tvorbu fuzarijskih mikotoksina (zearalenon, deoksinivalenol, fumonizini i T-2 toksin)(Pleadin i sur. 2015). Tako su Ćosić i sur. (2006) utvrdili da je u godinama povoljnim za razvoj fuzarijske paleži klasa (temperatura iznad 25-28°C i vlažnija klimatska podneblja tj. aktivnost vode od 0,97), količina deoksinivalenola (DON) u pšeničnom brašnu bila dva do tri puta veća u odnosu na godine s izrazito sušnim vremenom u periodu od cvjetanja pšenice do kraja vegetacije. Važno je istaknuti kako za visoku vlagu zraka u usjevu nisu neophodne veće količine oborina u vrijeme kada dolazi do zaraze, već su dovoljne i male količine oborina tijekom više dana. Općenito se tijekom izuzetno vlažnih godina bilježe znatno veće koncentracije mikotoksina, dok se tijekom sušnih godina primjećuje niža koncentracija mikotoksina što se pripisuje sušnijem razdoblju tijekom vegetacije (HAH, 2012). Autori Peraica i Rašić (2012) navode da su u zemljama s umjerenom klimom, ljudi trajno izloženi niskim koncentracijama mikotoksina koji se nalaze u hrani.

Kako bi predvidjeli kontaminaciju mikotoksinima u budućem periodu, koriste se različiti prediktivni modeli koji koriste podatke o klimatskim prilikama i pojavnosti mikotoksina tijekom dužeg vremenskog perioda. Većina modela predviđa da će tijekom ljeta temperature biti više te da će padalina biti manje, što će popratno uzrokovati razdoblja suše s periodima neuobičajeno većih količina oborina. Okoliš u kojem će usjevi biti uzgojeni u sljedećih 10-20 godina značajno će se mijenjati s atmosferskim koncentracijama CO<sub>2</sub> za koje se očekuje se da će povećati dva ili tri puta (od 350 do 700 ili 900-1 000 ppm). Uslijed tog povećanja, kao i povećanja ostalih stakleničkih plinova, očekuje se globalno zatopljenje između 2-5 °C koje će imati različiti učinak ovisno o regiji. Primjerice, predviđeno je da će u sjevernoj Europi doći do prosječnog povećanja temperature za 3-4,5 °C i povećanja količine oborina za 30-40 %. Također se očekuje da će u južnoj Europi biti ekstremno visoke temperature koje će uzrokovati periode suše što će utjecati na prinos usjeva, gljivične bolesti i pojavu mikotoksina. Slična situacija predviđa se u dijelovima subsaharske Afrike, Južne Amerike i dijelovima Azije (Medina i sur. 2015). Tako su Battilani i sur. (2016) procijenili da će globalno zatopljenje od +2 °C i +5 °C uzrokovati češće pojave aflatoksina u zrnu kukuruza u državama južne Europe (Hrvatska, Španjolska, Srbija, Makedonija, Grčka, Italija, Bugarska i Albanija)(**Slika 6**). Par godina ranije, Bebbler i sur. (2013) su predvidjeli da se na globalnoj razini, štetnici i bolesti kreću prema polovima brzinom od 3 km/godinu. Međutim, njihovo istraživanje nije uključivalo bilo koja predviđanja širenja mikotoksigenih gljivica ili mikotoksina.

S ciljem sprječavanja onečišćenja te štetnih posljedica po zdravlje ljudi i životinja, kao i ekonomskih gubitaka u prehrambenoj i stočarskoj industriji važno je provoditi redoviti monitoring mikotoksina te uz podatke o vrsti žitarica bilježiti i lokaciju iz koje žitarice dolaze te klimatske uvijete koji su bili prisutni u ključnim trenucima vezanim uz kontaminaciju plijesnima (cvjetanje žitarica i žetva).



**Slika 6.** Očekivani rizik kontaminacije aflatoksinima u kukuruzu kod a) trenutnih temperatura; porasta srednje temperature za b) 2°C te c) 5 °C (Battilani i sur. 2016)

#### 2.1.4. Povijest ergot alkaloida

Riječ „ergot“ vuče podrijetlo iz francuskog jezika što označava „stražnji prst“ (mamuzu ili ostrugu) na odraslom pijetlu, na koji ES nalikuju, dok prvi zapisi o ES datiraju iz drevne Asirije gdje se spominju kao „štetni mjhurići na klasu žita“ (EFSA, 2012).

Njegovi učinci poznati su od Srednjeg Vijeka kada su se uslijed primjene primitivnih agronomskih i poljoprivrednih mjera često javljala trovanja koja su se vezala uz EA. Naime, prilikom žetve često je dolazilo do kontaminacije zdravog zrnja s ES, a prema nekim zapisima, ES je u određenim uvjetima mogao sačinjavati do četvrtine ukupne žetve. Kako se fizičkom odvajanju ES od ostatka zrnja nije pridavala velika pažnja, ES je zajedno sa zdravim zrnima završavao u brašnu i ostalim proizvodima gdje ga više nije bilo moguće mehanički odvojiti (EFSA, 2012).

Konsumacija manje količine kontaminiranih žitarica uzrokuje probavne smetnje dok veće količine mogu uzrokovati teški oblik trovanja, poznat kao ergotizam. Ergotizam se može manifestirati na dva način: gangrenozno i konvulzivno, a u nekim slučajevima mogu biti zastupljena oba načina. Gangrenozni ergotizam je kroz povijest bio istaknutiji te je bio odgovoran za teško stanje poznato i kao „vatra svetog Antuna“ (Arendt i Zannini, 2013, Bryła i sur. 2015; Miedaner i Geiger, 2015). Ova teška manifestacija vazokonstrukcije uzrokovana EA, karakterizirana je oticanjem i upalom udova i prstiju uslijed čega su žrtve osjećale veliku vrućinu i žarenje (*lat. ignis sacer*, „sveta vatra“) te se takvo stanje smatralo

božjom kaznom. Tijekom nekoliko tjedana bolest bi se razvila u gangrenu koju karakterizira nekroza upaljenih udova i ekstremiteta koji na kraju otpadaju (EFSA, 2012; Brajdić, 2014).

Prva velika epidemija u Europi uzrokovana EA datira iz 9. stoljeća, a zabilježene su i u Francuskoj u 11. stoljeću gdje su se uslijed bolesti počele graditi bolnice posvećene sv. Antunu za pomoć oboljelima. Poznati slučajevi suđenja „vješticama iz Salema“ u 17. stoljeću pripisivao je činovima vještica znakove konvulzivnog ergotizma (**Slika 7**). U tim slučajevima, oboljeli su patili od grčevitih napadaja, osjećaja bockanja, štibanja i grizenja, a česta su bila ukazanja utvara i demona što se danas objašnjava djelovanjem lizergične kiseline kao prekursoru danas poznatijoj halucinogenoj drogi LSD-u (dietilamid lizerginske kiseline)(Woolf, 2000). U Engleskoj su tijekom 18. stoljeća bile zabilježene epidemije ergotizma, ali je njihova pojava bila puno rjeđa nego u ostatku Europe. U Rusiji je također u prošlosti ta bolest predstavljala veliki javnozdravstveni problem pogotovo u razdobljima gladi, kada se uslijed nemogućnosti izbora, konzumiralo i zaražene žitarice (Brajdić, 2014.). U 20. stoljeću je bilo zabilježeno nekoliko epidemija, a posljednja poznata se dogodila 2001. god. u Etiopiji kada se konzumirao ječam koji je sadržavao zaraženu divlju zob. Tom prilikom, od 18 prijavljenih pacijenata, tri osobe su umrle, a djeca su bila glavne žrtve. Kasnije analize su utvrdile da su se koncentracije EA kretale od 2,1 do 26,6 mg ergotamina  $\text{kg}^{-1}$  te od 0,9 do 12,1 mg ergometrina  $\text{kg}^{-1}$  (EFSA, 2012). Danas je pojava ergotizma izuzetno rijetka jer se kondicioniranjem i čišćenjem zrna uklanja većina ES tako da samo vrlo niske koncentracije alkaloida ostaju u brašnu. Osim toga, alkaloidi koji su uzročnici ergotizma su relativno labilni i obično se unište pečenjem i kuhanjem (Peraica i sur. 1999).



**Slika 7.** Suđenje „vješticama iz Salema“ (Brajdić, 2014)

### 2.1.5. Toksikokinetika i toksikodinamika

Podaci o toksikokinetici su rijetki i uglavnom su ograničeni na ergometrin i ergotamin koji se koriste kao farmaceutski proizvodi. Kod ljudi apsorpcija ergotamina je nepotpuna i spora, a odvija se u gastrointestinalnom traktu nakon oralnog unosa uz 60 %-tnu apsorpciju gdje između 1 i 2,7 sati nakon oralnog unosa dostiže najveću koncentraciju u plazmi. Ergometrin se za razliku od ergotamina brzo apsorbira nakon oralnog unosa (EFSA 2012). Uočeno je da se kod preživača većina apsorpcije odvija u predželucima uz različit postotak učinkovitosti, zavisno od EA (jednostavni EA lizergične kiseline su se učinkovitije apsorbirali od ergopeptid alkaloida)(EFSA, 2012). Ergot alkaloidi se nakon apsorpcije brzo distribuiraju u tijelu, a poluživot distribucije se uvelike razlikuje od pojedinca do pojedinca. S druge strane, ciljna mjesta distribucije unutar tijela su slabo poznata. Rezultati jedne studije provedene na štakorima pokazali su da je veća radioaktivnost zabilježena u jetri, srcu, plućima i bubrezima nego u krvi dva sata nakon unosa radioaktivno označenih EA (EFSA, 2012). Rezultati *in vitro* studije, autora Mulac i suradnici (2012) su pokazali potencijal ergometrina, ergotamina, ergokristina i njihovih epimera za prelazak krvno-moždane barijere (Mulac i sur. 2012). Također, pojedini dokazi za domaće životinje pokazuju da se ergopeptini mogu u manjoj mjeri taložiti i u masnom tkivu (EFSA, 2012). O metabolizmu EA postoji malo podataka. Smatra se da je više od 90 % apsorbiranog ergotamina nakon oralnog unosa bilo izloženo metabolizmu prvog prolaza. Novija istraživanja su pokazala da su EA podložni oksidativnim metaboličkim putovima, najčešće katalizirani citokromom P<sub>450</sub> 3A4. Neki EA (npr. ergometrin) mogu se konjugirati s glukuronskom kiselinom. Mikroflora predželudaca u preživača može imati različite uloge u metabolizmu EA. Fermentacija u predželucima može, s jedne strane, osloboditi EA iz biljnog tkiva i time povećati njihovu ukupnu količinu dostupnu za apsorpciju. Nasuprot tome, mikroflora predželudca razgrađuje ergopeptine do lizergične kiseline.

Nakon metabolizma u jetri, ekskrecija putem žuči predstavlja glavni put eliminacije, osim kod preživača (EFSA, 2012). EFSA (2012) je za određivanje akutne toksičnosti (LD<sub>50</sub>) EA uzela u obzir studiju Griffitha i suradnika iz 1978. god. U studiji na miševima, štakorima i zečevima oba spola određena je LD<sub>50</sub> vrijednost za nekoliko prirodno prisutnih i sintetskih EA. Životinje su bile izložene EA oralno, intravenozno i subkutano. Rezultati su za prirodno prisutne EA pokazali nisku oralnu akutnu toksičnost te su oralne LD<sub>50</sub> vrijednosti uvijek bile veće od intravenoznih kod iste životinjske vrste što pokazuje na niski stupanj apsorpcije te visoki metabolizam prvog prolaza kroz koji EA prolaze nakon oralnog unosa. Također su zabilježene razlike u osjetljivosti između životinjskih vrsta, gdje su se zečevi pokazali kao najosjetljiviji. Subletalna, akutna izloženost EA upućuje na znakove neurotoksičnosti kod sisavaca koji se očituju u nemirnosti, suženju ili povećanju zjenice oka, slabosti mišića, drhtavici i krutosti. Nadalje, uočena je gangrena koja se pojavila na repu štakora 5 - 7 dana nakon jednokratne intraperitonealne aplikacije 25 mg ergotoksina kg t.m.<sup>-1</sup> (smjese ergokornina, α- i β-ergokriptina i ergokristina) (EFSA, 2012). U **Tablici 1** prikazane su LD<sub>50</sub> vrijednosti pri intravenoznom unosu ergometrina, ergotamina i

ergozina. Vidljive su jasne razlike u osjetljivosti između pojedinih životinjskih vrsta (EFSA, 2012).

**Tablica 1.** Uspostavljene LD<sub>50</sub> vrijednosti na pojedinim životinjskim vrstama pri intravenoznom unosu ergometrina, ergotamina i ergozina (EFSA, 2012)

Tvar	Životinjska vrsta	LD <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
Ergometrin	Miš	160
	Štakor	120
	Zec	3,20
Ergotamin	Miš	265
	Štakor	38,0
	Zec	3,00
Ergozin	Miš	33,5
	Štakor	30,0
	Zec	1,23

Vezano za toksičnost različitih EA, rezultati nekih studija u kojima se ispitivao parenteralni unos su pokazali da unos različitih EA uzrokuje vazokonstrukciju u repovima štakora, krijestama i podbradnjaku kod pijetlova te dijelovima uha zečeva i pasa, koja posljedično uzrokuje ishemiju tih dijelova. Speijers i suradnici (1993) su proveli istraživanje tijekom kojeg su hranili štakore s različitim koncentracijama ergometrin tartarata tijekom nekoliko mjeseci. Pri većim koncentracijama primijećena je promjena tjelesne mase i težine unutarnjih organa te promjena njihovih funkcija. Primijećene su i određene razlike u jačini ovih promjena među spolovima. EFSA-in Odbor za kontaminante (CONTAM) je na temelju izostanka vazokonstrukcije na repu štakora propisao NOAEL vrijednost (*No Observed Adverse Effect Level*) od 0,4 mg ergotamina kg t.m.<sup>-1</sup>dan<sup>-1</sup> (EFSA, 2012). Istraživanje Peters-Volleberg i suradnika (1996) je služilo za uspostavu NOAEL vrijednosti za ergometrin. Nakon hranjenja štakora sa sintetskim ergometrin maleatom uočili su da je pri visokim koncentracijama došlo do promjena na jetri, metabolizmu glikogena i u razinama serumskog prolaktina. Temeljem tih saznanja, autori su odredili NOEL vrijednost od 0,8 mg ergometrin maleata kg t.m.<sup>-1</sup>dan<sup>-1</sup> (što je ekvivalent 0,6 mg ergometrina kg t.m.<sup>-1</sup>dan<sup>-1</sup>). Rezultati istraživanja Janssena i suradnika (2000a i b). su pokazali da je došlo do promjene u tjelesnoj masi i razinama pojedinih hormona, te masi pojedinih unutarnjih organa i njihovoj funkciji. NOAEL vrijednost je u ovim istraživanjima bila 0,3 mg α-ergokriptina kg t.m.<sup>-1</sup>dan<sup>-1</sup>. NOAEL vrijednosti uspostavljene nakon navedenih istraživanja dovele su do zaključka da ne postoji značajna kvantitativna razlika u toksičnosti između ergotamina, ergometrina i α-ergokriptina.

Postoji nekoliko čvrstih dokaza o nepovoljnim učincima EA na reproduktivne procese. Oni uključuju embriotoksičnost, sprječavanje trudnoće uslijed ometanja implantacije i nepovoljne učinke na razvoj i inhibiciju laktacije. Istraživanje u kojem su štakori subkutano bili izloženi 1 mg ergokornina upućuju da također postoje i određeni dokazi za inhibiciju ovulacije. Griffith i suradnici (1978) su tijekom svog istraživanja analizirali učinke EA na

reproduktivni sustav miševa i hrčaka te su došli do zaključka da EA nemaju direktan toksični učinak ali da ometaju implantaciju inhibirajući otpuštanje prolaktina iz hipofize. Također je zaključeno da najveći potencijal za ometanje implantacije nakon oralnog unosa ima ergokornin, zatim ergonin, ergotamin te ergometrin. Po pitanju mogućnosti uzrokovanja embrionalne smrti u štakora, nakon oralnog unosa najveći potencijal ima ergonin, zatim ergoalanin, ergovalin, ergozin, ergotamin te ergometrin. Zeilmacker i Carlsen (1962) prvi su dokazali da kod štakora postoji utjecaj EA na laktaciju i smanjeno izlučivanje prolaktina. Rezultati istraživanja Shaar i Clemensa (1972) pokazali su izravno djelovanje ergokornina na hipofizu štakora uslijed inhibicije izlučivanja prolaktina. Druga istraživanja su ukazala da je također moguće indirektno djelovanje preko hipotalamusa i da vjerojatno EA mogu djelovati na obje spomenute žlijezde (Floss i sur. 1973). Budući da dopamin sam po sebi inhibira izlučivanje prolaktina, dopaminergična aktivnost EA je vjerojatno odgovorna u oba slučaja za inhibiciju izlučivanja prolaktina. Osim ergotamina, postoji jako malo istraživanja o genotoksičnosti EA. Rezultati *in vitro* istraživanja nisu uočili mutagenost kod ergotamina. Rezultati ranijih istraživanja su pokazali njegovo štetno djelovanje na kromosome u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, iako su bili slabi. Vezano za kancerogenost, ne postoje istraživanja o dugotrajnoj izloženosti ergometrinu, ergotaminu, ergozinu, ergokorninu, ergokristinu i ergokriptinu i njihovim epimerima (EFSA, 2012).

#### **2.1.6. Primjena ergot alkaloida kao lijekova**

Ergot alkaloidi osim negativnih fizioloških učinaka, pokazuju i širok spektar farmakoloških učinaka od kojih su neki poznati stotinama godina. Tako su se u prošlosti koristili medicinski preparati od sklerocija *Claviceps purpureae* kod poroda, liječenja migrene i poremećaja živčanog sustava. U međuvremenu su ove preparate zbog bolje standardizacije zamijenili lijekovi od izoliranih EA, ali i zbog toga što se uočilo da nema smisla unositi „koktel“ EA jer imaju različite farmakološke učinke (EFSA, 2012).

Ergotamin se u obliku ergotamin tartarata često koristi u medicinske svrhe za liječenje migrene i tzv. cluster glavobolje, a bilo je pokušaja liječenja i ortostatske hipotenzije (naglog pada tlaka nakon zauzimanja stajajućeg položaja). Njegovo korištenje ima i štetne nuspojave pa postoje točno propisane maksimalne dnevne, tjedne i mjesečne doze koje se ne smiju prekoračiti. Te doze ne vrijede za trudnice i osobe koje koriste terapiju koja bi mogla biti u kontraindikaciji s ergometrin tartaratom. Štetne nuspojave ergotamina se prvotno odnose na učinke na centralni živčani sustav ili na vazokonstrikciju krvnih žila te moguće stvaranje tromba. Ukoliko se prekorače propisane doze, može doći do mučnine, povraćanja, osjećaja hladnoće, peckanja, svrbeži kože, dijareje, ekstremne žeđi, brzog i slabog pulsa, promjena u krvnom tlaku, stanja šoka i na kraju stanja nesvijesti. Zabilježeni su i smrtni slučajevi uslijed respiratornog i kardiovaskularnog zastoja. Kronična prekoračenja propisanih koncentracija mogu uzrokovati trajne glavobolje i pojavu ergotizma (EFSA, 2012).

Ergometrin se u medicinske svrhe koristi u obliku ergometrin maleata. Za razliku od drugih EA, ima puno selektivnije djelovanje na maternicu, posebice u periodu od šest

tjedana nakon poroda. Njegovo djelovanje se očituje u uzrokovanju snažnih kontrakcija maternice, koje pri većim koncentracijama mogu biti neprekidne, dok oksitocin uzrokuje fiziološki ritmičke kontrakcije. Ergometrin maleat koristi se za aktivno upravljanje trećom porođajnom dobi i za sprječavanje ili liječenje postporođajnog ili postabortivnog krvarenja uzrokovanog nemogućnosti stezanja maternice. Za korištenje ovog preparata postoje točno propisane doze. Kao štetne nuspojave se najčešće ističu mučnina i povraćanje, a može doći i do proljeva, glavobolje, vrtoglavice, bolova u trbušnoj šupljini, zujanja u ušima, boli u prsima, drhtavice, bradikardije te drugih srčanih aritmija, sužavanja krvnih žila, srčanog infarkta te otežanog disanja (dispneje). Za razliku od ergotamin tartarata, ergometrin maleat pokazuje manji potencijal za razvoj gangrene, ali su slučajevi ergotizma također zabilježeni, dok su simptomi akutnog trovanja u oba slučaja vrlo slični (EFSA, 2012).

### 2.1.7. Pojavnost ergot alkaloida u hrani

Višegodišnja istraživanja su pokazala da EA najčešće možemo naći u žitaricama i proizvodima od žitarica, posebice u raži i proizvodima od raži. Rezultati analiza uzoraka hrane i hrane za životinje prikupljeni u periodu od 2011. do 2016. u 15 europskih zemalja pokazali su najviše zabilježene srednje vrijednosti količine EA u „mlinskim proizvodima od raži“ ( $198\text{-}239\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i u „neobrađenoj raži“ ( $149\text{-}203\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Slične količine EA zabilježene su u različitim proizvodima od raži kao što su „miješani pšenični i raženi kruh i pecivo“ gdje je utvrđena srednja količina EA od  $28\text{-}32\ \mu\text{g kg}^{-1}$  te u „raženom kruhu i pecivu“ i u „ražnim pahuljicama“ gdje su također utvrđene značajne količine EA ( $29\text{-}67\ \mu\text{g kg}^{-1}$  i  $35\text{-}83\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (EFSA, 2017). EA su također detektirani u „mlinskim proizvodima od pšenice“ ( $12\text{-}87\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ), zobnim pahuljicama ( $3\text{-}100\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i pšenici ( $1\text{-}68\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Manje koncentracije EA ( $11\text{-}12\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ) izmjerene su i u „keksima, tostima i kolačićima za djecu“ (EFSA, 2017). Ranije istraživanje o prisustvu EA u žitaricama namijenjenim za prehranu ljudi i hranidbu životinja koje je obuhvatilo 803 uzoraka hrane i hrane za životinje iz 13 europskih zemalja, je utvrdilo prisustvo EA u 95 % uzoraka hrane na bazi raži i u 86 % uzoraka hrane na bazi pšenice namijenjenih za prehranu ljudi. Iako su EA najčešće bili detektirani u hrani za ljude, najveća količina EA je utvrđena u hrani za životinje na bazi raži ( $12\ 340\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (EFSA, 2011). Crews i suradnici (2009) su utvrdili prisustvo EA u žitaricama i proizvodima od žitarica u Švicarskoj, Kanadi, Danskoj i Njemačkoj, a najveća količina izmjerena je u raženom brašnu iz Njemačke. Također, istraživanje Bryła i suradnika (2015) o prisustvu EA u raži i proizvodima od raži je detektiralo EA u 83 % uzoraka neobrađene raži, 94 % uzoraka raženog brašna i u svim (100 %) uzorcima raženih mekinja i pahuljica. Najviša koncentracija EA ( $1\ 216\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ) utvrđena je u raženom brašnu.

Prisutnost najznačajnijih vrsta EA u hrani je različita. U Europi su najčešće detektirani ergotamin, ergokristin i ergozin, a slijede ih ergokorninin i ergometrinin (EFSA, 2017). Starije EFSA-ino izvješće (2011) isticalo je ergometrin i ergozin kao najčešće izmjerene EA u hrani i hrani za životinje. Ranije spomenuto istraživanje (Bryła i sur. 2015) je utvrdilo najčešće prisustvo ergotamina, ergozina i ergokornina dok su ergometrin i ergometrinin

detektirani u najmanjem broju uzoraka. Prisutnost EA u zrnu žitarica je donekle povezana s prisutnošću ES. Budući da EA mogu biti prisutni osim u ES i u prašini iz ES, gdje se mogu adsorbirati na žitarice, ova povezanost nije apsolutna (EFSA, 2017). Od važnosti je postaviti maksimalne količine EA za neprerađene žitarice i proizvode od žitarica, a ne samo za ES. Također je potrebno odrediti u kojoj fazi prerade je maksimalna količina ES, kako bi se primijenili odgovarajući postupci poput čišćenja i sortiranja u svrhu smanjenja istih. Crews i suradnici (2009) naveli su da metode probira bazirane na gustoći i boji mogu ukloniti oko 80 % ES iz zrna. U velikim mlinovima se mehaničko čišćenje koristi kao standardni postupak za uklanjanje ES iz zrna prije mljevenja. Međutim, ako ES prilikom mehaničkog čišćenja budu slomljeni, mali djelići ES se ne mogu detektirati (Crews i sur. 2009). U velikim mlinovima se koristi i gravitacijska ploča koja potpomognuta zračnim strujanjem odvaja sklerocije manje specifične težine od zrna. Koriste se i optički-elektronski sorteri žitarica koji odvajaju crna zrna ES od plavkasto-sivih zrna raži ili svjetlo obojenih zrna pšenice ili ječma (Miedaner i Geiger, 2015).

#### **2.1.7.1. Zakonska regulativa**

U Uredbi EK 1881/2006 o kontaminantima u hrani, uspostavljene su najveće dopuštene količine (NDK) za mnoge kontaminante, ali nisu i za EA. Temeljem toga, Europska komisija je izdala *Preporuku Europske komisije od 15. ožujka 2012. o praćenju prisutnosti ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje (2012/154/EU)*. U njoj se preporučuje državama članicama provođenje monitoringa na prisutnost EA u žitaricama i njihovim proizvodima namijenjenim prehrani ljudi i hranidbi životinja, uz aktivno sudjelovanje subjekata u poslovanju s hranom i hranom za životinje. Preporučeno je ispitivati barem sljedeće EA i njihove –inin epimere: ergokristin/ergokristinin, ergotamin/ergotaminin, ergokriptin/ergokriptinin, ergometrin/ergometrinin, ergozin/ergozinin i ergokornin/ergokorninin. Prema Preporuci, države članice bi također trebale istodobno utvrditi, gdje god je moguće, sadržaj ES u uzorku, zbog unaprjeđenja znanja o odnosu između prisutnosti ES i koncentracije pojedinih EA (EFSA, 2012).

Podaci prikupljeni temeljem Preporuke 2012/154/EU, rezultirali su donošenjem *Uredbe Komisije (EU) 2015/1940 od 28. listopada 2015. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina ergot sklerocija glavice raži na određenim neprerađenim žitaricama te odredaba o praćenju i izvješćivanju (Slika 8)*. U ovoj Uredbi se propisuju najveće dopuštene količine ES za neprerađene žitarice, osim kukuruza i riže, a koje iznose do 0,5 g kg<sup>-1</sup>. Također su propisane koje točno kategorije hrane je potrebno uzorkovati i analizirati na EA, međutim još ni jedan NDK nije propisan za EA (EFSA, 2017).



## PRILOG

Prilog Uredbi (EZ) br. 1881/2006 izmjenjuje se kako slijedi:

1. U odjeljku 2. dodaje se sljedeći unos 2.9.:

„2.9.	Sklerocij glavice raži i alkaloidi glavice raži	
2.9.1.	Sklerocij glavice raži	
2.9.1.1.	Neprerađene žitarice <sup>(18)</sup> , osim kukuruza i riže	0,5 g/kg <sup>(1)</sup>
2.9.2.	Alkaloidi glavice raži <sup>(2)</sup>	
2.9.2.1.	Neprerađene žitarice <sup>(18)</sup> , osim kukuruza i riže	— <sup>(3)</sup>
2.9.2.2.	Proizvodi od meljave žitarica, osim od meljave kukuruza i riže	— <sup>(3)</sup>
2.9.2.3.	Kruh (uključujući male pekarske proizvode), kolači, keksi, <i>snack</i> proizvodi od žitarica, žitarice za doručak i tjestenina	— <sup>(3)</sup>
2.9.2.4.	Hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu	— <sup>(3)</sup>

2. Bilješka 18. zamjenjuje se sljedećom:

„<sup>(18)</sup> Najveća dopuštena količina primjenjuje se na neprerađene žitarice koje se stavljaju na tržište za prvi stupanj prerade.

„Prvi stupanj prerade“ znači svaka fizikalna ili toplinska obrada zrna ili na zrnju, osim sušenja. Postupci čišćenja, uključujući ljuštenje, sortiranja i sušenja ne smatraju se „prvim stupnjem prerade“ ako cijelo zrnje ostane netaknuto nakon čišćenja i sortiranja.

Ljuštenje je čišćenje žitarica snažnim četkanjem i/ili ribanjem.

Ako se ljuštenje primjenjuje u prisutnosti sklerocija glavice raži, žitarice se prije ljuštenja moraju podvrgnuti prvom koraku čišćenja. Nakon ljuštenja, koje se provodi uz usisivač prašine, provodi se razvrstavanje po bojama prije meljave.

Sustavi integrirane proizvodnje i prerade označuju sustave u kojima su sve dolazne serije žitarica očišćene, razvrstane i obrađene u istom pogonu. U takvim sustavima integrirane proizvodnje i prerade najveća dopuštena količina primjenjuje se na neprerađene žitarice nakon čišćenja i razvrstavanja, ali prije prvog stupnja prerade.

Subjekti u poslovanju s hranom osiguravaju sukladnost svojim postupkom u okviru HACCP-a, pri čemu se utvrđuje i provodi učinkovit postupak praćenja na toj kritičnoj kontrolnoj točki.”

<sup>(1)</sup> Uzorkovanje se provodi u skladu s točkom B Priloga I. Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006 (SL L 70, 9.3.2006., str. 12.).

Analiza se provodi mikroskopskim pregledom.

<sup>(2)</sup> Zbroj 12 alkaloida glavice raži: ergokristin/ergokristinin; ergotamin/ergotaminin; ergokriptin/ergokriptinin; ergometrin/ergometrinin; ergozin/ergozinin; ergokornin/ergokorninin.

<sup>(3)</sup> Prikladne i ostvarive najveće dopuštene količine kojima bi se osigurala visoka razina zaštite zdravlja ljudi razmotrit će se za te relevantne kategorije hrane do 1. srpnja 2017.”

### Slika 8. Isječak iz Uredbe (EU) 2015/1940 (Službeni list Europske unije, L 283/3)

*Uredba komisije (EU) br. 1272/2009 od 11. prosinca 2009. o utvrđivanju zajedničkih detaljnih pravila za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 1234/2007 u pogledu otkupa i prodaje poljoprivrednih proizvoda u okviru javne intervencije* je propisala da žitarice „moraju biti zdrave, besprijeorne i tržišne kvalitete“ kako bi bile prihvatljive za javno posredovanje. Ovi zahtjevi su ispunjeni ako žitarice u svakoj fazi razvoja nemaju neuobičajen miris i žive štetnike (uključujući grinje), ako ispunjavanju određene minimalne zahtjeve kvalitete i ako njihove razine kontaminanata, uključujući radioaktivnost, ne prelaze najviše dopuštene razine propisane europskim zakonodavstvom.

Prethodno spomenuti minimalni zahtjevi kvalitete su uspostavljeni i uključuju između ostalog i glavice raži, koje se kao nečistoće ne smiju nalaziti u žitaricama. Stoga su Uredbom 1272/2009 propisane najveće količine glavice raži od 0,05 % ili 500 mg kg<sup>-1</sup> u durum (tvrdoj) i običnoj pšenici, dok za EA nisu uspostavljene najveće dopuštene količine (NDK). Prisutnost EA u hrani za životinje regulirana je *Direktivnom 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje*, gdje se EA kao takvi ne spominju. Međutim, Direktivom je uspostavljen NDK za *Claviceps purpurea* (glavicu raži) i iznosi 1 000 mg kg<sup>-1</sup>, za krmiva i krmne smjese koje se sastoje od nemljevenih žitarica s udjelom vlage od 12 %.

## 2.2. Raž i proizvodi od raži

Raž (*Secale cereale* L.) je žitarica koja se uzgaja u sjevernoj, središnjoj i istočnoj Europi, a glavna primjena joj je u pekarskoj industriji (Rakha i sur. 2010). Raženo zrno zauzima drugo mjesto u proizvodnji kruha (nakon pšeničnog), ali se koristi i za proizvodnju drugih proizvoda namijenjenih ljudskoj prehrani (npr. škrob, sirup, ocat) ili kao hrana za životinje.

Zrna raži su normalno plavkasto-sive boje, ali boja može varirati ovisno o području uzgoja i uvjetima berbe. Zrno raži čine tri glavna dijela - mekinje, endosperm i klica. Škrobni endosperm čini 86,5 % zrna, dok udio mekinja može biti do 10 %, a klica 3,5 % zrna. Škrobni endosperm mekši je od pšeničnog, pa se lakše oslobađa mljevenjem (Arendt i Zannini, 2013). Vanjski sloj endosperma raži (aleuronski sloj) bogat je proteinima, mineralima i vitaminima, osobito vitaminima B skupine (**Tablica 2**) (Arendt i Zannini, 2013).

**Tablica 2.** Sadržaj minerala i vitamina u raženom zrnu (Arendt i Zannini, 2013)

Sastojak (mg/ 100 g suhe tvari)	Raž	Pšenica
<b>MINERALI</b>		
Fosfor	380	410
Kalij	520	580
Kalcij	70,0	60,0
Magnezij	130	180
Željezo	9,00	6,00
Bakar	0,90	0,80
Mangan	7,50	5,50
<b>VITAMINI</b>		
B <sub>1</sub>	0,44	0,55
B <sub>2</sub>	0,18	0,13
B <sub>3</sub>	1,50	6,40
B <sub>5</sub>	0,77	1,36
B <sub>6</sub>	0,33	0,53

Sastav zrna raži je tipičan kao i kod ostalih žitarica koje sadrže oko 70 % ugljikohidrata (**Tablica 3**). Škrob je kao kod pšenice i ječma, pohranjen u endospermu i predstavlja glavnu komponentu ugljikohidrata. Raž obično sadrži manje škroba i sirovih proteina u odnosu na pšenicu, ali više slobodnog šećera i vlakana. Od slobodnih šećera, saharoza dominira. Sadržaj proteina u raži sličan je sadržaju pšenice, iako u oba slučaja postoje značajne varijacije (oko 8-15 %), ovisno o uvjetima rasta i sorti. Vrijednosti lipida, sirovih vlakana i pepela također su slične kao kod pšenice i tritikale. Vlakna raži predstavljaju oko 17 % cjelovitog zrna, od čega su otprilike 4 % topiva vlakna. Najčešće komponente vlakana u raži su pentozani,  $\beta$ -glukan, lignin, celuloza i arabinoksilani (Arendt i Zannini, 2013). Tako su Vink i Delcour (1996) naveli da zrno raži koje sadrži 16,5 % vlakana ima 2,3 %  $\beta$ -glukana, 2,6 % celuloze, 3 % lignina i 7,6 % arabinoksilana.

**Tablica 3.** Prosječni sastav zrna raži i ostalih žitarica (Arendt i Zannini, 2013)

	<b>Raž</b>	<b>Tritikal</b>	<b>Pšenica</b>	<b>Ječam</b>	<b>Kukuruz</b>	<b>Riža</b>
<b>Ugljikohidrati</b>	75,8	72,1	66,9	80	67,7	75,4
<b>Sirovi proteini</b>	13,4	14,8	14,0	12,0	10,3	8,5
<b>Masti</b>	1,8	2,0	2,1	2,5	4,5	2,1
<b>Sirova vlakna</b>	2,6	3,1	2,6	2,3	2,3	0,9
<b>Pepeo</b>	2,1	2,0	1,9	2,5	1,4	1,4
<b>Vlaga</b>	10,6	10,5	12,5	9,4	13,8	11,7

Raž u odnosu na pšenicu karakteriziraju velike količine lizina i hemiceluloze kao što su pentozani, što značajno utječe na funkcionalnost svojstva raži u proizvodnji kruha. Hemiceluloza sprječava agregaciju proteina u gluten koji je potreban za razvoj viskoelastičnih svojstava tijesta. Zbog visokog sadržaja vlakana i ostalih bioaktivnih komponenti, ova žitarica ima potencijal za smanjenje rizika od „zapadnih“ bolesti vezanih uz prehranu, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes tipa 2, hiperkolesterolemija i pretilost te pokazuje potencijal za učinkovitije korištenje u novim vrstama funkcionalnih proizvoda za ljudsku prehranu (Kujala, 1994; Heiniö i sur. 2003; Hansen i sur. 2004; Saeleaw i sur. 2012).

Raž daje ekonomski održive prinose na siromašnim, pjeskovitim tlima gdje drugi usjevi slabije rastu, a u nekim zemljama se koristi kao pionirski usjev za poboljšanje plodnosti pustog i sterilnog tla (Arendt i Zannini, 2013). Tolerantna je na niske temperature, a ima manje potrebe za vodom od pšenice. Osim što uspijeva na manje plodnim i novoosvojenim tlima, dobro podnosi i kisela tla. Međutim, žetva raži je puno sporija i teža u odnosu na ostale strne žitarice radi žilavosti slame (Međimurec, 2018). Raž je također otpornija od pšenice na mnoge štetočine i bolesti. S druge strane, osjetljivija je od pšenice na napad gljivice *Claviceps purpurea* pa je često kontaminirana ES (Arendt i Zannini, 2013).

Računa se da raž čini samo 1 % ukupne svjetske proizvodnje žitarica. Iako se uzgaja globalno, njena kultivacija je uglavnom koncentrirana u Poljskoj, Njemačkoj, zapadnoj Rusiji i Ukrajini gdje se raženi kruh često konzumira (Hansen i sur. 2004; Arendt i Zannini, 2013; Miedaner i Geiger, 2015). U RH je slabo zastupljena ratarska kultura, manjeg gospodarskog značaja. Najčešće se uzgaja u brdskim i planinskim predjelima, na tek nešto više od 1 500 – 2 000 ha, a prinosi, uz odgovarajuće uvjete (vlaga iznad 14 % i u punoj zrelosti) mogu iznositi i više od 5 t/ha (Međimurec, 2018). Zbog relativno malih zahtjeva za gnojivom i mjerama njege bilja, pogodna je za uzgoj u ekološkom načinu proizvodnje. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku, proizvodnja raži u Hrvatskoj u 2014. godini iznosila je 1302,49 ha, odnosno 0,3 % od ukupno zasijanih žitarica. U RH je od 2016. godine na snazi *Pravilnik o ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji* (NN, 19/16) kojim se osigurava provedba uredbi Europske Unije o ekološkoj proizvodnji (834/2007; 889/2008 i 1235/2008). Navedenim uredbama su prvenstveno utvrđena načela, ciljevi i sveobuhvatna pravila za ekološku proizvodnju te je određen način na koji se označavaju

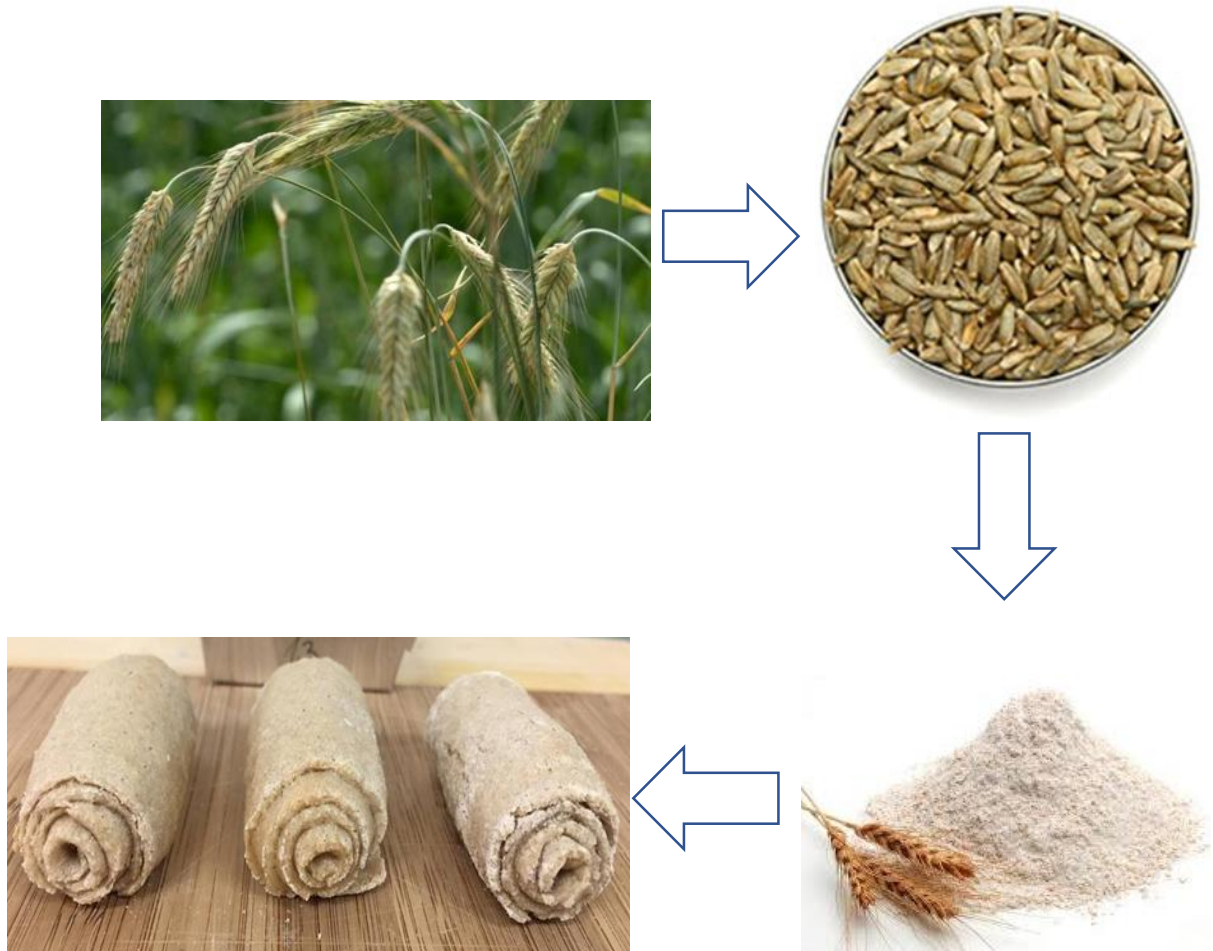
ekološki proizvodi. Budući da u ekološkoj proizvodnji nije dozvoljena zaštita industrijskim pesticidima, postoji zabrinutost da bi ekološki proizvedena raž mogla sadržavati više EA. Stoga je važno prilikom analiza raži na prisustvo EA uzeti u obzir i ekološki proizvedenu raž, a ne isključivo konvencionalno proizvedenu raž.

### 2.2.1. Proizvodnja brašna i kruha od raži

Raženo brašno, za razliku od pšeničnog brašna sadrži manju količinu glutena koji tvori glutensku mrežu odgovornu za vezanje vode i zadržavanje plinova. Kod raženog brašna ovu ulogu imaju pentozani čija se topivost i bubrenje povećavaju u kiselom mediju. U kiselom mediju se također smanjuje aktivnost amilaza što smanjuje ljepljivost sredine i povećava volumen kruha. Zbog toga je za proizvodnju raženog kruha (**Slika 9**) obavezna primjena kiselog tijesta ili nekog drugog sredstva za zakiseljavanje (organske kiseline), dok je kod proizvodnje bijelog kruha to stvar izbora. Mikrofloru kiselog tijesta čine bakterije mliječno-kiselog vrenja i kvasci u aktivnom stanju. Bakterije mliječno-kiselog vrenja su dominantni mikroorganizmi u kiselom tijestu, a potiču iz samih žitarica, kontaminacije pekarskog kvasca ili same mlinarske i pekarske industrije. Okus, miris, reologija i nutritivne karakteristike kruha proizvedenog uz dodatak kiselog tijesta ovise o aktivnosti ovih bakterija. Osim njih, u kiselom tijestu se može se naći više od 20 vrsta kvasaca, a dominantan je pekarski kvasac *S. cerevisiae* (Mrvčić i sur. 2011). Ukupni sadržaj proteina je također manji u raženom brašnu u odnosu na pšenično brašno pa je raženi kruh gušći i žilaviji od pšeničnog. Kako je škrob raži sklon enzimskoj razgradnji, naročito pri višim temperaturama, sredina raženog kruha postaje vlažna, a tijesto omekšava. Raženi kruh je tamniji, sadrži više vlage, ima slabije razvijenu sredinu, nije šupljikav poput pšeničnog kruha i duže zadržava svježinu. Za proizvodnju raženog tijesta postoje direktan, indirektan i kombinirani postupak. U direktnom postupku koristi se raženo brašno, voda, sol, kvasac i sredstvo za zakiseljavanje, dok indirektan postupak pripreme osim brašna, vode, soli koristi kiselo tijesto, čime se osigurava sigurna proizvodnja i ujednačena kakvoća tijesta. 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).

Miješenje tijesta se provodi pomoću mjesilica, a vrijeme miješenja je zbog male količine dodataka veoma kratko te se ne provodi intenzivno. Tijesto nakon toga ide na odmaranje, obradu, odvagu i oblikovanje te fermentaciju. Temperatura fermentacije je najčešće do 40 °C, a vrijeme fermentacije je od 20 do 50 minuta. Na proces fermentacije kiselog tijesta utječu temperatura, upotrijebljena starter kultura, supstrat i prinos tijesta. Poslije fermentacije se tijesto peče pri temperaturi od 200 do 270 °C. Boja kore kruha ovisi o mješavini brašna, temperaturi i trajanju pečenja, relativnoj vlažnosti zraka i pH vrijednosti tijesta (Schünemann i Treu, 2012). Kiselo tijesto se upotrebljava za dobivanje kruha boljih tehnoloških, mikrobioloških, nutritivnih i organoleptičkih svojstava. Bakterije mliječno-kiselog vrenja obzirom na način fermentiranja glukoze, mogu biti homofermentativne i heterofermentativne. Dok homofermentativne fermentiraju glukozu do mliječne kiseline (90 %) i ostalih metabolita, heterofermentativne fermentiraju glukozu do mliječne kiseline (50 %), etanola, octene kiseline i drugih metabolita. Osim navedenih metabolita, mogu

nastati i aldehidi, esteri te druge hlapljive i nehlapljive organske kiseline. Bakterije roda *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*...) su najznačajnije bakterije mliječno-kiselog vrenja.



**Slika 9.** Raž – od klasa do kruha (Andrašek, 2017)

### 2.2.2. Proizvodnja tjestenine

Tehnološki proces proizvodnje tjestenine sastoji se od više postupaka koji obuhvaćaju pripremu i doziranje sirovina; zamjes ili miješanje sirovina; oblikovanje i sušenje vlažne tjestenine te pakiranje i skladištenje tjestenine (Krnić, 2012). Sirovine (krupica i brašno) koje se koriste za proizvodnju tjestenine moraju biti svježije samljevane i neodležane te se prije zamješivanja moraju prosijati i propustiti preko magneta. Prosijavanjem se odstranjuju nečistoće na temelju dimenzija, a propuštanjem preko magneta svi metalni dijelovi (Krnjak, 2010). Slijedi doziranje sirovina koje se može provoditi kontinuirano (pomoću dozatora koji je sastavni dio mjesilice) ili diskontinuirano (odmjeravanje potrebne količine sirovina posebno za svaku šaržu) (Krnić, 2012). Zamjesom ili miješanjem sirovina se dobiva homogena smjesa optimalne konzistencije. U brašno se

dodaje znatno manja količina vode nego što brašno ima moć upijanja vode. Dužina zamješivanja tijesta kreće se od 10 do 20 min ovisno o kvaliteti brašna, veličini čestica brašna, količini dodane vode i temperature zamjesa.

Tjestenina se može oblikovati ekstrudiranjem ili stanjivanjem između valjaka (Pagani i sur. 1989). Proces ekstrudiranja podrazumijeva primjenu mehaničke energije puža što uzrokuje prolazak mokrog zamjesa krupice i vode kroz ekstruder te formiranja tijesta izlaskom kroz sapnicu koja može biti teflonska ili brončana (Haraldsson, 2010; Wrigley i sur. 2004). Čestice krupice izlučuju fibrile te se stvara glutenska mreža, a tijesto postaje kohezivno (Kosović, 2017). Za elastičnost tijesta najzaslužniji su glijadin i glutenin, jer tijekom zamjesa reagiraju te se stvaraju disulfidne veze, pri čemu nastaje gluten koji daje tijestu elastičnost (Zweifel, 2001; Sissons, 2008). Sušenje tjestenine se provodi u uređajima s mogućnošću kontrole temperature, vlažnosti i strujanja zraka (**Slika 10**), a glavni cilj sušenja je smanjenje sadržaja vlage u cijelom proizvodu do razine koja osigurava mikrobiološku stabilnost. Ono također uključuje optimiranje teksture i boje čime se postiže odgovarajuća kvaliteta proizvoda. Poboljšanje teksture postiže se povećanjem ukrštavanja proteina pri višim temperaturama čime se poboljšava stezanje, tj. sprječava otpuštanje škroba. Poboljšanje boje može se postići na dva načina. Prvi podrazumijeva brzo uklanjanje enzima lipoksigenaze pri visokim temperaturama u prvoj fazi sušenja. U protivnom bi lipoksigenaza razgradila  $\beta$ -karoten prisutan u tjestenini. Drugi način su Maillardove reakcije pri čemu nastaju pigmenti i aromatične tvari. Završna faza sušenja je zona staklastog prijelaza tjestenine tijekom koje se ona hladi kako bi se dobio finalni proizvod odgovarajuće temperature (što bliže sobnoj temperaturi)(Kill i Turnbull, 2001).



**Slika 10.** Uređaj za sušenje tjestenine

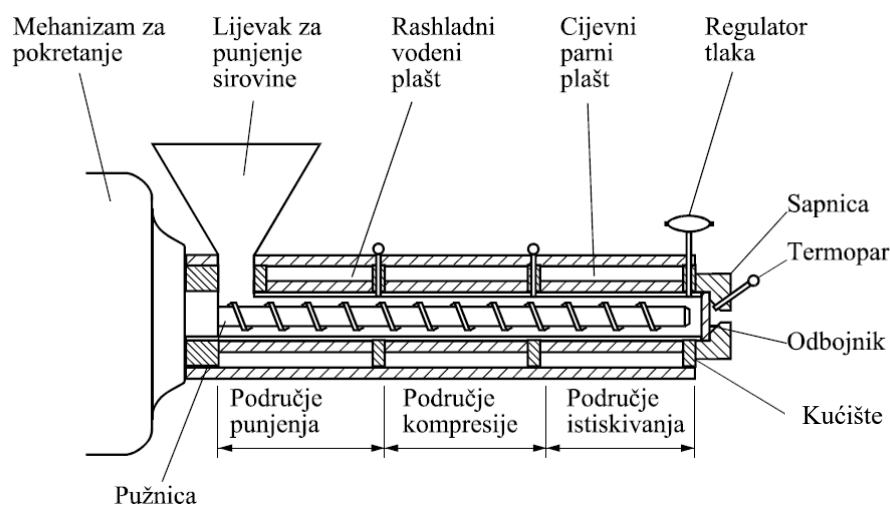
Izvor: <https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A1199/datastream/PDF/view;>  
(2.6.2019)

Prije konzumacije tjestenina zahtijeva kuhanje do optimalnog vremena pri čemu nestane središnji bijeli dio uzoraka tjestenine, tj. neželatinizirani škrob. Kuhanjem dolazi do procesa difuzije i hidracije proizvoda. Strukturna i teksturalna svojstva kuhane tjestenine određuje škrob koji želatinizira tjesteninu i proteini koji utječu na koagulaciju (Kosović, 2017). Osušena i ohlađena tjestenina odlazi na pakiranje i skladištenje. Pakira se u PVC folije, kartonsku ambalažu i papirnate vrećice koje ju štite od mikrobioloških, biokemijskih i fizikalnih promjena koje mogu dovesti do značajnog gubitka kvalitete. Temperatura skladištenja tjestenine iznosi 20 °C (Šimonji, 2011).

### 2.2.3. Proizvodnja snack proizvoda

U proizvodnji snack proizvoda koristi se proces ekstruzije, koji je danas zbog niza prednosti jedan od najznačajnijih metoda za preradu hrane u prehrambenoj industriji. Ekstruderi pripadaju obitelji HTST (engl. *high temperature short time*) uređaja, sposobnih provoditi obradu hrane pod visokim tlakom. Ekstruzija se može koristiti za proizvodnju/preradu različitih sirovina, polugotovih i gotovih prehrambenih i neprehrambenih proizvoda (npr. tjestenina, mesne prerađevine, konditorski proizvodi, hrana za kućne ljubimce, proizvodnja kablova te proizvoda od plastike). Ovim postupkom povećava se probavljivost hrane i smanjuje broj mikroorganizama, a ekstrudati mogu biti pjenasti ili u obliku peleta (Tanasković, 2014).

Tri osnovna postupka ekstruzije koji se koriste u prehrambenoj industriji su: hladno ekstrudiranje, želatinizacija (geliranje) i toplo ekstrudiranje (Lovrić, 2003). **Slika 11** prikazuje zone jednopužnog ekstrudera na kojima se zasniva princip njegovog rada (ali i rada svih ostalih ekstrudera). To su: zona punjenja (uvlačenja), zona prijelaza (kompresije) i zona istiskivanja. Zona punjenja obuhvaća prihvata, transport i tlačenje materijala do istisne zone. U prijelaznoj zoni vrši se kompresija materijala i plastificiranje (zbog pretvorbe mehaničke energije u toplinsku, tj. porasta temperatura) materijala koji je u početku bio praškast ili u vidu granula.



**Slika 11.** Presjek jednopužnog ekstrudera s odgovarajućim zonama (Lovrić, 2003)

Za proizvodnju ekstrudiranih proizvoda se koriste sirovine bogate škrobom i proteinima. Kukuruz je najpopularnija sirovina, a sorte kukuruza koje se koriste u prehrambenoj industriji se dijele na tvrde i meke. Meke sorte se obično koriste za proizvodnju krupice i brašna (Móscicki, 2011). Suho mljevenje kukuruza je postupak kojim se može dobiti krupica ili brašno, a ti proizvodi se koriste uglavnom za proizvodnju različitih snack proizvoda, žitarica za doručak i sl. Postupak mokrog mljevenja kukuruza se koristi u tehnologiji proizvodnje škroba. Dobiveni škrob predstavlja sirovinu za proizvodnju glukoznog i fruktoznog sirupa, dekstrina, sorbitola i slično (Jozinović, 2015).

Osim kukuruza, za proizvodnju snack proizvoda se obično koriste još i pšenica, riža te krumpirovo brašno. Raž u proizvodnji ekstrudiranih proizvoda nije toliko česta, ali se uglavnom koristi zbog obogaćivanja finalnog proizvoda i poboljšanja funkcionalnih karakteristika. Svojstva koje posjeduju sirovine za proizvodnju ekstrudiranih proizvoda i pomoću kojih se postiže raznolikost proizvoda su:

- formiranje strukture,
- olakšavanje fizičke transformacije tijekom ekstruzijskog kuhanja,
- utjecanje na viskoznost materijala i njegovu plastičnost,
- olakšavanje homogenizacije sastojaka tijesta,
- ubrzavanje topljenja i želatinizacije škroba,
- poboljšanje okusa i boje proizvoda (Móscicki, 2011).

#### **2.2.4. Proizvodnja keksa**

Prvi korak u proizvodnji keksa uključuje miješanje sastojaka u ujednačenu, homogenu smjesu. Miješanje se najčešće provodi u vertikalnim, horizontalnim ili kontinuiranim mješalicama. Vertikalne mješalice su se intenzivno koristile prije razvoja brzih mješalica, a karakterizira ih prijenosna posuda za miješanje s okruglim krajevima i ravnim dnom. Posuda je smještena ispod glave koja se spušta u korito i okreće. Prednost ovih mješalica je u tome što se mogu koristiti prilikom pripreme različitih vrsta proizvoda. Značajka horizontalnih mješalica je posjedovanje vodoravne posude postavljene na kruti okvir koji obuhvaća pogonski motor. Posuda može biti nepomična s okomitim prednjim dijelom koji klizi prema dolje da se tijesto može izbaciti. Češće, posuda za miješanje je dizajnirana za nagnjanje, a tijesto se izbacuje iz nagnutog položaja. Prednosti horizontalnih mješalica su velika brzina, mogućnost kontinuiranog snabdijevanja tijesta na liniju za obradu, ujednačenost mješavina koje se pripremaju i njihov potencijal za potpunu automatizaciju. Kontinuirane mješalice su male veličine u odnosu na horizontalne mješalice i pogodne su za potpunu automatizaciju. Usprkos toj prednosti, kontinuirane mješalice nisu uobičajene u pripremi keksa gdje se zahtjeva jedna linija za proizvodnju raznih proizvoda (npr. krekeri). Nakon miješanja, tijesto se stavlja u spremnik ispod kojeg leže valjci koji prije oblikovanja tijesto stanjuju do željene debljine. Proces oblikovanja tijesta specifičan je za svaku vrstu proizvoda, a za oblikovanje tijesta koriste se tri procesa: rezanje ravno oblikovanog tijesta, oblikovanje uz pomoć rotacijskog kalupa i istiskivanje tijesta kroz kalupe različitih oblika (Miller i Wrigley, 2004). Za svaki od tih procesa oblikovanja,



reologija tijesta je različita. Tijesta za keks koja za oblikovanje koriste kalupe su mekanije konzistencije, a tijesto se tijekom pečenja širi.

Pečenje kekasa odvija se u pećima različitih dimenzija. Novije peći se često sastoje od niza modularnih jedinica ili zona, a svaka zona je opremljena vlastitim kontrolnim setom za reguliranje temperature i protoka zraka (Manley, 2000). Ovisno o vrsti proizvoda, podloga za pečenje može biti otvorena žičana mreža ili ravna ploha. Izbor mreže je kritični faktor u procesu pečenja jer utječe na prijenos topline na dnu proizvoda što može imati značajan učinak na kvalitetu gotovog proizvoda. Postoje tri osnovne vrste pećnica: direktna, indirektna i potpuno indirektna pećnica. Pećnice se obično zagrijavaju izgaranjem plina, iako postoji nekoliko proizvođača koji zbog ekonomskih razloga koriste naftu ili električnu energiju. Najčešće se koriste direktne pećnice u kojima plin sagorijeva unutar pećnice. U tim pećnicama, plamenici su postavljeni po pećnici u određenim razmacima, ispod i iznad podloge za pečenje. Kod indirektnih pećnica, plin ili ulje sagorijeva izvan pećnice te cirkulira u i unutar pećnice. Te pećnice obično imaju po jedan plamenik za svaki odjeljak. Vrući plinovi iz plamenika prolaze duž cijevi paralelno s pećnicom te iznad i ispod podloge za pečenje. Potpuno indirektna pećnice su one u kojima je izvor topline dolazi preko izmjenjivača topline, neovisno o komori za pečenje i prijenosu topline. Ova vrsta pećnice nije uobičajena, osim kada se ulje koristi kao gorivo. Ukoliko se koristi ova vrsta pećnice, proizvodi ovog tipa sagorijevanja će dati neprihvatljiv okus proizvoda (Miller i Wrigley, 2004).

Nakon pečenja, a prije pakiranja proizvodi se moraju ohladiti. Hlađenje se provodi iz nekoliko razloga: topli proizvodi ne mogu zadržati čvrstoću tijekom procesa pakiranja, materijal za pakiranje može se smanjiti oko toplog proizvoda ili bi došlo do smanjenja kvalitete proizvoda budući da je brzina hlađenja kroz palete s proizvodima bila prilično spora. Proizvodi se hlade na prirodan način u tvorničkoj atmosferi. U pojedinim slučajevima potrebno je osigurati prisilni dotok zraka kao pomoć u procesu hlađenja (Miller i Wrigley, 2004).

### **2.3. UHPLC-ESI-MS/MS**

Povezani sustav (U)HPLC-MS/MS ((ultra)visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija - masena spektrometrija) koristi se za olakšano detektiranje kompleksnijih spojeva i uštedu vremena (Taleuzzaman i sur. 2015). LC-MS sustavi omogućuju analizu termički nestabilnih analita kao i analizu spojeva koji se ne mogu analizirati plinskom kromatografijom vezanom za spektrometar masa (Budimir, 2016). Kod LC-MS-a i UHPLC-MS/MS-a, uređaji i programi LC-a i MS-a su integrirani u jedan sustav koji daje visoku selektivnost i osjetljivost. U njemu su pikovi oštiri i niži je šum, pa je kvaliteta podataka poboljšana. Shodno tome, limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) su niži (Pratima i sur. 2013). Za potrebe analize različitih spojeva, postoje različite izvedbe LC kolona obzirom na njihova fizikalno-kemijska svojstva. LC-MS/MS uređaj je osjetljiv na onečišćenja, pa uspješnost analize ovisi i o prethodnoj pripremi uzoraka (Budimir, 2016).

### 2.3.1. UPHLC

UHPLC (ultra visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija) je separacijska tehnika nastala poboljšanjem HPLC-a, a karakteriziraju je poboljšana selektivnost, kraće vrijeme analiza, povećana osjetljivost zbog strmijih pikova, manja potrošnja otapala te niže cijene analize. Nedostaci ove tehnike su većinom vezani uz veličinu čestica. Naime, UHPLC koriste kraće kolone od HPLC-a koje su ispunjene česticama manjim od 4  $\mu\text{m}$  a iste moraju biti otporne za rad na visokim tlakovima (Pratima i sur. 2013). Viši tlak zahtjeva više održavanja, a vijek kolona je smanjen. Kolone u kojima je veličina čestica manja od 3  $\mu\text{m}$  imaju ograničeno korištenje pa je zahtjevnija priprema uzoraka. Ova tehnika se primjenjuje za analize prirodnih proizvoda i tradicionalnih biljnih lijekova, proučavanje ADME (adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija), bioanaliza, razumijevanja promjene spojeva kroz vrijeme pod različitim vanjskim utjecajima. Također se koristi kod proizvodnje, osiguranja i kontrole kvalitete, provjere čistoće, razvoja novih metoda, validaciju, sigurnost i učinkovitost što je posebno važno u farmaceutskoj industriji kod koje se zahtjeva čistoća sirovina i finalnog proizvoda (Pratima i sur. 2013).

Princip rada UHPLC-a je isti kao i kod HPLC-a, ali je izvedba donekle drugačija. Glavna razlika je veličina čestica stacionarne faze koje su manje od 3  $\mu\text{m}$  pa se zbog njih razvijaju veći tlakovi. Za smanjenje tlakova je potrebno povišati temperaturu što uzrokuje smanjenje viskoznosti mobilne faze te ubrzanje protoka iste.

Kod pripreme uzoraka može se koristiti prečišćavanje ili „razrijedi i mjeri“ („dilute and shoot“) tehnika. Kod prečišćavanja koriste se SPE kolone kojima je cilj ukloniti supstance iz matriksa uzorka koje mogu stupiti u interakciju s kolonom. Problem kod ove tehnike je što svaki korak prečišćavanja dovodi do novih izvora mjerne nesigurnosti i pogrešaka, a nije ga moguće koristiti ukoliko se mjere analiti s izrazito različitim svojstvima. S druge strane, kod tehnike „razrijedi i injektiraj“, uzorci se jednostavno razrijede i ubrizgaju u LC-MS/MS uređaj. Do problema dolazi ako je uzorak jako onečišćen, ili u vrlo niskim koncentracijama što može zaustaviti rad kolone i dovesti do smanjenja osjetljivosti (Varga, 2010).

### 2.3.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) je najraširenija analitička tehnika kojom se nabijeni atomi ili molekule (ioni) odvajaju na temelju njihovog omjera mase i naboja. Razdvojeni ioni se zatim prenose do detektora da bi izmjerili njihovu koncentraciju, a rezultati se prikazuju na grafikonu koji se naziva maseni spektar. Maseni spektrometar se sastoji od minimalno četiri osnovne komponente: izvora iona, analizatora masa, detektora i sustava za obradu podataka (Banerjee i Mazumdar, 2012).

U masenom spektrometru, analiti se prvo uparavaju i ioniziraju. Zatim se dobiveni ioni ubrzavaju prema analizatoru masa u kojem se na osnovu  $m/z$  omjera vrši njihovo razdvajanje pod utjecajem elektromagnetskog polja. Detektiraju se ioni koji napuste analizator masa, a dobivena informacija se snima (Varga, 2010). Kao potvrdu identifikacije analita koristi se omjer kvantifiera i kvalifiera. On uvijek mora biti konstantan,

uz dopušteno odstupanje do 30 % kod niskih koncentracija ispod ppb veličine. Kvantifier je ona tranzicija koja daje najbolji omjer signala i šuma te najveći odziv, a kvalifier je drugi fragment kojim se radi kvalitativna potvrda da je riječ o analitu koji tražimo (Gross, 2004). Bez obzira koji je analit u pitanju, ova tehnika 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 dodatno napraviti NMR (nuklearno magnetsku rezonancu). U ovoj spektroskopskoj metodi, izotopi pomažu u određivanju koji elementi doprinose takvoj formuli i procjeni broja atoma pojedinog elementa a fragmentacija iona može dati informacije o ionskoj strukturi. MS određuje (prosječni) broj i redoslijed sastavnih dijelova makromolekula (Gross, 2004).

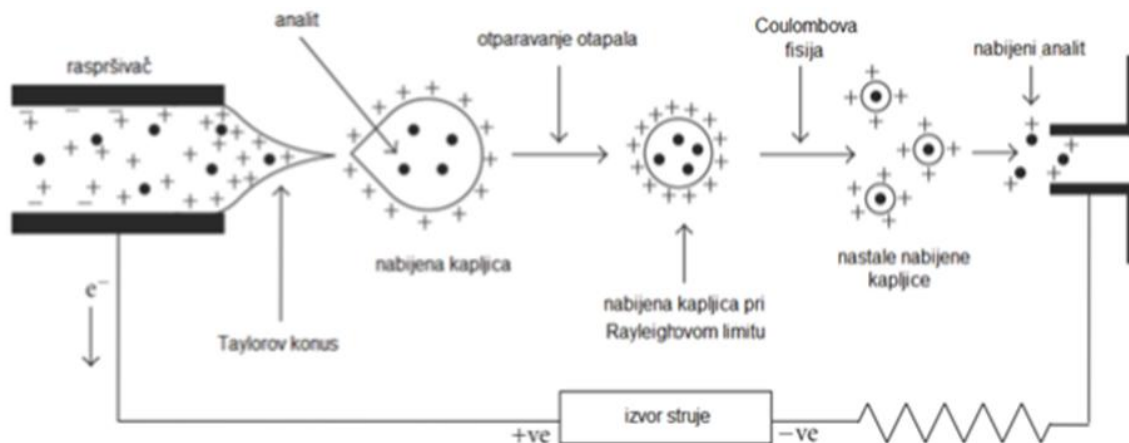
Tandemska masena spektrofotometrija (MS/MS) (**Slika 12**) kombinira dva koraka masenog razdvajanja s fragmentacijom molekula između ta dva koraka. Za bolju selektivnost i specifičnost analize najčešće se kombinira tekućinska kromatografija s MS/MS-om (Grec, 2014).



**Slika 12.** Shematski prikaz rada MS/MS sustava (prilagođeno iz Madeira i Florêncio, 2012)

### 2.3.3. ESI ionizacija

Najčešći oblik ionizacije molekula u vezanim LC-MS sustavima je ESI (engl. - *Electrospray ionization*, Ionizacija elektroraspršenjem). Pomoću ESI (**Slika 13**) ionizacije moguće je prevesti masivne, nehlapljive i termolabilne molekule u plinsku fazu kako bi se mogle analizirati u spektrometru masa. Stoga mu je glavna primjena u analizi bioloških molekula koje je teško prevesti u plinovito stanje i ionizirati. Ovisno o naponu na kapilari, elektrodi i o svojstvima molekule koju želimo ionizirati, ionizacija može biti pozitivna ili negativna. Optimalna temperatura ESI ionizacije pri atmosferskom tlaku i u struji inertnog plina (najčešće dušika ili argona) je iznad 100 °C (Budimir, 2016).



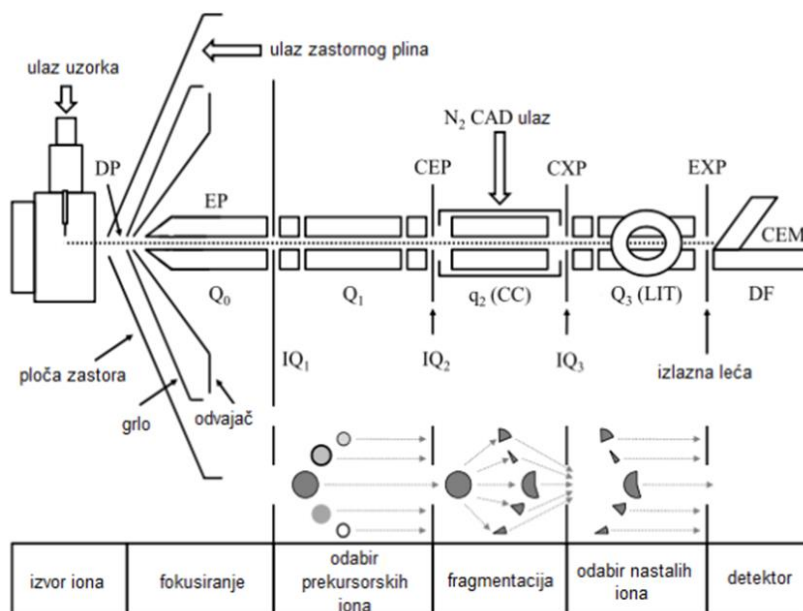
**Slika 13.** Princip rada ESI sustava (prilagođeno iz Banerjee i Mazumdar, 2012)

### 2.3.4. Princip rada trostrukog kvadrupola

Trostruki kvadrupoli (QqQ, engl. *Triple Quadrupole*) se najčešće koriste za kvantifikaciju analita. Mogu skenirati cijeli raspon mase (10 – 30000 Da) u desetinki sekunde. Svaki kvadrupol se sastoji od četiri cilindrične elektrode spojene u dva para diametralno jednako nabijenih elektroda. Suprotne elektrode su povezane i posjeduju isti potencijal, pa su dvije elektrode pozitivnog a dvije negativnog polariteta. Ion koji kroz otvor uđe u kvadrupol je privučen prema elektrodi suprotnog naboja te uslijed brzine izmjene naboja, spiralnom putanjom nastavlja do sljedeće elektrode sve do zadnjeg kvadrupola, odnosno dok ne stigne do detektora (**Slika 14**) (Varga, 2010; Šarkanj, 2014). Prvi kvadrupol (Q1) odabire prekursorske ione analita koji prolaze dalje, dok se ostali analiti u dodiru s elektrodama neutraliziraju pa ne prolaze do detektora. Drugi kvadrupol (Q2) djeluje kao kolizijska ćelija (CC) u kojoj se inertni plinovi (najčešće dušik ili argon) sudaraju s ionima propuštenim s prvog kvadrupola te nastaju njihovi fragmenti. Nakon što je došlo do fragmentacije iona u drugom kvadrupolu, uspostavlja se napon koji dalje pokreće ione na izlaznom dijelu kolizijske ćelije (CXP – eng. *Cell exit potential*). U trećem kvadrupolu, (Q3) se ioni dalje razdvajaju, ovisno o njihovom m/z omjeru (Varga, 2010). Postoje različite izvedbe trećeg kvadrupola.

Ukoliko MS/MS uređaj ima trostruke kvadrupole (QqQ), u njemu se odvajaju i usmjeravaju specifični fragmenti traženog analita te se oni propuštaju do detektora. Na detektoru se mogu pratiti najmanje dvije tranzicije po analitu (kvalitativna i kvantitativna potvrda analita, praćenje retencijskog vremena i specifičnog omjera signala za kvalitativnu i kvantitativnu potvrdu). Treći kvadrupol (Q3) može također biti i hvatač iona u koji se skupe svi fragmenti iz Q2 što daje bolju informaciju o analitu i lošiju osjetljivost u kvantificiranju. Također omogućava prepoznavanje nepoznatih analita, a u hvataču iona se dobije cijeli fragmentacijski spektar prekursorskih iona.

Prilikom prolaska iona kroz zadnji kvadrupol, ioni udaraju po površini kontinuiranog množitelja elektrona (CEM – eng. *Continuous Electron Multiplier*) pa prelaze preko deflektora (DF) do detektora. Detektor broji udarce po sekundi (cps – eng. *counts per second*) za određeni odnos  $m/z$  (Varga, 2010; Šarkanj, 2014).



**Slika 14.** Princip rada MS/MS uređaja (Varga, 2010; Šarkanj, 2014)

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Uzorkovanje

Istraživanje provedeno u sklopu ove doktorske disertacije obuhvatilo je sve proizvođače raži u RH, iz 10 hrvatskih županija. Od ukupno 20 uzoraka neobrađene raži, najveći broj uzoraka uzorkovan je u Splitsko-dalmatinskoj županiji (četiri uzorka) te Bjelovarsko-bilogorskoj i Varaždinskoj županiji (po tri uzorka). Slijede Osječko-baranjska, Zadarska i Zagrebačka županija (po dva uzorka), pa Ličko-senjska, Međimurska, Virovitičko-podravska i Grad Zagreb (po jedan uzorak) (**Slika 15**). Popis svih proizvođača raži u RH u 2016. godini zatraženi su od Agencije za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, a popis ekoloških proizvođača raži u RH u 2016. godini od Ministarstva poljoprivrede.

Prema podacima Ministarstva poljoprivrede, od ukupno 20 uzorka neobrađene raži, šest uzoraka je bilo iz ekološke (**Slika 16**), a 14 iz konvencionalne proizvodnje.

Nadalje, od Hrvatskog hidrometeorološkog zavoda zatraženi su podaci o vremenskim prilikama tijekom 2016. godine (srednja mjesečna temperatura i mjesečna količina oborina) po županijama / mjernim postajama.



**Slika 15.** Broj uzoraka neobrađene raži uzorkovanih iz pojedinih županija RH



**Slika 16.** Broj uzoraka ekološki proizvedene raži po županijama

Za utvrđivanje utjecaja načina proizvodnje na prisustvo EA u raži korišteni su rezultati HAH-ovog projekta o prisustvu EA u uzorcima neobrađene raži, žetve 2016. godine. Tijekom HAH-ovog projekta (*Istraživanje prisutnosti EA u hrani i hrani za životinje*; od 2014. do 2016. godine), uzorci raži su uzorkovani sukladno *Uredbi Komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani* te su nakon uzorkovanja vizualno analizirani na prisustvo ES. Uzorci raži u kojima je utvrđeno prisustvo ES homogenizirani su te je iz te mase odvagano 20 g za analizu na EA, a ostatak se koristio za daljnje istraživanje odnosno pripremu proizvoda od raži. Budući da je ES od *C. purpurea* poznata kao glavni uzročnik kontaminacije hrane s EA u Europi, samo uzorci u kojima je utvrđeno prisustvo ES su izdvojeni za daljnju pripremu proizvoda od raži (uzorci broj 3,4,7,9,10,12,13,14,16 i 20 u **Tablici 5**).

Zrna raži su samljevena na laboratorijskom mlinu IKA MF 10, nakon čega su se frakcije mekinja, krupice i brašna razdvojile pomoću vibrirajućih sita (Analysette, 3 PRO, Fritsch, Njemačka) promjera 1,60 mm, 800 µm i 250 µm, amplitude trešnje 3,0 mm u trajanju od 5 minuta (**Slika 17**).

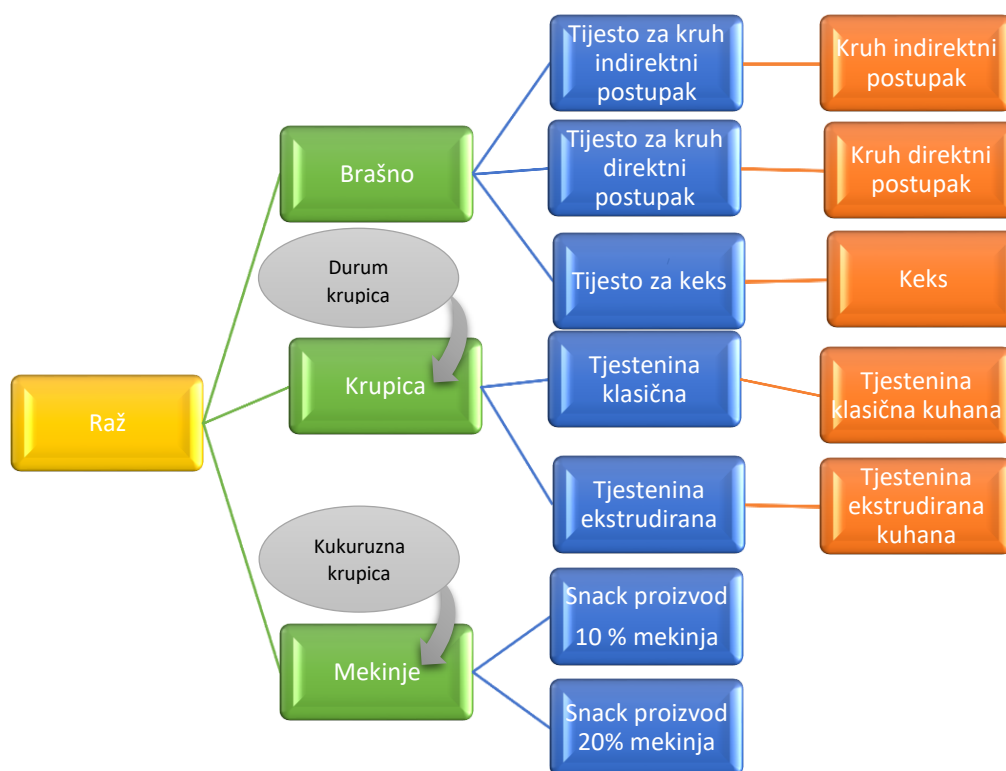
Mekinje, krupica i brašno dobiveni meljavom pojedinih uzorka raži koji su sadržavali ES su se dalje koristili kao sirovina za dobivanje proizvoda od raži: kruha, tjestenine, snack proizvoda (flips) i keksa (**Slika 18**). Za pripremu proizvoda od raži koristili su se različiti tehnološki postupci: fermentacija, ekstruzija, pečenje i kuhanje. Svi uzorci (uključujući



sirovine, poluproizvode i proizvode od raži) prikazani na **Slici 18**. na kraju su analizirani na prisustvo EA. Pod pojmom EA u ovom radu podrazumijevali su se svi najznačajniji EA i njihovi *-inin* epimeri koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem: ergometrin, ergometrinin, ergozin, ergozinin, ergokornin, ergokorninin, ergokriptin, ergokriptinin, ergotamin, ergotaminin, ergokristin i ergokristinin. Kemikalije korištene za analizu EA su bile HPLC ili MS čistoće: metanol (Merck, Njemačka), acetonitril (Merck, Njemačka), octena kiselina (Merck, Njemačka), amonij formijat (Merck, Njemačka) i standard EA (Mix 6, Biopure, Austria).



**Slika 17.** Laboratorijska tresilica s vibrirajućim sitima (Analysette 3 PRO, Fritsch, Njemačka)

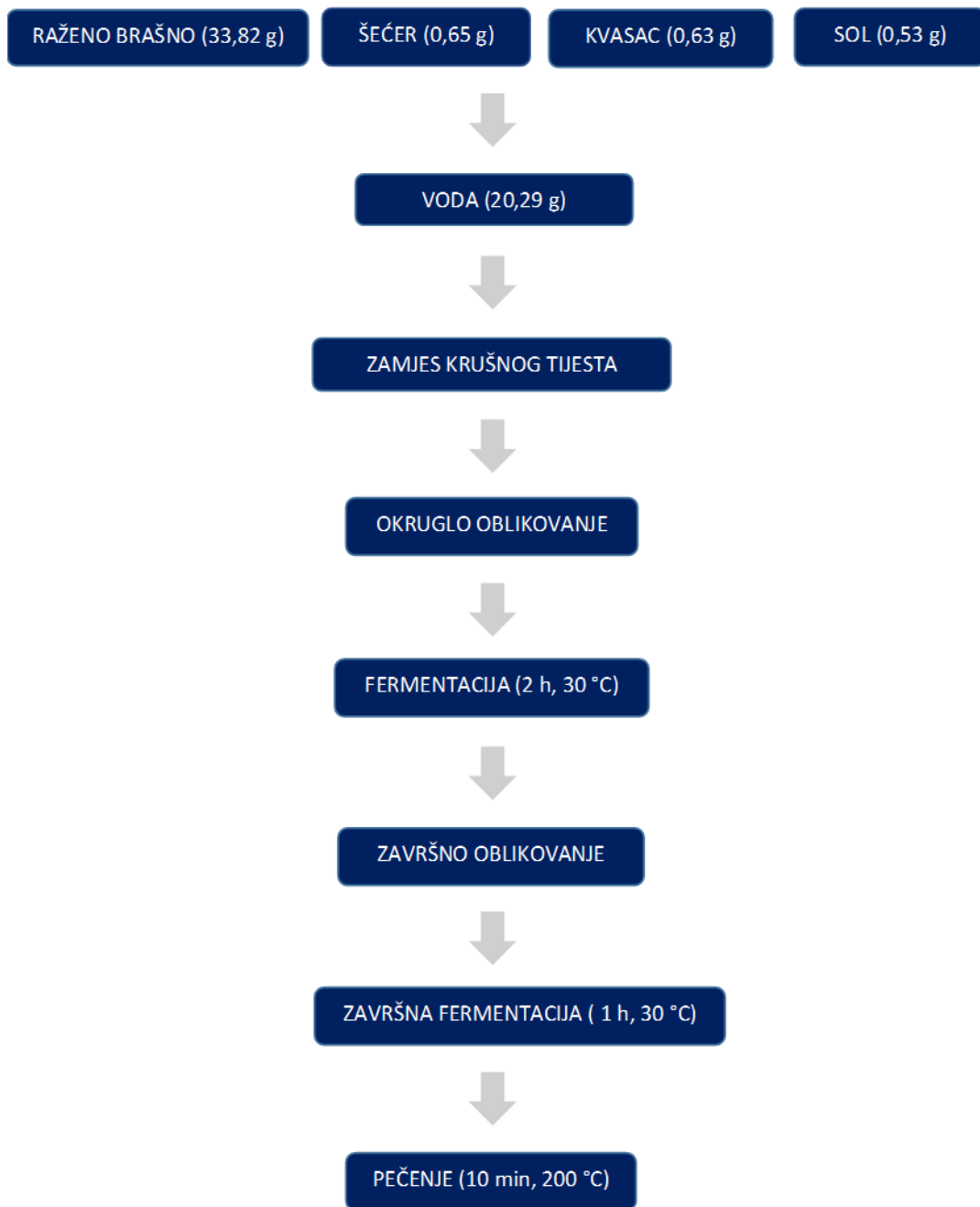


**Slika 18.** Shema pripreme proizvoda od neobrađene raži do finalnih proizvoda

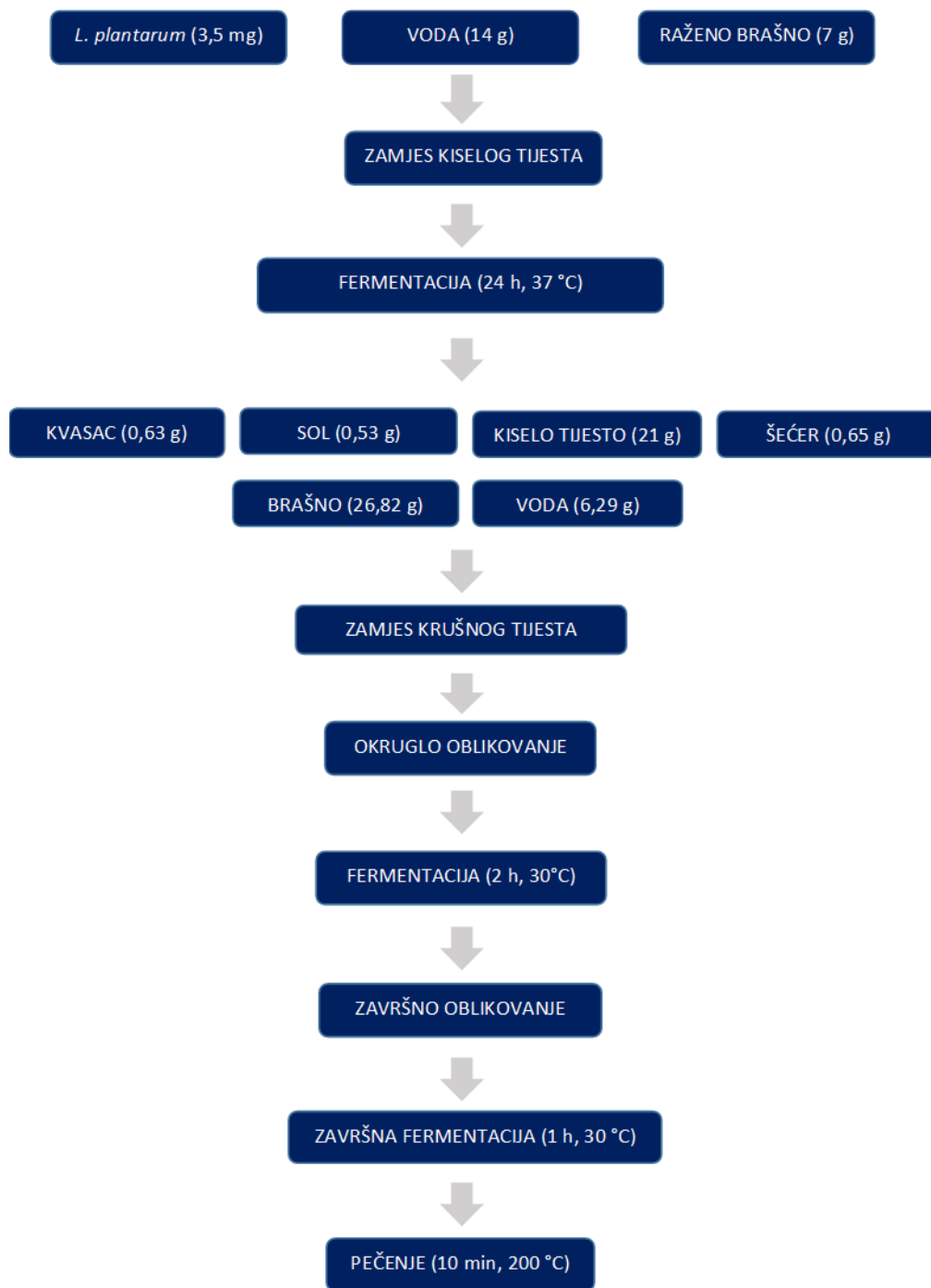
## 3.2. Priprema uzoraka

### 3.2.1. Proizvodnja kruha

Za izradu raženog tijesta i laboratorijsko pečenje kruha korištena je mikro metoda (Shogren i Finney, 1984). Sirovine korištene za proizvodnju tijesta prema direktnom postupku su raženo brašno, pekarski kvasac, kuhinjska sol, šećer i voda, a količina pojedinih sirovina i postupak proizvodnje prikazani su shematski (**Slika 19, Slika 20**). Za izradu kiselog tijesta korištena je starter kultura *Lactobacillus plantarum* trgovačkog naziva Flora-Pan L-75 (Lallemand, Francuska), raženo brašno i voda. Nakon izrade kiselog tijesta slijedi fermentacija u trajanju 24 sata, nakon čega se ono koristi kao jedna od komponenata za izradu krušnog tijesta kod indirektnog postupka. Kod direktnog postupka proizvodnje tijesta sve se sirovine predviđene za zamjes (brašno, kvasac, kuhinjska sol, šećer i voda) miješaju istovremeno. Za zamjes sirovina koristi se mješalica miksografa (National Mfg. Co., SAD) u trajanju od 3 minute. Tijesto se nakon miješanja ručno oblikuje te dijeli na 3 dijela, okruglo oblikuje i stavlja u plastičnu posudu. Slijedi fermentacija u trajanju od 2 sata pri 30 °C. Na završetku prve fermentacije, 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, tako da se dobiju veknice. Veknice se stave u kalup za pečenje pa na završnu fermentaciju u trajanju od jednog sata na 30 °C. Nakon fermentacije slijedi pečenje u pećnici (uz doziranje vodene pare) na 200 °C, 10 minuta. Uzorci su se ohladili, samljeli i čuvali na -20 °C do analize.



**Slika 19.** Shematski prikaz proizvodnje raženog kruha (direktni postupak)



**Slika 20.** Shematski prikaz proizvodnje raženog kruha (indirektni postupak)

### 3.2.2. Proizvodnja tjestenine

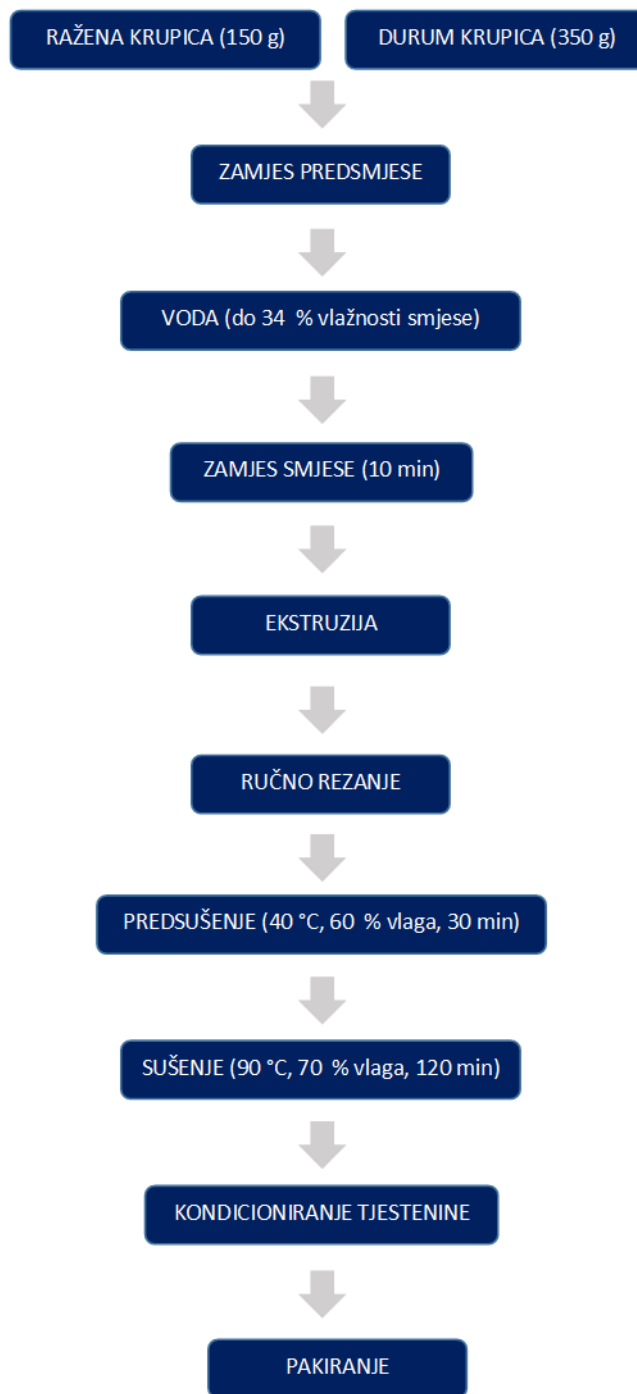
Sirovine korištene za proizvodnju tjestenine su durum krupica (Sgamaro, Italija) i ražena krupica dobivena meljavom raži uzorkovanom tijekom žetve 2016. godine. Prije proizvodnje tjestenine, durum krupica je analizirana na prisustvo EA, kako bi se uklonila mogućnost krive interpretacije rezultata. Rezultati analize durum krupice bili su ispod LOD za sve EA.

Za proizvodnju tjestenine izvagano je 150 g (30 %) ražene krupice i 350 g (70 %) durum krupice. Smjesa je zatim promiješana u laboratorijskom mikseru kako bi se postigla ravnomjerna raspodjela čestica ražene i durum krupice. Vlažnost smjese korigirana je na 34 % vlage pomoću špricaljke vodom temperature 40 °C, kako bi se ravnomjerno rasporedila po smjesi. Zamjes se tijekom dodavanja vode kontinuirano miješao u laboratorijskom mikseru, a nakon što je dodana sva količina vode, smjesa se miješala još 10 min (**Slika 21**). Smjese su zatim ostavljene 20 min u vrećicama sa zatvaračem, a nakon toga je za proizvodnju konvencionalne tjestenine smjesa ručno izvaljana i izrezana. Za proizvodnju ekstrudirane tjestenine, smjesa je stavljena u jednopusni laboratorijski ekstruder. U prvoj zoni ekstrudera temperaturni režim je iznosio 35 °C, a u drugoj zoni 40 °C uz hlađenje strujanjem vodovodne vode u trećoj zoni. Oblikovana tjestenina je nakon izlaska iz ekstrudera rezana ručno u obliku traka, slagana na perforirane metalne pladnjeve i stavljena u komoru za sušenje. Predsušenje je provedeno tijekom 30 min, pri 40 °C i 60 % vlažnosti zraka. Zatim je slijedilo glavno sušenje u trajanju od 120 min, pri 90 °C i 70 % vlažnosti zraka (**Slika 22**). Nakon sušenja, slijedilo je kondicioniranje tjestenine na sobnoj temperaturi i pakiranje u plastične vrećice sa zatvaračem u kojima se čuvala do analize.

Kako bi se utvrdio utjecaj kuhanja na retenciju EA, konvencionalna i ekstrudirana tjestenina se analizirala na prisustvo EA prije i poslije kuhanja. Kuhanje tjestenine provedeno je na način da se 100 g sušene tjestenine stavilo u 1 L proključale vode u koju je prethodno dodano 5 g NaCl-a. Završetak kuhanja tjestenine odredio se pritiskanjem komada tjestenine između dvije staklene ploče. Tjestenina se smatrala kuhanom kada je nestao tzv. „farinozni nukleus“ tj. brašnasti presjek. Nakon kuhanja, slijedi cijedenje i ispiranje sa tri obroka po 200 mL hladne vode. Nakon što se dobro ocijedila, tjestenina se suši pri istim uvjetima kao i prije kuhanja kako bi se mogla samljati i analizirati, bez korekcije zbog razlike u vlazi.



**Slika 21.** Shematski prikaz konvencionalne proizvodnje tjestenine



**Slika 22.** Shematski prikaz proizvodnje ekstrudirane tjestenine

### 3.2.3. Proizvodnja snack proizvoda

Za dobivanje snack proizvoda korištene su ražene mekinje (dobivene nakon mljevenja i razdvajanja u vibrirajućem situ otvora 1,60 mm) i kukuruzna krupica (**Slika 23**, **Slika 24**). Prije proizvodnje snack proizvoda kukuruzna krupica je analizirana na prisustvo EA, kako bi se uklonila mogućnost krive interpretacije rezultata. Rezultati analize kukuruzne krupice bili su ispod LOD za sve EA.

Za pripremu zamjesa za ekstruziju upotrebljavala se kukuruzna krupica kao osnovna sirovina i ražene mekinje u udjelima od 10 % i 20 % suhe tvari kao dodatak. Za homogenizaciju zamjesa koristio se laboratorijski mikser, pri čemu je dodatkom potrebne količine demineralizirane vode podešena vlažnost zamjesa na 15 %. Nakon podešavanja vlažnosti, uzorci su preko noći čuvani u rashladnom uređaju na 4 °C kako bi se vlaga ravnomjerno rasporedila u uzorcima.

Kako bi se zagrijali na sobnu temperaturu, zamjesi su prije ekstruzije izvađeni iz rashladnog uređaja. Ekstruzija zamjesa provedena je u jednopužnom laboratorijskom ekstruderu (19/20 DN, Brabender GmbH, Njemačka)(**Slika 25**), pri sljedećem režimu:

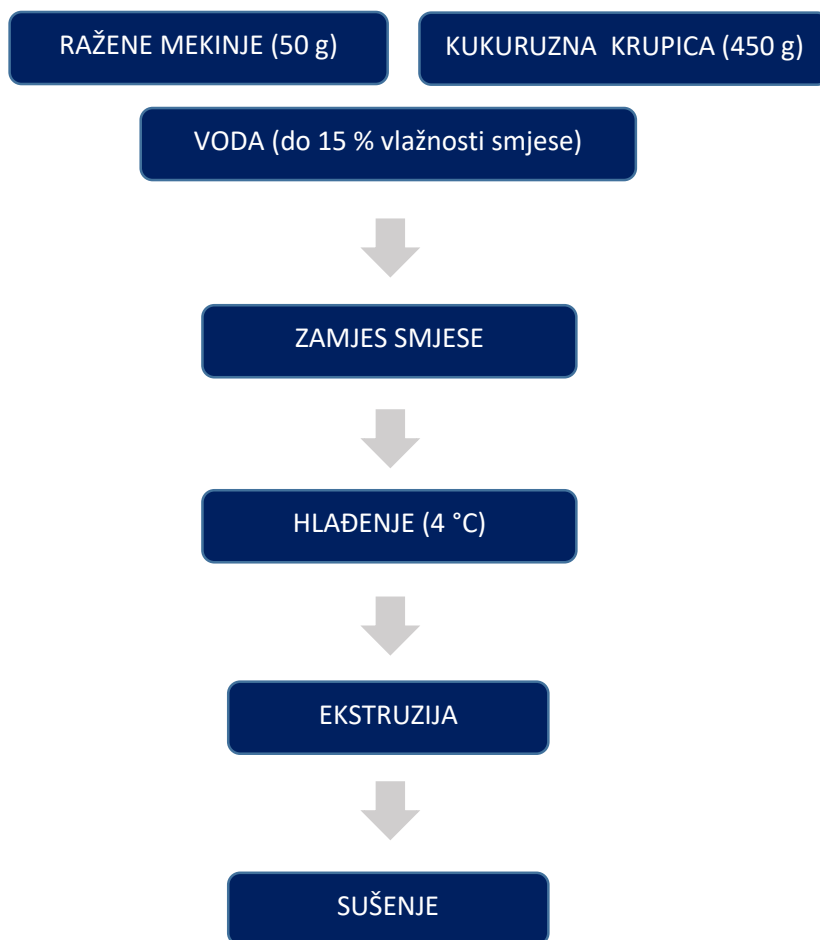
- konfiguracija puža: 4:1,
- promjer sapnice: 4 mm i
- temperaturni profil: 135/170/170 °C.



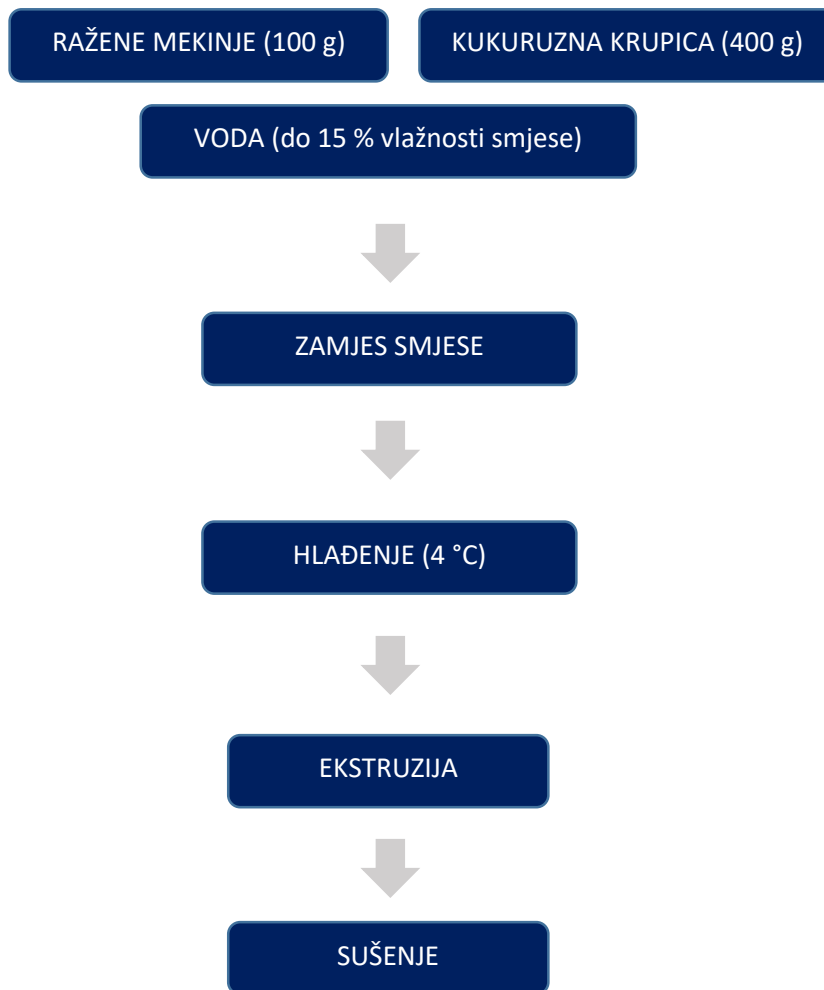
**Slika 25.** Laboratorijski jednopužni ekstruder Brabender 19/20 DN (Jozinović, 2015)

Dobiveni ekstrudati osušeni su preko noći na sobnoj temperaturi te su samljeveni na laboratorijskom mlinu IKA MF10 (Sigma-Aldrich, SAD) uz upotrebu sita otvora veličine 2 mm. Samljeveni uzorci zapakirani su u vrećice sa zatvaračem i čuvani u hladnjaku na 4 °C do provedbe analiza.





**Slika 23.** Shematski prikaz proizvodnje snack proizvoda s 10 % raženih mekinja



**Slika 24.** Shematski prikaz proizvodnje snack proizvoda s 20 % raženih mekinja

### 3.2.4. Proizvodnja keksa

Sirovine korištene za proizvodnju keksa su margarin, šećer, kuhinjska sol, soda bikarbona, otopina glukoze i raženo brašno. Nakon zamjesa, tijesto je okruglo oblikovano i stavljeno u PVC vrećicu te u hladnjak (do 8 °C) tijekom 30 - 60 minuta.

Tijesto je zatim razvaljano valjkom na debljinu 7 mm, izrezano na okrugle oblike promjera 60 mm (~35 g) i pečeno 10 minuta pri 205 °C (**Slika 26**). Pečeni keksi samljeveni su na laboratorijskom mlinu IKA MF10 (IKA, Njemačka) uz upotrebu sita otvora veličine 2 mm te su zapakirani u vrećice sa zatvaračem i čuvani u hladnjaku na 4 °C do provedbe analiza.



**Slika 26.** Shematski prikaz proizvodnje keksa

### 3.3. Analiza uzoraka i uvjeti rada LC-MS/MS-a

Za određivanje EA u mekinjama, krupici i brašnu te proizvodima pripremljenim od ovih sirovina korištena je „razrijedi i mjeri“ LC-MS/MS metoda koja je provedena prema uvjetima opisanim u radovima više autora (Malachová i sur. 2014; Sulyok i sur. 2020). Svi suhi uzorci usitnjeni su prije analize na mlinu RAS Mill (Romer Labs, Austrija). Od usitnjenog uzorka redukcijom na Retsch RT 12.5 razdvajaču uzoraka odvojen je laboratorijski poduzorak od 5 grama i ekstrahiran s 20 mL ekstrakcijskog otapala (acetonitril/voda/octena kiselina 79:20:1, v/v/v) u plastičnim epruvetama od 50 mL (Falcon). Ekstrakcija je provedena na orbitalnoj tresilici 3017 (GFL), tijekom 90 min, pri 180 okretaja u minuti uz sobnu temperaturu. Nakon ekstrakcije, 500 µL uzorka razrijeđeno je s 500 µL otopine za razrjeđivanje (acetonitril/voda/octena kiselina 20:79:1, v/v/v) u vialama za LC-MS/MS, koje su zatim dobro izmiješane na vorteks mješalici.

Detekcija i kvantifikacija EA provedena je na uređaju Qtrap 5500 MS/MS sustav (SCIEX, USA), opremljenim s TurboV elektrosprej ionizacijskim (ESI) izvorom i UHPLC sustavom serije 1290 (Agilent Technologies, Njemačka). ESI-MS/MS detekcija provedena je u SRM (selective reaction monitoring) modu uz dvije tranzicije svakog analita. SRM mjerenje tranzicije svakog analita postavljeno je na odgovarajuće vrijeme retencije tijekom  $\pm 27$  i  $\pm 42$  sekunde u pozitivnom i negativnom modu. Postavke ESI izvora bile su slijedeće: temperatura izvora 550 °C, zastorni plin 30 psi (206,8 kPa s maksimalno 99,5 % dušika), plin s izvora iona 1 (nosilac) 80 psi (551,6 kPa dušika), plin s izvora iona 2 (plin za sušenje) 80 psi (551,6 kPa dušika), napon ionskog raspršivanja -4500 V i +5500 V, kao kolizijski plin koristio se dušik. Optimizacija analitički ovisnih MS/MS parametara izvedena je izravnim injektiranjem standarda (razrijeđenog u smjesi eluenta A i B u omjeru 1:1) u MS izvor pomoću injektora šprice pri brzini protoka od 10 µL/min. Kromatografsko razdvajanje je provedeno na reverzno-faznoj koloni Gemini® C18 (150 x 4,6 mm, Phenomenex) s veličinom čestica od 4,6 µm i pripadajućom predkolonom pri 25 °C. Za kvalitativnu analizu podataka korišten je softver Analyst version 1.6.3, a za kvantitativnu obradu MultiQuant 3.0.2. softver. Limiti detekcije (*LOD*) i limiti kvantifikacije (*LOQ*) ove analitičke metode za pojedine EA prikazani su u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Vrijednosti LOD i LOQ metode za određivanje EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži

<b>Ergot alkaloidi</b>	<b>LOD</b> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	<b>LOQ</b> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<b>Ergokornin</b>	0,08	0,26
<b>Ergokorninin</b>	0,02	0,07
<b>Ergokristin</b>	0,15	0,50
<b>Ergokristinin</b>	0,02	0,07
<b>Ergokriptin</b>	0,08	0,26
<b>Ergokriptinin</b>	0,05	0,17
<b>Ergometrin</b>	0,15	0,50
<b>Ergometrinin</b>	0,01	0,03
<b>Ergozin</b>	0,10	0,03
<b>Ergozinin</b>	0,03	0,10
<b>Ergotamin</b>	0,08	0,26
<b>Ergotaminin</b>	0,02	0,07

### 3.4. Statistička obrada podataka

Svi podaci statistički su obrađeni u programu *Statistica* 13.1 i to na način da su sve vrijednosti ispod limita detekcije računane kao pola limita detekcije, a sve vrijednosti ispod limita kvantifikacije, kao pola limita kvantifikacije. Osnovna statistička obrada uključivala je srednju vrijednost, medijan, standardnu devijaciju i interkvartilni raspon. Ispitivanje normalnosti distribucije podataka provedeno je pomoću Shapiro Wilksovog W testa, a ispitivanje homogenosti varijance pomoću Levenovog testa. Zbog malog broja ponavljanja kod svih mjerenja potvrđena je nenormalna distribucija podataka te su zbog toga u daljnjim usporedbama primijenjeni neparametrijski testovi. Mann-Whitney U test korišten je kod usporedbe dviju varijabli, dok je za usporedbu razlika u distribuciji podataka više varijabli korištena Kruskal-Wallis ANOVA. Svi rezultati koji su usporednim testovima imali p vrijednost manju od 0,05 smatrani su statistički značajno različitim. Grafički prikazi podataka pripremljeni su u programskom paketu *Excel* 2016.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Pojavnost EA u raži ovisno o načinu proizvodnje raži

Od ukupno 12 EA (najznačajniji EA i njihovi epimeri) koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem, u dva uzorka iz ekološke proizvodnje (iz Osječko-baranjske i Karlovačke županije) i četiri uzorka iz konvencionalne proizvodnje (po jedan uzorak iz Osječko-baranjske i Zadarske županije i dva uzorka iz Zagrebačke županije) nije detektiran niti jedan EA (**Tablica 5**).

Nasuprot tome, svih 12 EA kvantificirani su u jednom ekološki proizvedenom uzorku (iz Bjelovarsko-bilogorske županije) i pet konvencionalno proizvedenih uzoraka raži (po jedan uzorak iz Bjelovarsko-bilogorske, Međimurske i Varaždinske županije te dva uzorka iz Splitsko-dalmatinske županije)(**Tablica 5**). Primjer kromatograma uzorka neobrađene raži kontaminiranog EA prikazan je na **Slici 27**.

Uspoređujući koncentracije ukupnih EA po županijama, najviše ukupnih EA izmjereno je u Bjelovarsko-bilogorskoj i Splitsko-dalmatinskoj županiji. Slijede Međimurska i Varaždinska županija, pa Ličko-senjska, Virovitičko-podravska i Zadarska županija te Grad Zagreb. U Osječko-baranjskoj i Zagrebačkoj županiji nije utvrđena prisutnost niti jednog EA (**Tablica 5**).

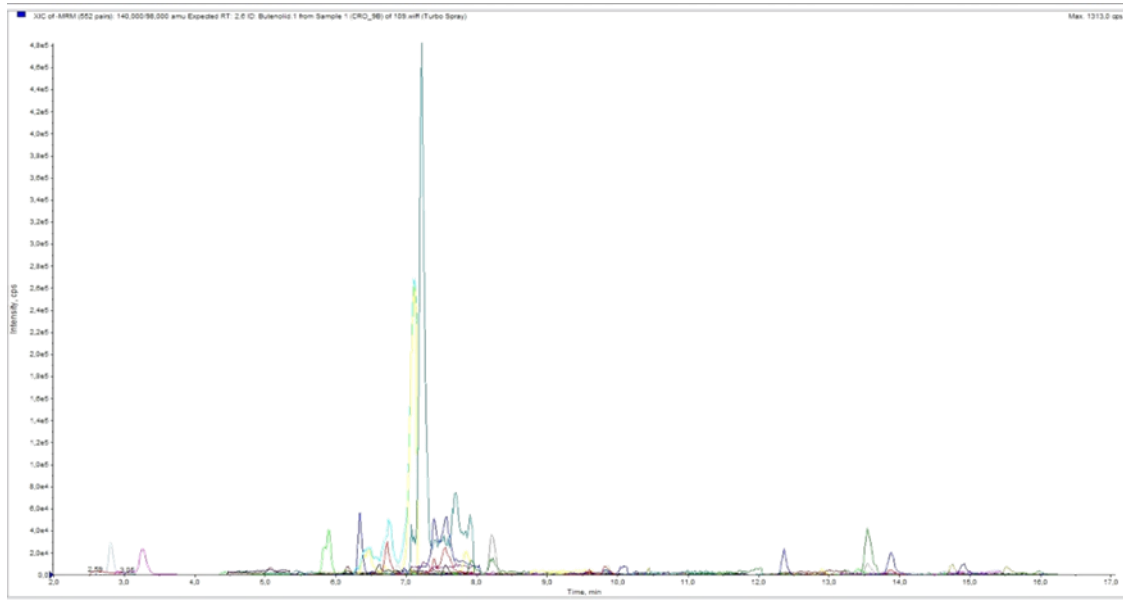
**Tablica 5.** Koncentracije pojedinih EA i njihovih epimera ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima neobrađene raži, po županijama

Broj uzorka	Županija	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokristin	Ergokristinin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergotamin	Ergotaminin
1.	Bjelovarsko-bilogorska	16	5	130	46	59	11	217	9	145	50	33	12
2.	Bjelovarsko-bilogorska*	48	12	23	4	66	35	58	5	57	18	3	<LOQ
3.	Bjelovarsko-bilogorska*	30	3	56	18	26	2	43	2	73	23	23	5
4.	Grad Zagreb	<LOQ	<LOQ	9	2	<LOQ	<LOQ	11	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5.	Ličko-senjska	10	2	37	9	1	<LOQ	9	<LOQ	110	34	4	1
6.	Međimurska	34	9	35	17	28	22	116	6	72	26	61	7
7.	Osječko-baranjska	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
8.	Osječko-baranjska*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
9.	Karlovačka*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
10.	Splitsko-dalmatinska	50	13	62	46	66	55	221	28	96	50	65	10
11.	Splitsko-dalmatinska	86	27	27	5	38	11	84	3	33	18	12	1
12.	Splitsko-dalmatinska*	20	8	<LOQ	<LOQ	68	55	23	1	38	16	<LOQ	<LOQ
13.	Varaždinska	<LOQ	<LOQ	52	6	2	<LOQ	18	<LOQ	28	8	11	1
14.	Varaždinska	20	6	22	12	20	4	85	7	46	15	13	3
15.	Varaždinska	14	3	13	2	7	<LOQ	7	<LOQ	24	7	<LOQ	<LOQ
16.	Virovitičko-podravska*	<LOQ	<LOQ	53	6	<LOQ	<LOQ	43	<LOQ	47	11	9	2
17.	Zadarska	9	3	26	4	11	2	47	2	26	8	<LOQ	<LOQ
18.	Zadarska	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
19.	Zagrebačka	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
20.	Zagrebačka	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

< LOQ ( $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

\*ekološki proizvedena raž





**Slika 27.** Primjer kromatograma uzorka neobrađene raži kontaminiranog EA

Uspoređujući prisustvo pojedinih EA u uzorcima raži iz konvencionalne i ekološke proizvodnje može se zaključiti da od šest uzoraka ekološki proizvedene raži, u dva uzorka nije detektiran niti jedan EA, te da su u jednom uzorku detektirani svi EA. Od ukupno 12 EA, u jednom uzorku ekološki proizvedene raži detektirano je 11 EA (svi EA izuzev ergotaminina). Također, od ukupno 12 EA, u jednom uzorku detektirano je sedam EA, a u jednom uzorku osam EA.

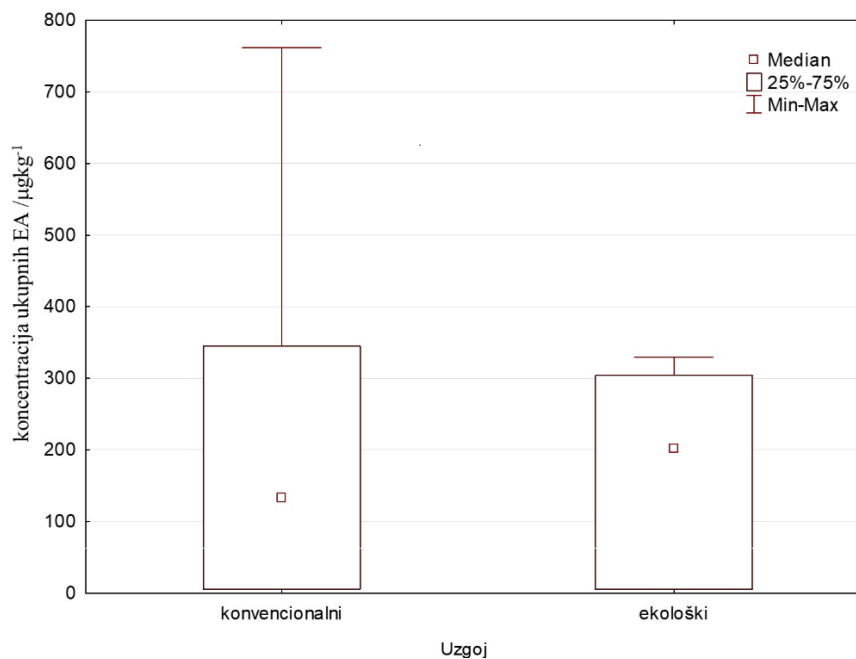
Nasuprot tome, od 14 konvencionalno proizvedenih uzoraka raži, u četiri uzorka nije detektirano prisustvo niti jednog EA, a u pet uzoraka bili su prisutni svi EA (**Tablica 5**).

Statističkom usporedbom ukupnih EA iz konvencionalne i ekološke proizvodnje može se zaključiti da je medijan viši kod ekološki proizvedene raži, a srednja vrijednost ukupnih EA kod konvencionalno proizvedene raži te da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji rezultata između ova dva načina proizvodnje za sumu svih EA (**Tablica 6**, **Slika 28**). Raspon koncentracija ukupnih EA (25 % - 75 %) je kod konvencionalno proizvedene raži znatno veći u odnosu na ekološki proizvedenu raž (**Slika 28**).

**Tablica 6.** Deskriptivna statistika usporedbe ukupnih EA iz konvencionalne i ekološke proizvodnje raži

Način proizvodnje raži	Broj uzoraka	Srednja vrijednost ukupnih EA $\pm$ SD*	Medijan ukupnih EA	Maksimalna koncentracija EA	Interkvartilni raspon
		$(\mu\text{g kg}^{-1})$			
Konvencionalna	14	224,3 $\pm$ 259,3	133,50	762,0	339,0
Ekološka	6	175,0 $\pm$ 142,0	202,25	329,5	298,0
<b>Ukupno</b>	20	209,5 $\pm$ 227,7	156,25	762,0	310,7

\*standardna devijacija



**Slika 28.** Statistička analiza ukupnih EA u konvencionalno i ekološki proizvedenoj raži

## 4.2. Vremenske prilike tijekom proizvodnje raži

Uspoređujući prisustvo EA obzirom na vremenske prilike tijekom proizvodnje raži, može se utvrditi da u šest uzoraka neobrađene raži u kojima nije utvrđeno prisustvo niti jednog EA iznad LOQ-a, nisu utvrđene značajne razlike u srednjim mjesečnim temperaturama i količinama oborina u odnosu na vremenske prilike kod ostalih uzoraka kod kojih je utvrđeno prisustvo EA (**Tablica 7**).

U županijama u kojima je uzorkovano po tri uzorka iz iste županije (Bjelovarsko-bilogorska, Splitsko-dalmatinska i Varaždinska županija), od kojih su dva uzorka bila s iste mjerne postaje (kod Bjelovarsko-bilogorske i Splitsko-dalmatinske županije), koncentracija ukupnih EA bila je u približno ista (kod uzoraka iz Bjelovarsko-bilogorske županije). Međutim, kod uzoraka s iste mjerne postaje iz Splitsko-dalmatinske županije koncentracije ukupnih EA su se znatno razlikovale ( $762 \mu\text{g kg}^{-1}$  tj.  $345 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Slični rezultati utvrđeni su i kod uzoraka iz Zadarske i Zagrebačke županije u kojima je uzorkovano po dva uzorka iz iste županije te su oba bila s istih mjernih postaja. Naime, u oba uzorka s iste mjerne postaje iz Zagrebačke županije nije utvrđeno prisustvo niti jednog EA, dok je u Zadarskoj županiji utvrđeno prisustvo EA u jednom uzorku raži ( $138 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), dok u drugom uzorku nije utvrđeno prisustvo niti jednog EA (**Tablica 7**).

**Tablica 7.** Koncentracije ukupnih EA i vremenske prilike po županijama/mjernim postajama za travanj, svibanj, lipanj i srpanj 2016. godine

Broj uzorka	Županija / Mjerna postaja	Ukupni EA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Travanj		Svibanj		Lipanj		Srpanj	
			Srednja mjesečna temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Mjesečna količina oborina (mm)	Srednja mjesečna temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Mjesečna količina oborina (mm)	Srednja mjesečna temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Mjesečna količina oborina (mm)	Srednja mjesečna temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Mjesečna količina oborina (mm)
1.	Bjelovarsko-bilogorska / Bjelovar	733,0	13,0	43,2	16,2	85,2	21,3	78,4	20,5	57,4
2.	Bjelovarsko-bilogorska* / Daruvar	329,0	12,3	35,3	15,5	83,7	20,4	99,6	19,4	152,6
3.	Bjelovarsko-bilogorska* / Daruvar	304,0	12,3	35,3	15,5	83,7	20,4	99,6	19,4	152,6
4.	Grad Zagreb / Zagreb	22,0	12,3	49,5	15,3	94,7	19,8	130,5	19,4	46,8
5.	Ličko-senjska / Gospić	217,0	10,7	73,1	13,2	202,7	18,2	126,2	18,6	23,9
6.	Međimurska / Čakovec	433,0	12,1	32,1	15,4	96,0	19,9	116,1	19,3	33,4
7.	Osječko-baranjska / Osijek	<LOQ	13,1	39,8	16,5	63,1	21,0	99,5	20,6	110,8
8.	Osječko-baranjska* / Valpovo	<LOQ	12,8	27,2	15,9	55,4	20,9	58,2	20,0	235,0
9.	Karlovačka* / Slunj	<LOQ	12,2	65,5	15,1	161,8	20,0	156,0	19,4	37,7
10.	Splitsko-dalmatinska / Sinj	762,0	13,1	29,5	15,0	120,0	20,1	77,3	21,9	14,0
11.	Splitsko-dalmatinska / Sinj	345,0	13,1	29,5	15,0	120,0	20,1	77,3	21,9	14,0
12.	Splitsko-dalmatinska* / Split	229,0	16,5	23,2	18,7	71,1	24,2	32,5	25,7	5,0
13.	Varaždinska / Bednja	126,0	11,3	40,0	14,3	132,3	18,9	138,7	18,6	64,7
14.	Varaždinska / Varaždin	253,0	12,3	46,1	15,3	101,3	19,8	106,9	19,4	48,9
15.	Varaždinska / Novi Marof	77,0	15,8	28,7	20,4	120,1	22,8	129,8	20,5	37,8
16.	Virovitičko-podravska* / Slatina	171,0	12,3	29,4	15,7	69,7	20,7	114,3	19,5	143,7
17.	Zadarska / Benkovac	138,0	13,8	53,4	16,1	93,2	20,8	141,3	23,4	1,2
18.	Zadarska / Benkovac	<LOQ	13,8	53,4	16,1	93,2	20,8	141,3	23,4	1,2
19.	Zagrebačka / Samobor	<LOQ	12,4	46,2	15,5	135,8	20,2	154,7	20,0	64,1
20.	Zagrebačka / Samobor	<LOQ	12,4	46,2	16,2	132,3	20,2	154,7	20,0	64,1

<LOQ ( $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ )

\*ekološki proizvedena raž

### 4.3. Utjecaj tehnoloških postupaka na prisustvo ergot alkaloida

#### 4.3.1. Mljevenje

Deset uzoraka raži u kojima je utvrđeno prisustvo ES je samljeveno, a dobivene frakcije (brašno, raž i mekinje) koristile su se kao sirovine za daljnju pripremu proizvoda od raži. Izmjerene koncentracije pojedinih EA u frakcijama mljevenja raži prikazane su u **Tablicama 8, 9 i 10**, dok je suma svih EA i njihov omjer između frakcija prikazan na **Slici 28**. Rezultati analiza frakcija utvrdili su prisustvo bar jednog EA u svim uzorcima raženog brašna i krupice, dok u jednom uzorku raženih mekinja nije utvrđeno prisustvo niti jednog EA. Također, u pet uzoraka brašna, šest uzorka krupice i tri uzorka mekinja utvrđeno je prisustvo svih EA koji su bili obuhvaćeni ovim istraživanjem.

**Tablica 8.** Koncentracija EA u raženom brašnu /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka brašna	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	10,0	22,1	<LOD	22,8	<LOD	5,4	23,8	13,7	16,5
Ergokorninin	0,5	4,6	9,0	<LOD	8,9	<LOD	2,2	7,8	4,2	6,1
Ergokristin	41,3	35,5	112,7	<LOQ	332,2	8,3	41,6	133,1	<LOD	107,8
Ergokristinin	17,9	13,2	43,6	1,5	125,2	3,5	14,8	47,2	<LOD	40,1
Ergokriptin	33,8	22,1	34,0	<LOD	103,7	<LOD	19,3	73,9	17,4	16,6
Ergokriptinin	21,9	1,5	4,1	<LOD	6,1	<LOD	<LOQ	6,4	<LOQ	2,7
Ergometrin	<LOQ	42,8	94,2	<LOD	973,4	21,6	94,5	117,2	9,8	24,6
Ergometrinin	0,2	6,3	16,7	<LOD	49,8	1,9	13,4	25,4	1,4	5,7
Ergozin	65,4	42,5	118,7	<LOD	225,1	5,1	42,6	128,0	25,7	83,6
Ergozinin	45,1	20,5	58,4	<LOQ	228,7	3,2	20,8	67,8	11,2	44,6
Ergotamin	18,7	9,9	36,4	<LOD	108,5	2,5	12,5	48,9	<LOD	25,5
Ergotaminin	6,5	4,3	13,9	<LOD	37,3	1,1	4,6	17,0	<LOD	10,8

**Tablica 9.** Koncentracija EA u raženoj krupici /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

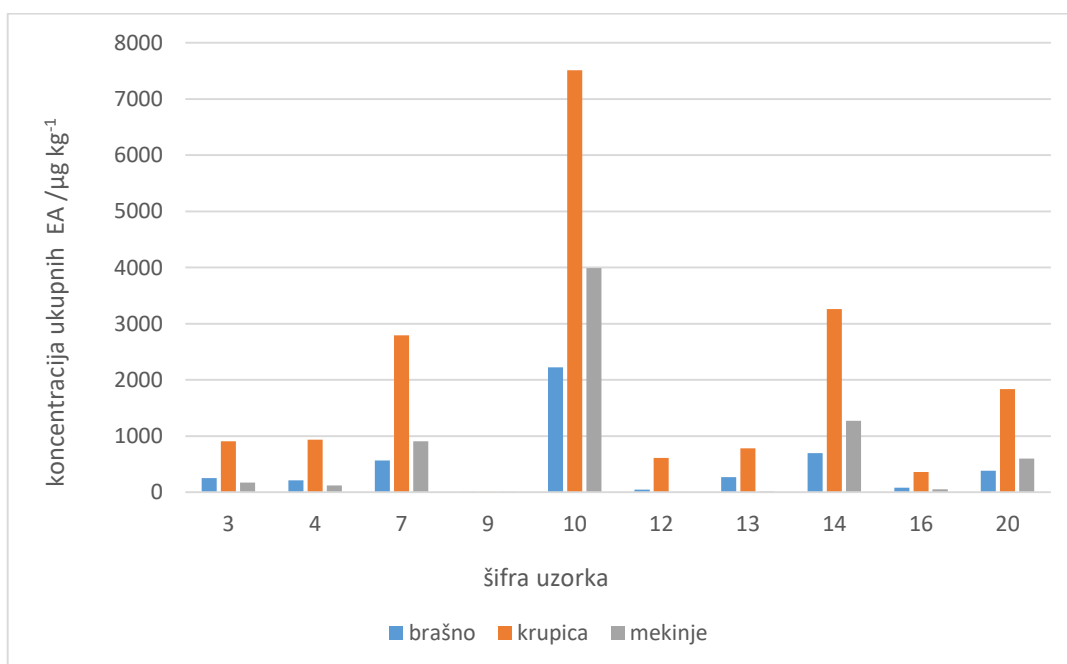
Šifra uzorka krupice	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	70,0	57,4	<LOD	93,3	<LOD	11,6	86,9	16,8	107,7
Ergokorninin	<LOQ	34,3	27,2	<LOD	41,8	<LOD	5,5	40,2	6,8	44,1
Ergokristin	131,2	50,6	515,9	<LOD	893,3	108,1	124,0	502,8	<LOD	365,4
Ergokristinin	64,9	25,8	261,6	1,9	403,6	53,1	60,8	268,4	0,6	189,1
Ergokriptin	39,9	210,4	146,8	<LOD	428,5	<LOQ	40,6	252,7	53,2	94,8
Ergokriptinin	26,4	10,3	117,6	<LOD	46,5	1,317	3,0	22,2	<LOD	18,4
Ergometrin	<LOQ	172,2	548,8	<LOD	2981,5	72,9	226,1	522,8	62,0	84,4
Ergometrinin	0,6	19,4	72,1	<LOD	121,1	11,7	39,8	104,8	9,5	20,4
Ergozin	172,7	174,7	512,0	<LOD	816,8	197,7	123,8	688,9	121,4	479,5
Ergozinin	147,3	148,6	298,1	<LOQ	1197,9	114,8	87,6	521,9	91,1	288,3
Ergotamin	232,8	13,1	156,9	<LOD	332,0	34,9	39,3	162,6	<LOD	102,6
Ergotaminin	92,1	7,7	78,3	<LOD	156,0	17,4	18,5	84,9	<LOD	44,4

**Tablica 10.** Koncentracija EA u raženim mekinjama /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

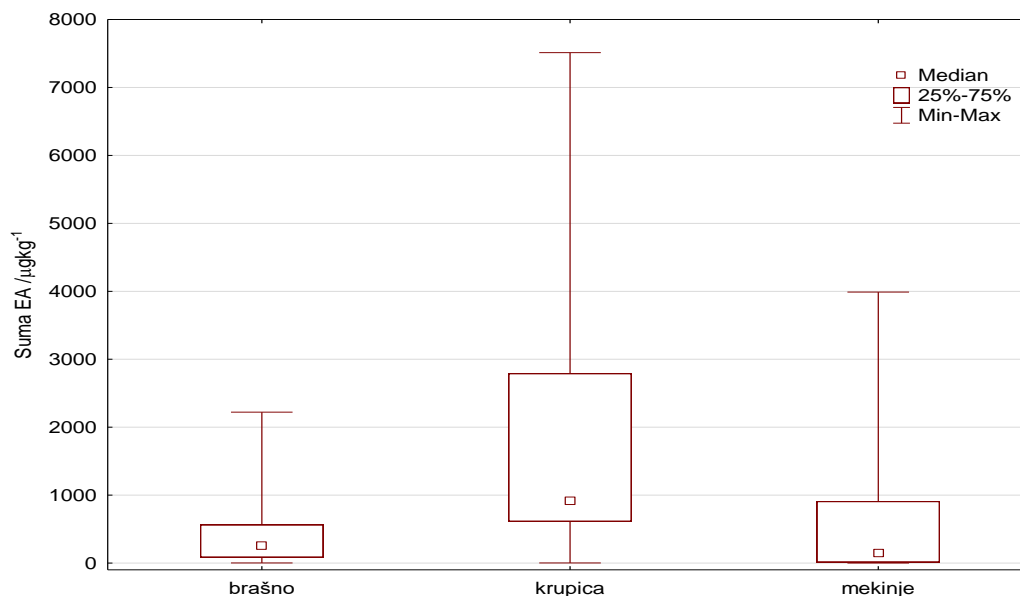
Šifra uzorka mekinja	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	2,5	4,7	<LOD	20,1	<LOD	<LOD	72,5	2,0	3,4
Ergokorninin	<LOD	1,9	2,5	<LOD	13,2	<LOD	<LOD	33,3	0,9	2,8
Ergokristin	32,8	15,7	164,8	<LOD	345,1	<LOD	<LOD	177,7	<LOD	112,5
Ergokristinin	22,3	11,3	108,9	<LOQ	225,9	<LOQ	<LOQ	107,0	<LOD	62,6
Ergokriptin	<LOQ	22,7	5,9	<LOD	190,7	<LOD	<LOD	187,1	10,8	7,3
Ergokriptinin	<LOQ	<LOD	1,8	<LOD	38,8	<LOD	<LOD	118,0	2,7	<LOQ
Ergometrin	<LOD	21,7	319,2	<LOD	1920,2	4,5	11,5	127,8	31,9	69,8
Ergometrinin	<LOD	2,1	38,9	<LOD	101,8	<LOQ	1,3	26,8	1,6	15,9
Ergozin	65,4	17,2	110,9	<LOD	451,4	<LOD	<LOD	165,3	<LOQ	142,3
Ergozinin	53,8	19,8	84,4	<LOD	559,4	<LOQ	<LOD	147,9	1,6	119,5
Ergotamin	<LOD	6,7	43,5	<LOD	77,2	<LOD	<LOD	74,2	<LOD	39,8
Ergotaminin	<LOQ	2,7	25,2	<LOD	44,9	<LOD	<LOD	37,5	<LOD	22,5

Usporedbom ukupnih EA u frakcijama mljevenja raži, najviše koncentracije EA izmjerene su u krupici, a najniže u brašnu. Također, najveća koncentracija ukupnih EA izmjerena je u uzorku 10, a najmanja u uzorku 9 (**Slika 29**).

Statističkom usporedbom ukupnih EA u brašnu, mekinjama i krupici utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između ukupnih EA u frakcijama mljevenja raži. Najveća vrijednost medijana i najveći raspon koncentracija ukupnih EA (25 % - 75 %) utvrđeni su kod krupice. Najniža vrijednost medijana utvrđena je kod mekinja, dok je kod brašna utvrđen najmanji raspon koncentracija ukupnih EA (25 % - 75 %)(**Slika 30**).



**Slika 29.** Koncentracija ukupnih EA u frakcijama mljevenja raži ispitivanih uzoraka



**Slika 30.** Statistička analiza ukupnih EA u brašnu, mekinjama i krupici

#### 4.3.2. Fermentacija

Koncentracije pojedinih EA u tijestima za kruhove od raženog brašna koji su proizvedeni direktnim i indirektnim postupcima prikazane su u **Tablicama 11 i 12**. U obje vrste tijesta za kruhove utvrđeno je odsustvo svih EA u jednom uzorku tijesta, dok su svi EA detektirani u četiri tijesta za kruhove proizvedene direktnim postupkom i tri tijesta za kruhove proizvedene indirektnim postupkom zamjesa. U tijestu za kruh u kojem je utvrđeno odsustvo svih EA, prethodno je u sirovini (raženom brašnu) od istog uzorka detektiran jedino ergokristinin u vrlo niskoj koncentraciji (**Tablica 8**), te je tijekom fermentacije došlo do smanjenja koncentracije ovog EA ispod granice detekcije ( $0,02 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

**Tablica 11.** Koncentracija EA u tijestu za kruh od raženog brašna proizvedenom direktnim postupkom zamjesa /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka tijesta	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	7,3	7,0	<LOD	8,6	<LOD	<LOQ	8,7	4,2	7,0
Ergokorninin	<LOD	2,9	3,6	<LOD	4,1	<LOD	0,7	4,9	1,9	2,9
Ergokristin	17,7	21,2	52,9	<LOD	144,5	5,0	10,7	75,3	<LOD	69,5
Ergokristinin	7,3	7,8	18,9	<LOD	59,4	1,8	3,5	30,3	<LOD	27,2
Ergokriptin	17,4	12,1	16,3	<LOD	42,9	<LOD	5,8	27,2	5,5	10,6
Ergokriptinin	9,5	<LOQ	2,2	<LOD	2,8	<LOD	<LOD	2,3	<LOD	1,3
Ergometrin	<LOD	17,0	33,4	<LOD	427,6	9,5	26,7	72,4	3,7	15,0
Ergometrinin	<LOQ	4,6	7,9	<LOD	59,6	0,8	6,0	16,5	0,7	3,3
Ergozin	13,1	11,6	23,3	<LOD	57,7	<LOQ	7,0	38,1	5,0	27,5
Ergozinin	13,8	12,3	22,8	<LOD	57,0	2,2	6,5	41,4	4,4	27,0
Ergotamin	6,1	5,0	10,5	<LOD	37,4	<LOQ	<LOQ	19,4	<LOD	7,5
Ergotaminin	2,3	1,9	5,7	<LOD	18,4	0,5	1,2	10,4	<LOD	5,9

**Tablica 12.** Koncentracija EA u tijestu za kruh od raženog brašna proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

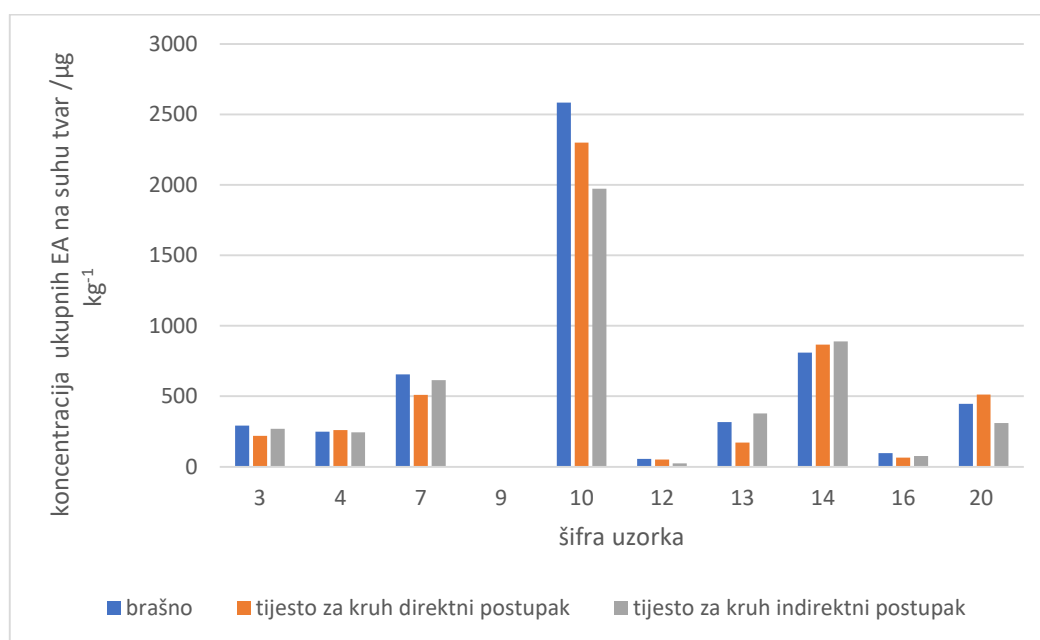
Šifra uzorka tijesta	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	4,3	6,0	<LOD	9,3	<LOD	2,0	6,6	6,1	4,8
Ergokorninin	<LOD	2,5	3,5	<LOD	4,2	<LOD	1,3	4,4	2,9	2,2
Ergokristin	16,9	22,3	53,0	<LOD	155,3	<LOQ	23,6	78,8	<LOD	36,0
Ergokristinin	7,9	8,4	25,2	<LOD	62,5	1,4	10,4	34,5	<LOD	15,5
Ergokriptin	20,6	9,4	10,4	<LOD	43,9	<LOD	9,0	29,9	7,2	7,0
Ergokriptinin	12,0	<LOQ	1,2	<LOD	2,7	<LOD	<LOQ	3,8	<LOQ	<LOQ
Ergometrin	<LOD	20,3	56,0	<LOD	314,1	5,3	60,4	67,1	4,5	12,1
Ergometrinin	<LOQ	3,2	13,3	<LOD	42,0	0,7	11,5	20,2	0,8	3,3
Ergozin	16,6	9,9	28,6	<LOD	54,7	<LOQ	12,0	38,8	4,1	17,3
Ergozinin	20,7	10,5	29,9	<LOD	52,5	1,7	12,7	41,3	4,7	17,1
Ergotamin	8,0	4,6	8,8	<LOD	31,8	<LOD	5,1	16,1	<LOD	4,6
Ergotaminin	4,6	2,2	9,9	<LOD	16,5	<LOQ	3,6	14,4	<LOD	4,0

Kako bi se koncentracije EA iz tijesta mogle usporediti s onima u brašnu, bilo je potrebno preračunati masu EA po masi brašna u tijestu, za što se koristila formula (1).

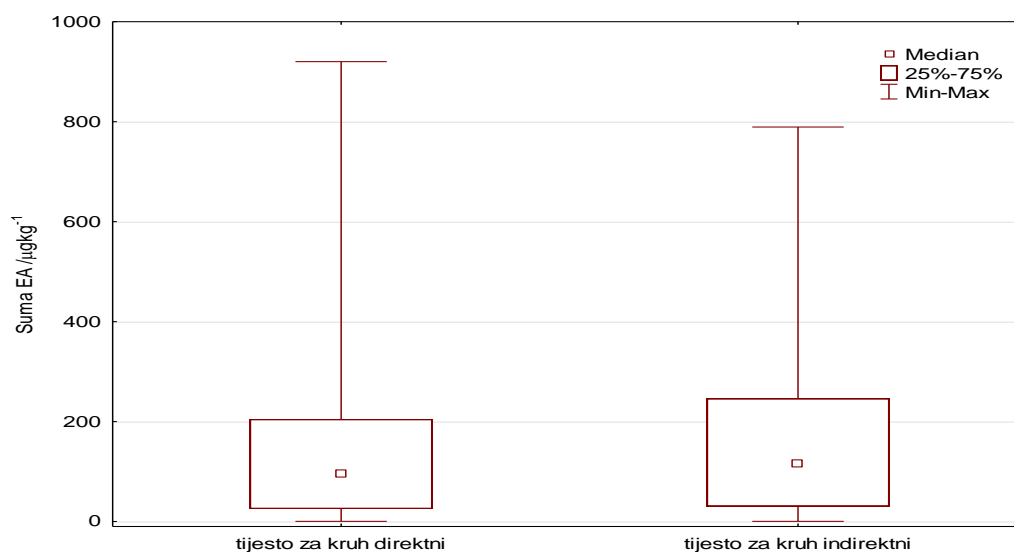
$$C(EA)_{\text{brašno}} = \frac{C(EA)_{\text{tijesto}} \cdot m(\text{tijesta})}{m(\text{brašna})} \quad (1)$$



Nakon izračuna i usporedbe koncentracija ukupnih EA u brašnu i tijestu vidljivo je da je kod oba načina proizvodnje kruha od raženog brašna došlo do redukcije EA iz raženog brašna u tijesto za kruh (**Slika 31**). Statističkom obradom podataka utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ukupnih EA u tijestima za kruhove proizvedene različitim postupcima zamjesa. Vrijednosti medijana su kod obje vrste tijesta za kruhove približno jednake, dok je raspon koncentracija ukupnih EA (25 % - 75 %) bio veći u tijestu za kruh proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa (**Slika 32**).



**Slika 31.** Redukcija EA iz raženog brašna u tijesto za kruh nakon direktnog i indirektnog postupka



**Slika 32.** Statistička analiza ukupnih EA u tijestu za kruhove proizvedene direktnim i indirektnim postupkom zamjesa

### 4.3.3. Ekstruzija

#### 4.3.3.1. Tjestenina

Koncentracije pojedinih EA u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način i ekstrudiranoj tjestenini prikazane su u **Tablicama 13** i **14**. Usporedbom koncentracija pojedinih EA u uzorcima tjestenina proizvedenih na konvencionalan način utvrđena je prisutnost svih analiziranih EA u 5 uzoraka tjestenina (tj. u 50 % analiziranih uzoraka), dok u jednom uzorku (10 %) nije bio prisutan niti jedan EA (**Tablica 13**).

Uspoređujući koncentracije pojedinih EA u uzorcima ekstrudiranih tjestenina, utvrđeno je prisustvo svih EA u 7 uzoraka (70 %), dok je u samo jednom uzorku (kao i kod tjestenine proizvedene na konvencionalan način) utvrđeno odsustvo EA (**Tablica 14**). U oba slučaja odsustva radilo se o istom uzorku, kod kojeg je prethodno u sirovini (raženoj krupici) od koje je proizvedena tjestenina utvrđeno prisustvo samo jednog EA (ergokristinina) u vrlo niskoj koncentraciji (**Tablica 9**).

**Tablica 13.** Koncentracija EA u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka tjestenine	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	8,3	10,4	<LOD	13,5	<LOD	5,0	13,0	11,8	15,0
Ergokorninin	<LOD	3,9	4,4	<LOD	6,6	<LOD	1,8	6,1	4,3	5,7
Ergokristin	17,9	34,2	83,6	<LOD	211,3	5,7	24,6	108,6	<LOD	52,6
Ergokristinin	5,9	14,1	30,4	<LOQ	81,7	1,8	10,3	43,2	<LOQ	19,1
Ergokriptin	10,5	11,9	16,2	<LOD	70,0	<LOD	16,0	38,7	10,6	15,3
Ergokriptinin	7,6	1,6	2,0	<LOD	3,7	<LOD	<LOQ	4,0	1,2	3,7
Ergometrin	<LOD	47,9	121,5	<LOD	894,0	16,4	105,3	144,0	10,4	31,1
Ergometrinin	<LOQ	6,8	18,2	<LOD	53,6	1,4	14,5	24,2	1,4	6,3
Ergozin	26,2	44,0	103,2	<LOD	198,1	5,7	32,5	112,0	16,0	56,8
Ergozinin	15,7	25,6	57,6	<LOD	104,5	2,9	20,2	72,8	9,6	34,7
Ergotamin	21,0	8,9	24,4	<LOD	56,8	<LOQ	6,4	30,0	<LOD	9,8
Ergotaminin	5,8	4,3	8,3	<LOD	23,2	0,7	2,6	13,5	<LOD	4,0

**Tablica 14.** Koncentracija EA u ekstrudiranoj tjestenini /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

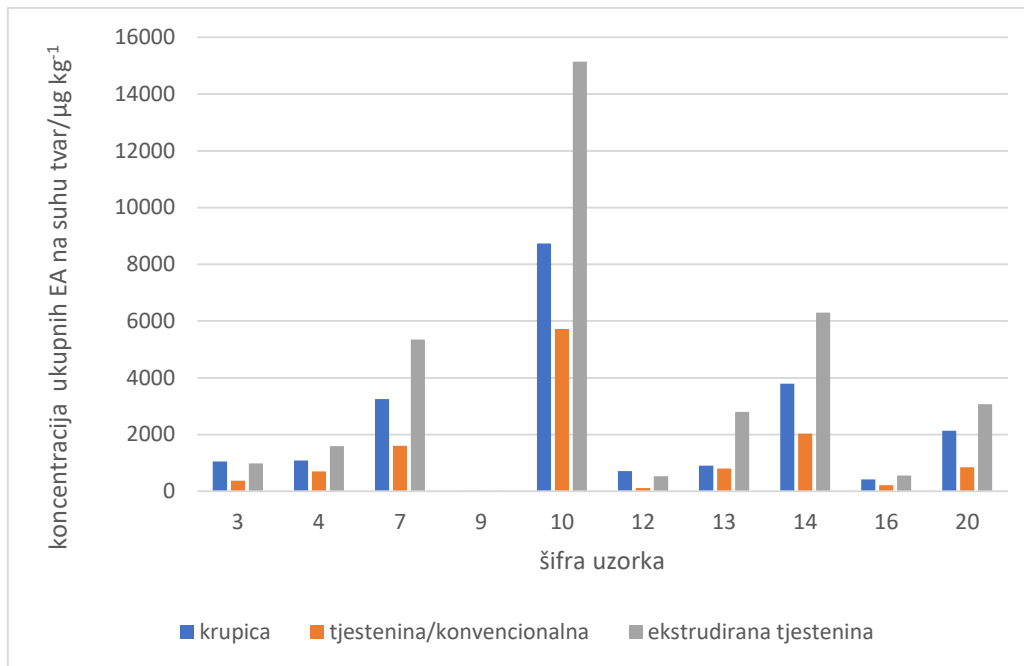
Šifra uzorka tjestenine	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOQ	8,1	18,2	<LOD	14,4	<LOD	5,7	18,7	6,8	16,2
Ergokorninin	0,7	7,2	16,2	<LOD	14,8	<LOD	6,3	17,9	6,1	16,0
Ergokristin	27,4	43,2	135,8	<LOD	262,8	19,6	40,0	121,3	6,3	126,6
Ergokristinin	24,3	39,5	114,7	<LOQ	231,4	16,5	34,0	111,0	5,7	108,0
Ergokriptin	44,5	18,1	23,1	<LOD	69,5	<LOD	24,4	60,3	10,1	21,9
Ergokriptinin	53,5	3,4	7,2	<LOD	14,9	<LOQ	3,4	16,9	1,5	7,8
Ergometrin	11,0	241,4	929,9	<LOQ	3375,7	64,9	607,6	1171,3	84,0	292,8
Ergometrinin	<LOQ	4,7	15,4	<LOD	37,9	1,2	10,7	19,9	1,5	5,3
Ergozin	44,4	48,6	142,0	<LOD	177,2	26,4	47,3	138,3	20,6	139,5
Ergozinin	43,6	43,9	123,0	<LOQ	173,8	22,8	40,0	136,6	19,4	136,5
Ergotamin	28,7	12,6	43,6	<LOD	95,5	4,9	10,7	42,2	2,8	28,4
Ergotaminin	18,5	8,8	35,0	<LOD	76,7	3,6	8,6	34,7	1,7	22,2

Kako bi se koncentracije EA iz tjestenine mogle usporediti s koncentracijama EA u krupici, bilo je potrebno preračunati masu EA po masi krupice u tjestenini, za što se koristila formula (2).

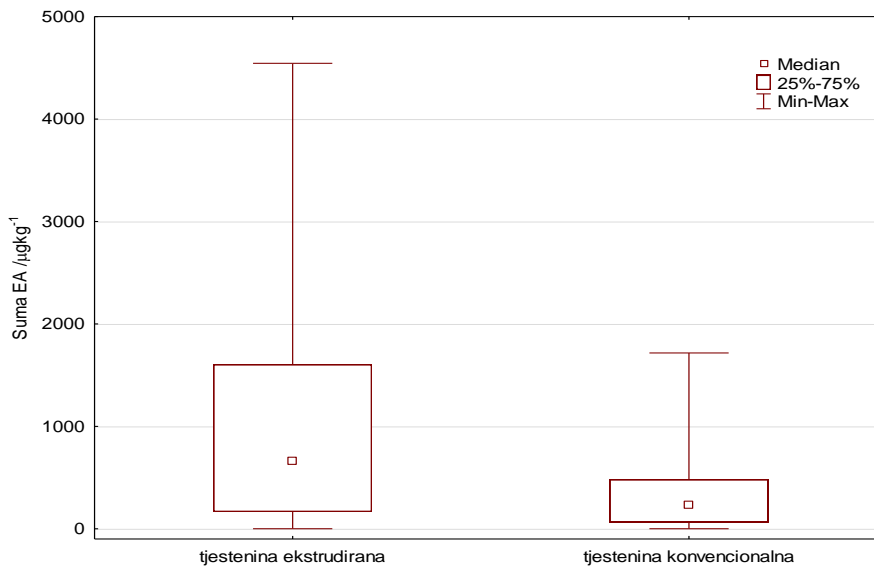
$$C(EA)_{krupica} = \frac{C(EA)_{tjestenina} \cdot m(tjestenina)}{m(krupica)} \quad (2)$$

Nakon izračuna i usporedbe koncentracija ukupnih EA u krupici i tjestenini vidljivo je da je u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način i ekstrudiranoj tjestenini došlo do redukcije EA (**Slika 33**).

Statističkom obradom podataka utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između ukupnih EA u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način i ekstrudiranoj tjestenini. Kod ekstrudirane tjestenine utvrđen je viši medijan i veći raspon koncentracija ukupnih EA (25 % - 75 %) u odnosu na tjesteninu proizvedenu na konvencionalan način (**Slika 34**).



**Slika 33.** Utjecaj ekstruzije na prisustvo EA u konvencionalnoj i ekstrudiranoj tjestenini



**Slika 34.** Statistička analiza ukupnih EA u konvencionalnoj i ekstrudiranoj tjestenini

### 4.3.3.2. Snack proizvod

Uspoređujući koncentracije EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja, utvrđeno je prisustvo barem jednog EA u svim snack proizvodima s 10 % raženih mekinja (**Tablica 15**) i u 90 % snack proizvoda s 20 % raženih mekinja (**Tablica 16**). Prisustvo svih EA detektirano je u dva snack proizvoda s 20 % raženih mekinja (**Tablica 16**), dok u niti jednom snack proizvodu s 10 % raženih mekinja nisu utvrđeni svi EA (**Tablica 15**). Također, u jednom snack proizvodu s 20 % raženih mekinja nije utvrđeno prisustvo niti jednog EA (**Tablica 16**), dok je u snack proizvodu pripremljenom od manjeg udjela istih mekinja (10 %) detektirano prisustvo samo jednog EA (ergokristinina)(**Tablica 15**). Međutim, ergokristinin nije detektiran u uzorku raženih mekinja koji se koristio za pripremu snack proizvoda (**Tablica 10**).

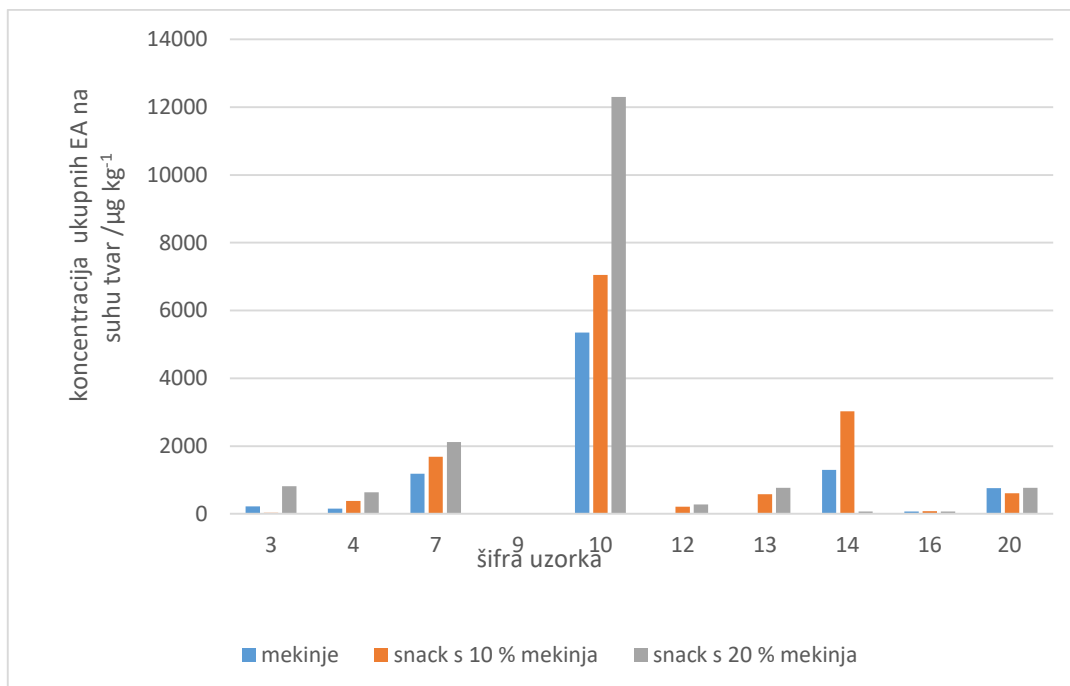
**Tablica 15.** Koncentracija EA u snack proizvodu s 10 % raženih mekinja /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka snack proizvoda	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ergokorninin	<LOQ	0,9	3,0	<LOQ	1,5	<LOQ	0,6	1,5	1,1	1,8
Ergokristin	<LOD	<LOQ	12,4	<LOD	21,4	<LOD	<LOQ	17,3	<LOD	<LOQ
Ergokristinin	<LOQ	2,6	8,9	0,5	18,0	1,4	2,1	15,0	<LOD	2,3
Ergokriptin	<LOQ	<LOQ	2,1	<LOD	5,7	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	2,9
Ergokriptinin	1,6	2,1	1,4	<LOQ	2,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,7
Ergometrin	<LOD	29,0	118,8	<LOQ	603,2	17,0	50,4	237,3	5,0	41,3
Ergometrinin	<LOD	0,6	2,4	<LOD	11,2	0,4	1,0	5,0	<LOD	0,8
Ergozin	<LOD	<LOQ	7,5	<LOD	17,5	<LOQ	<LOQ	8,6	<LOD	3,8
Ergozinin	1,1	2,4	9,9	<LOD	20,6	2,0	3,2	12,2	1,0	4,6
Ergotamin	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	2,4	<LOD	<LOD
Ergotaminin	<LOD	<LOQ	1,4	<LOD	2,9	<LOD	<LOD	3,0	<LOD	<LOQ

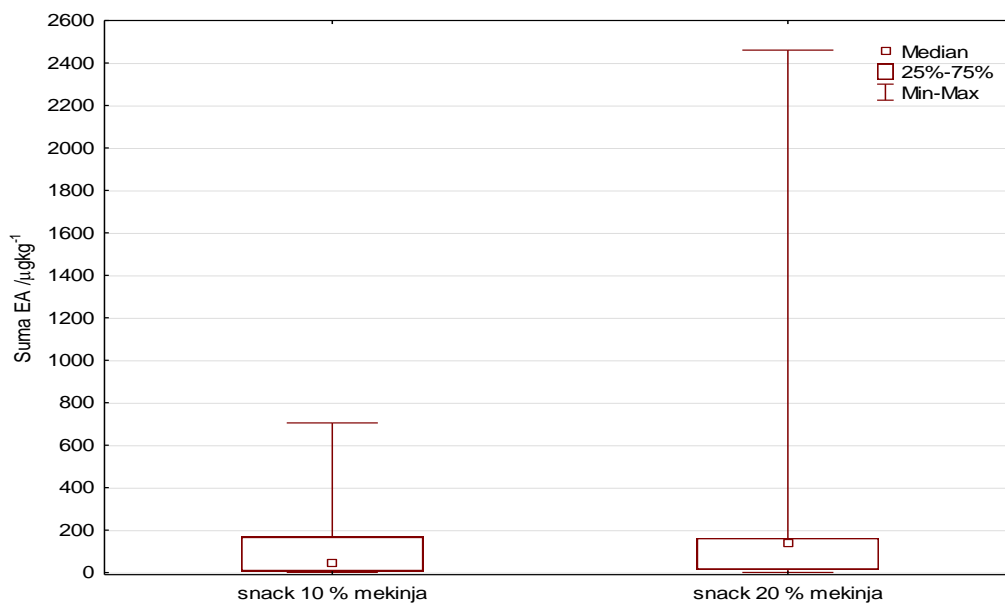
**Tablica 16.** Koncentracija EA u snack proizvodu s 20 % raženih mekinja /  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 

Šifra uzorka snack proizvoda	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	4,5	<LOQ	3,9	<LOD	6,3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
Ergokorninin	5,4	2,0	5,0	<LOQ	9,4	<LOQ	1,0	0,6	0,6	1,6
Ergokristin	18,7	10,9	32,6	<LOD	98,0	5,4	5,9	<LOD	<LOD	10,2
Ergokristinin	16,4	10,0	29,2	<LOD	84,6	4,6	4,8	<LOD	<LOD	8,0
Ergokriptin	3,6	3,2	3,6	<LOD	30,0	<LOD	2,6	<LOD	<LOQ	2,2
Ergokriptinin	8,2	1,9	3,2	<LOQ	12,6	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ
Ergometrin	5,5	63,2	271,6	<LOD	1985,1	32,5	126,5	12,4	12,0	112,2
Ergometrinin	<LOD	1,1	5,6	<LOD	28,7	0,7	2,5	<LOQ	<LOQ	1,9
Ergozin	42,8	15,7	28,2	<LOD	70,6	5,3	4,5	<LOD	<LOQ	7,2
Ergozinin	57,0	18,1	32,8	<LOD	106,8	5,4	5,1	1,4	1,6	9,2
Ergotamin	<LOD	<LOQ	3,5	<LOD	11,9	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
Ergotaminin	<LOQ	1,2	4,3	<LOD	16,8	0,5	0,7	<LOD	<LOD	1,0

Uspoređujući utjecaj ekstruzije na prisustvo EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja detektirano je da kod obje vrste snack proizvoda dolazi do povećanja koncentracije EA (**Slika 35**). Veće koncentracije ukupnih EA utvrđene su većinom u snack proizvodima s 20 % mekinja što se može objasniti činjenicom da je doprinos mekinja utjecao na sadržaj ukupnih EA. Statističkom obradom podataka utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između ukupnih EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja. Viši medijan utvrđen je kod snack proizvoda s 20 % raženih mekinja u odnosu na snack proizvod s 10 % raženih mekinja, dok je raspon koncentracija približno jednak (**Slika 36**).



**Slika 35.** Utjecaj ekstruzije na prisustvo EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja



**Slika 36.** Statistička analiza ukupnih EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja

#### 4.3.4. Kuhanje

Koncentracije EA u kuhanoj tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način i kuhanoj ekstrudiranoj tjestenini prikazane su u **Tablicama 17** i **18** te je utvrđeno prisustvo barem jednog EA u 90 % uzoraka kuhane tjestenine proizvedene na konvencionalan način i u svim uzorcima kuhane ekstrudirane tjestenine. U 70 % uzoraka kuhane ekstrudirane tjestenine detektirano je prisustvo svih EA, za razliku od kuhane tjestenine proizvedene na konvencionalan način gdje niti jedan uzorak nije sadržavao sve EA, a jedan uzorak nije sadržavao niti jedan EA (**Tablica 17**). U posljednjem slučaju radilo se o uzorku tjestenine koja je pripremljena od ražene krupice koja je sadržavala samo jedan EA (ergokristinin) u vrlo maloj koncentraciji ( $1,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ )(**Tablica 9**).

**Tablica 17.** Koncentracija EA u kuhanoj tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka kuhana tjestenina konvencionalna	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	2,38	<LOD
Ergokorninin	<LOD	0,93	1,22	<LOD	1,65	<LOD	<LOQ	1,51	1,88	0,68
Ergokristin	4,04	<LOQ	8,16	<LOD	21,12	<LOD	<LOQ	11,81	<LOD	4,20
Ergokristinin	3,55	2,48	6,53	<LOD	16,41	0,62	2,29	8,57	<LOD	4,20
Ergokriptin	1,95	<LOQ	<LOQ	<LOD	6,55	<LOD	<LOQ	4,15	<LOQ	<LOQ
Ergokriptinin	2,48	<LOQ	<LOQ	<LOD	1,99	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Ergometrin	<LOQ	23,78	86,72	<LOD	402,98	7,68	66,97	112,86	4,62	29,86
Ergometrinin	<LOD	0,93	3,01	<LOD	14,12	<LOQ	2,38	4,14	<LOQ	0,92
Ergozin	9,05	4,93	16,18	<LOD	28,34	<LOQ	3,62	20,22	<LOQ	8,92
Ergozinin	7,64	4,29	11,51	<LOD	21,44	0,74	3,03	14,02	1,80	6,45
Ergotamin	<LOD	<LOD	3,42	<LOD	8,87	<LOD	<LOD	5,16	<LOD	<LOQ
Ergotaminin	<LOQ	<LOQ	2,30	<LOD	5,57	<LOD	<LOQ	2,88	<LOD	0,62

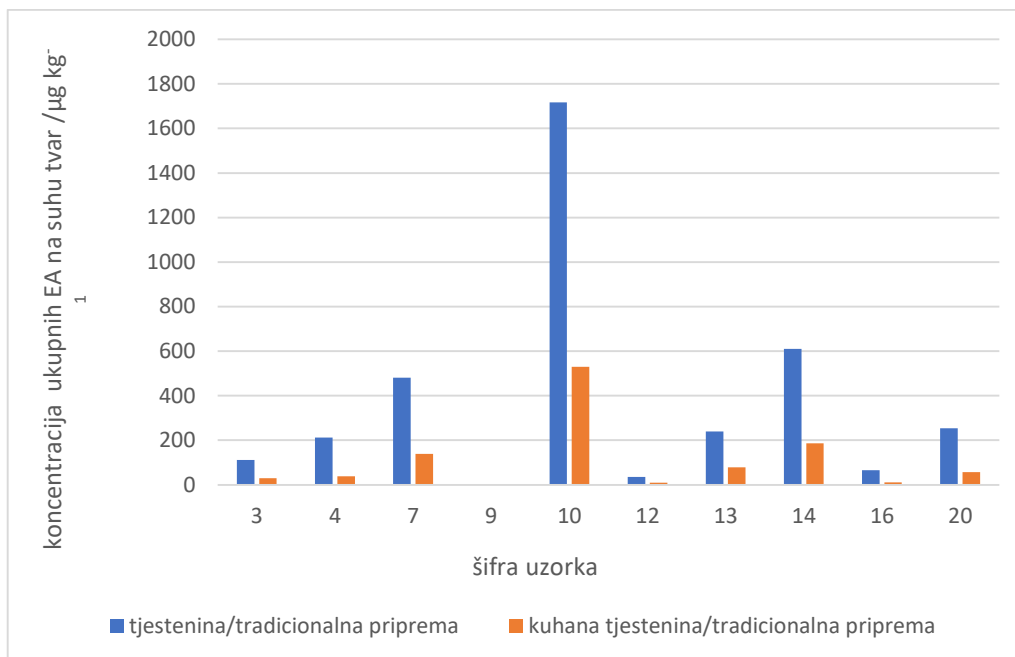


**Tablica 18.** Koncentracija EA u kuhanoj ekstrudiranoj tjestenini /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

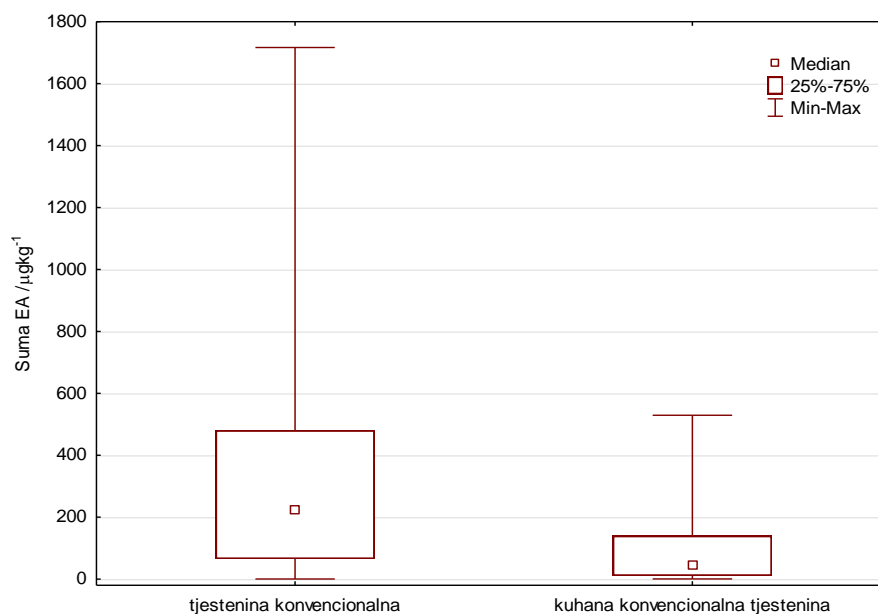
Šifra uzorka kuhana tjestenina ekstrudirana	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	9,1	15,5	<LOD	11,6	<LOD	2,9	18,6	8,9	9,1
Ergokorninin	<LOQ	9,0	13,5	<LOD	12,4	<LOQ	2,9	18,7	7,9	9,1
Ergokristin	26,4	45,8	117,8	<LOD	228,5	15,1	28,7	129,2	6,4	77,6
Ergokristinin	21,3	39,9	100,0	0,9	202,2	12,2	26,0	116,4	5,5	63,4
Ergokriptin	20,3	19,8	19,2	<LOD	66,2	<LOQ	13,6	53,1	9,1	17,5
Ergokriptinin	22,4	3,2	4,9	<LOD	12,9	<LOQ	2,2	11,6	1,5	4,0
Ergometrin	7,8	197,3	545,9	<LOQ	2394,7	111,2	371,5	710,6	53,2	167,0
Ergometrinin	<LOQ	3,1	8,3	<LOD	29,3	1,8	6,1	11,8	0,9	2,8
Ergozin	30,0	43,4	88,1	<LOD	128,4	13,2	26,4	117,5	12,8	55,0
Ergozinin	34,5	44,5	92,2	<LOQ	138,7	12,5	26,3	124,1	14,7	54,9
Ergotamin	8,2	11,6	32,6	<LOD	76,4	4,4	8,8	44,0	3,5	17,4
Ergotaminin	5,7	7,8	23,1	<LOD	51,2	2,5	5,8	28,6	1,7	14,5

Uspoređujući koncentracije ukupnih EA u ekstrudiranoj tjestenini i tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način prije i poslije kuhanja, možemo zaključiti da je kuhanjem u oba slučaja došlo do redukcije EA (**Slika 37, Slika 39**).

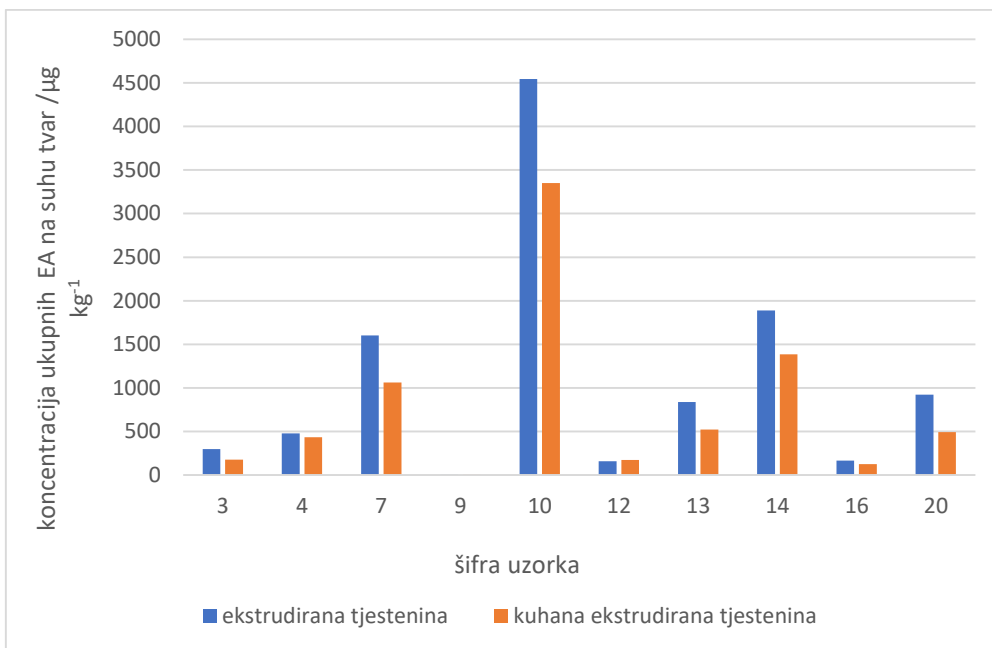
Statističkom obradom podataka za ukupne EA u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način i kuhanoj tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ukupnih EA prije i poslije kuhanja tjestenine proizvedene na konvencionalan način. Viši medijan i veći raspon koncentracija (25 % - 75 %) utvrđeni su u tjestenini prije kuhanja (**Slika 38**). Također, statističkom obradom podataka za ukupne EA u ekstrudiranoj tjestenini i kuhanoj ekstrudiranoj tjestenini utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ukupnih EA u ekstrudiranoj tjestenini i kuhanoj ekstrudiranoj tjestenini. Neznatno viši medijan i veći raspon koncentracija (25 % - 75 %) utvrđeni su u ekstrudiranoj tjestenini prije kuhanja (**Slika 40**).



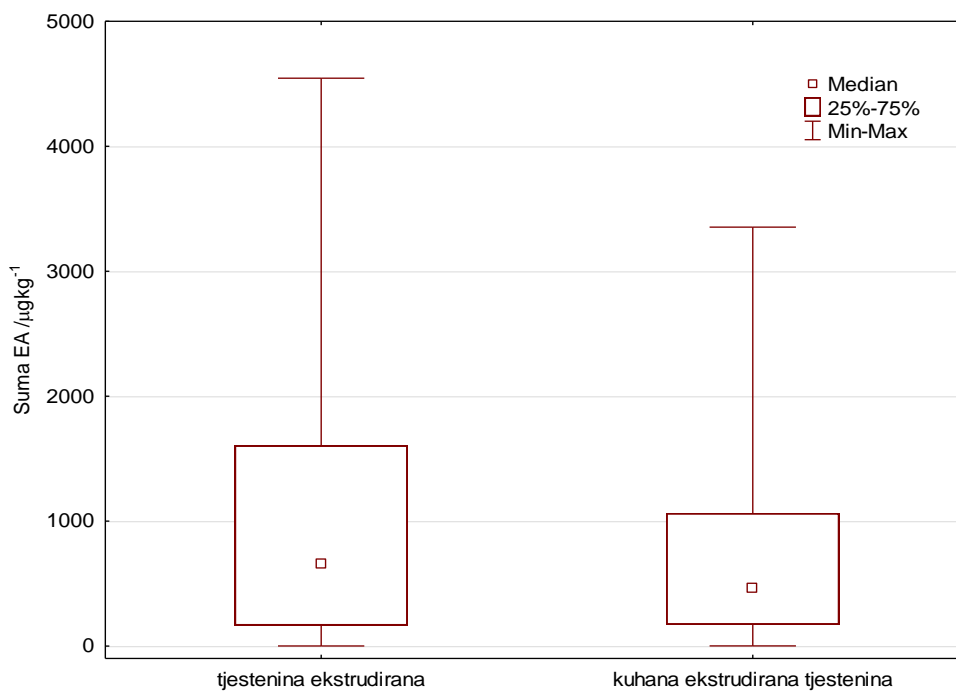
**Slika 37.** Redukcija EA iz tjestenine proizvedene na konvencionalan način u kuhanu tjesteninu proizvedenu na konvencionalan način



**Slika 38.** Statistička analiza ukupnih EA u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način i kuhanoj tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način



**Slika 39.** Redukcija EA iz ekstrudirane tjestenine u kuhanu ekstrudiranu tjesteninu

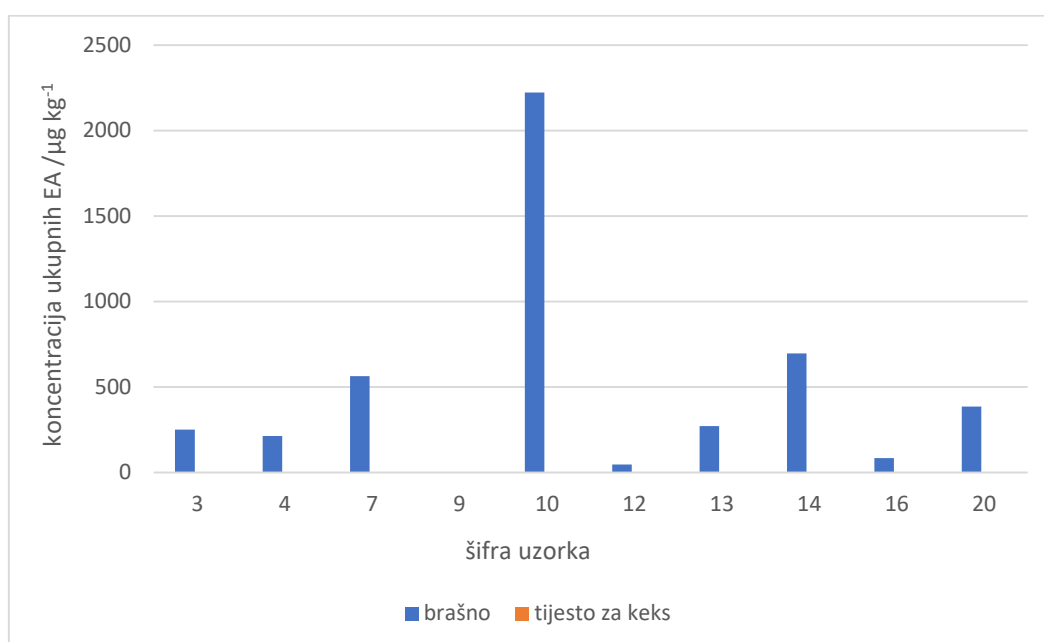


**Slika 40.** Statistička analiza ukupnih EA u ekstrudiranoj tjestenini i kuhanj ekstrudiranoj tjestenini

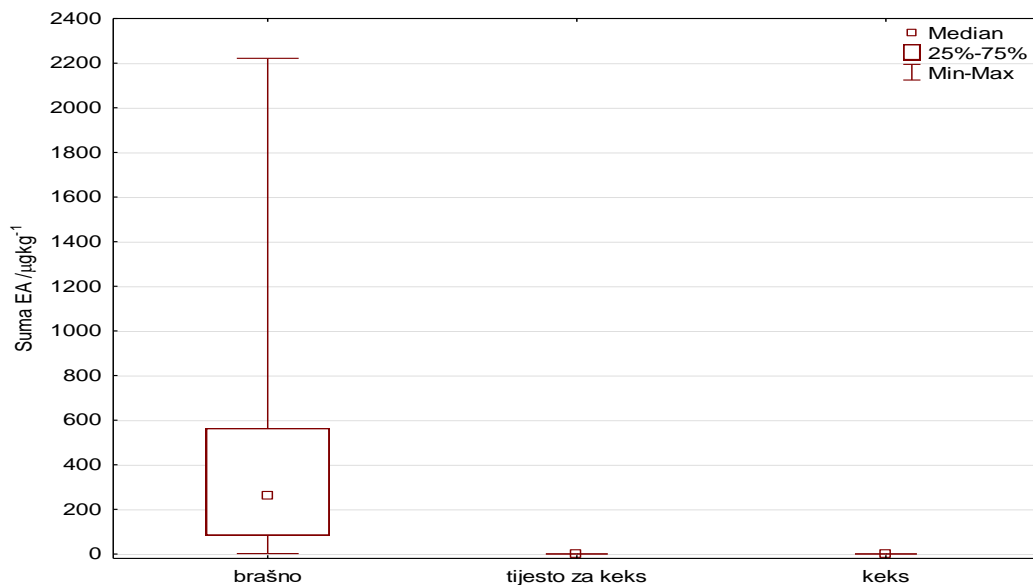
### 4.3.5. Pečenje

#### 4.3.5.1. Keks

Rezultati analiza svih uzoraka tijesta za keks i kekse utvrdili su da su koncentracije svih EA bile ispod limita detekcije, što upućuje na činjenicu da je prilikom zamjesa tijesta za kekse došlo do 100 % -tne redukcije EA (**Slika 41**). Statističkom obradom podataka za ukupne EA u brašnu, tijestu za keks i kekse utvrđeno je da postoji statistička značajna razlika između ukupnih EA u brašnu i tijestu za keks te brašnu i kekse ( $p < 0,05$ ). Budući da su svi rezultati za ukupne EA u tijestu za keks i kekse bili ispod limita detekcije, nije bilo moguće napraviti statističku usporedbu tih rezultata (**Slika 42**).



**Slika 41.** Redukcija EA iz brašna u tijesto za keks



**Slika 42.** Statistička analiza ukupnih EA brašnu, tijestu za keks i keksu

#### 4.3.5.2. Kruh

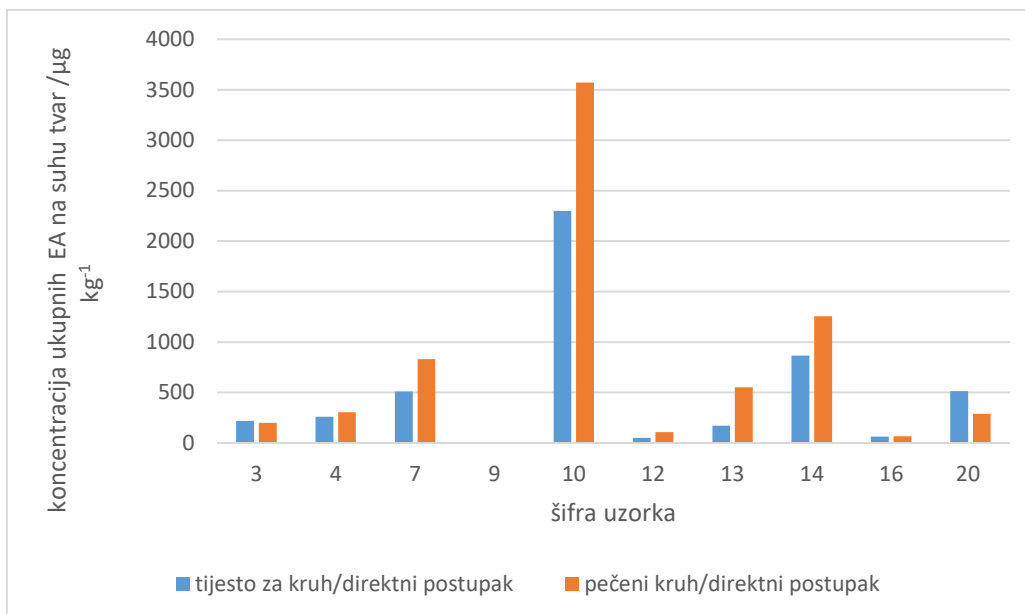
Koncentracije pojedinih EA u kruhovima proizvedenim direktnim i indirektnim postupcima prikazane su u **Tablicama 19 i 20** te je utvrđeno da nije bilo razlike između kruhova proizvedenih različitim postupcima obzirom na broj uzoraka u kojima je detektiran bar jedan EA. Također nije bilo razlike u broju kruhova kod kojih su utvrđeni svi EA (40 %), a radilo se o istim kruhovima proizvedenim direktnim i indirektnim postupkom zamjesa (**Tablica 19, Tablica 20**). Štoviše, u istom uzorku kruha proizvedenom različitim postupcima zamjesa nije utvrđen niti jedan EA (**Tablica 19, Tablica 20**), što je bilo očekivano, budući da je u sirovini (brašnu) koje se koristilo za pripremu kruha detektiran jedino ergokristinin u vrlo maloj koncentraciji ( $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (**Tablica 8**).

**Tablica 19.** Koncentracija EA u kruhu od raženog brašna proizvedenom direktnim postupkom /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

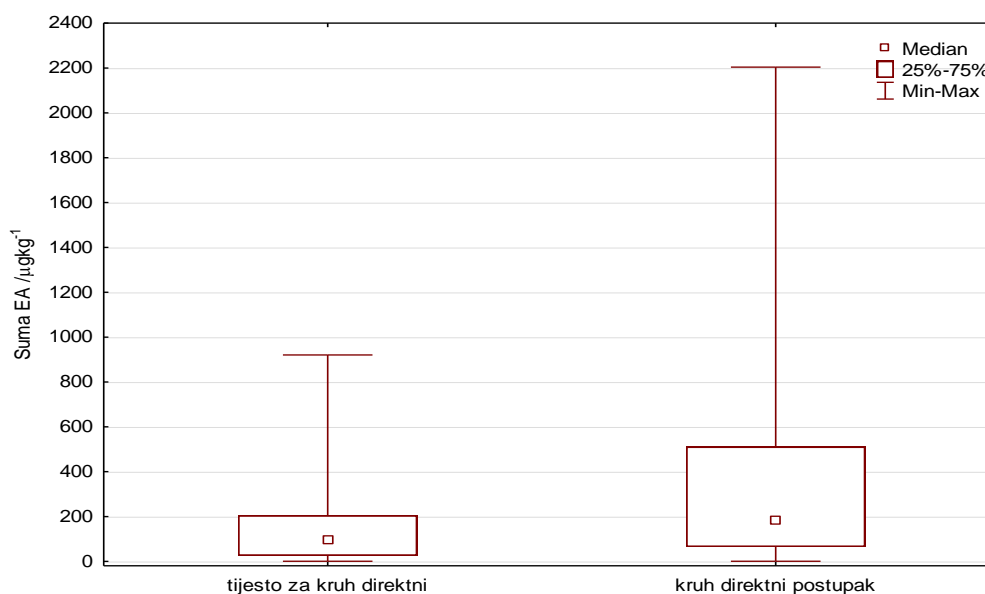
Šifra uzorka kruh direktni postupak	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	6,4	7,9	<LOD	10,8	<LOD	3,1	8,6	4,3	5,0
Ergokorninin	<LOQ	3,6	4,6	<LOD	6,8	<LOD	1,6	6,1	2,2	3,0
Ergokristin	20,3	23,8	50,5	<LOD	163,5	6,9	17,8	76,0	<LOD	33,8
Ergokristinin	13,2	13,5	31,5	<LOD	95,8	4,0	11,4	43,8	<LOD	21,5
Ergokriptin	16,7	9,9	12,1	<LOD	57,1	<LOD	10,2	35,4	5,2	6,5
Ergokriptinin	15,2	1,3	2,1	<LOD	6,8	<LOD	<LOQ	4,2	<LOD	<LOQ
Ergometrin	6,2	90,7	309,9	<LOD	1618,3	36,6	255,3	460,1	15,6	59,9
Ergometrinin	<LOQ	4,0	9,4	<LOD	35,0	1,1	9,0	15,1	0,6	2,6
Ergozin	19,0	13,5	30,8	<LOD	73,6	6,2	12,6	46,3	6,8	18,1
Ergozinin	23,2	12,8	31,4	<LOD	72,7	5,9	12,7	47,1	6,6	16,6
Ergotamin	6,2	4,3	12,7	<LOD	39,0	2,5	4,3	19,1	<LOD	6,7
Ergotaminin	3,1	2,7	8,4	<LOD	24,5	1,7	2,3	13,4	<LOD	3,9

Pečenjem kruhova bez obzira na način zamjesa tijesta dolazi do povećanja koncentracija ukupnih EA (**Slika 43, Slika 45**).

Statističkom obradom podataka o ukupnim EA u tijestu za kruh proizvedenom direktnim postupkom zamjesa i kruhu proizvedenom istim postupkom te u tijestu za kruh proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa i kruhu proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika. Viši medijan i veći raspon koncentracija (25 % - 75 %) utvrđen je u kruhu proizvedenom direktnim postupkom zamjesa u odnosu na tijesto za kruh proizvedenom direktnim postupkom zamjesa (**Slika 44**). Slični rezultati utvrđeni su kod kruha proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa (**Slika 46**).



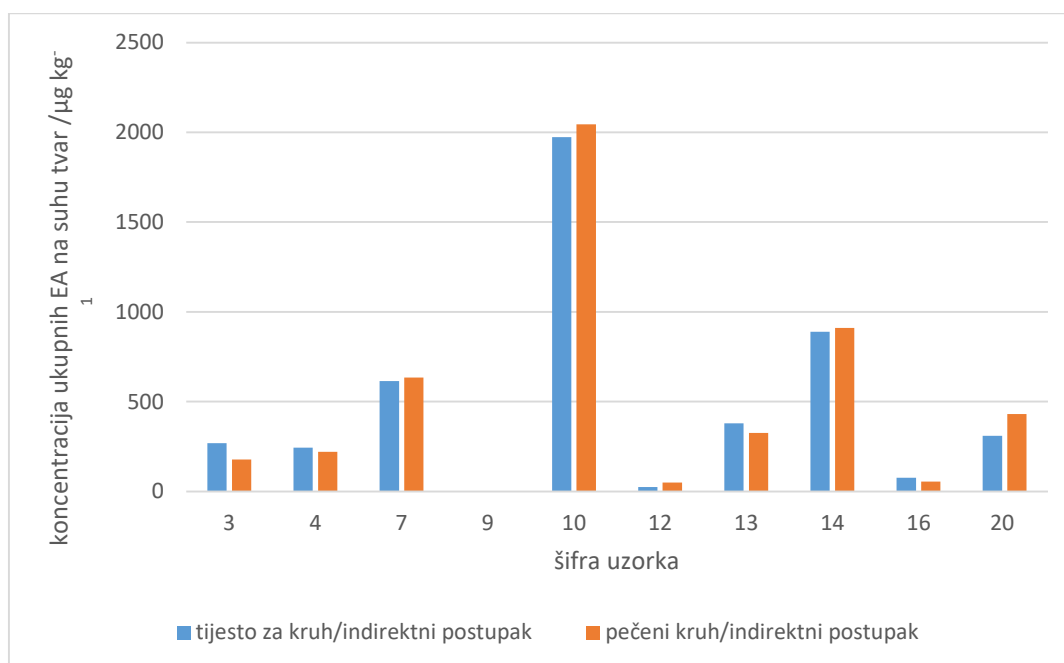
**Slika 43.** Utjecaj pečenja na prisustvo EA u kruhu proizvedenom direktnim postupkom



**Slika 44.** Statistička analiza ukupnih EA u tijestu za kruh i kruhu proizvedenom direktnim postupkom

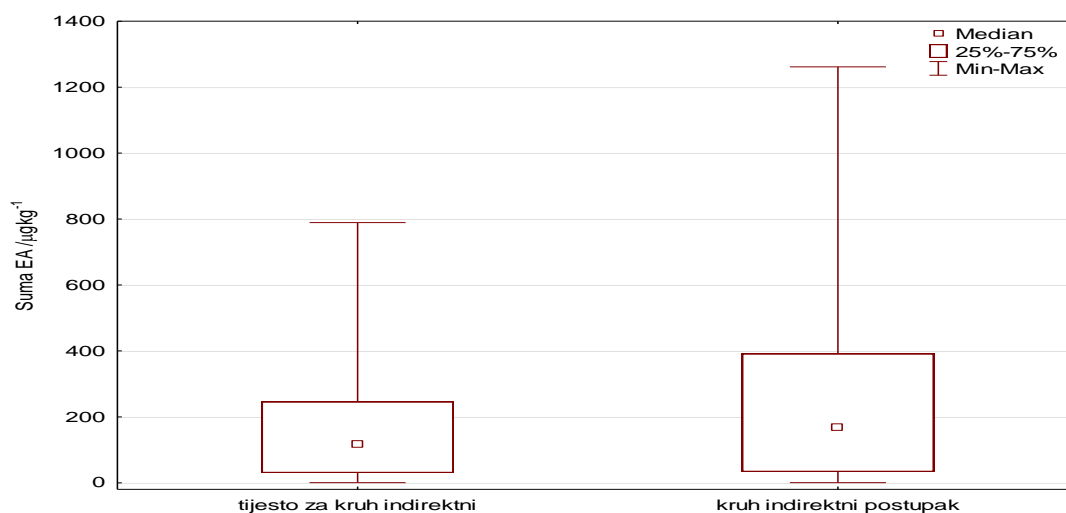
**Tablica 20.** Koncentracija EA u kruhu od raženog brašna proizvedenom indirektnim postupkom /  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Šifra uzorka kruh indirektni postupak	3	4	7	9	10	12	13	14	16	20
Ergokornin	<LOD	5,3	9,3	<LOD	8,2	<LOD	2,3	10,2	4,3	8,2
Ergokorninin	<LOQ	3,0	5,1	<LOD	4,8	<LOD	1,6	7,1	2,5	4,6
Ergokristin	18,7	21,9	67,2	<LOD	162,7	4,5	18,5	82,5	<LOD	63,1
Ergokristinin	10,8	11,6	39,2	<LOD	81,3	2,2	10,1	46,7	<LOD	34,8
Ergokriptin	18,7	11,4	15,1	<LOD	39,7	<LOD	7,6	31,2	5,6	9,8
Ergokriptinin	14,0	<LOQ	2,3	<LOD	4,3	<LOD	<LOQ	4,9	<LOQ	2,0
Ergometrin	<LOQ	49,1	133,9	<LOD	754,7	19,6	120,3	224,3	8,3	55,7
Ergometrinin	<LOQ	4,5	13,0	<LOD	37,2	0,9	9,5	19,8	0,8	4,1
Ergozin	15,6	12,3	38,8	<LOD	57,1	<LOQ	12,7	48,4	5,9	33,0
Ergozinin	20,2	12,2	41,5	<LOQ	56,1	2,1	12,6	51,8	5,8	32,8
Ergotamin	8,8	2,8	15,1	<LOD	31,8	<LOQ	3,8	18,3	<LOD	10,0
Ergotaminin	3,2	2,1	10,7	<LOD	23,6	0,8	1,8	16,3	<LOD	8,1



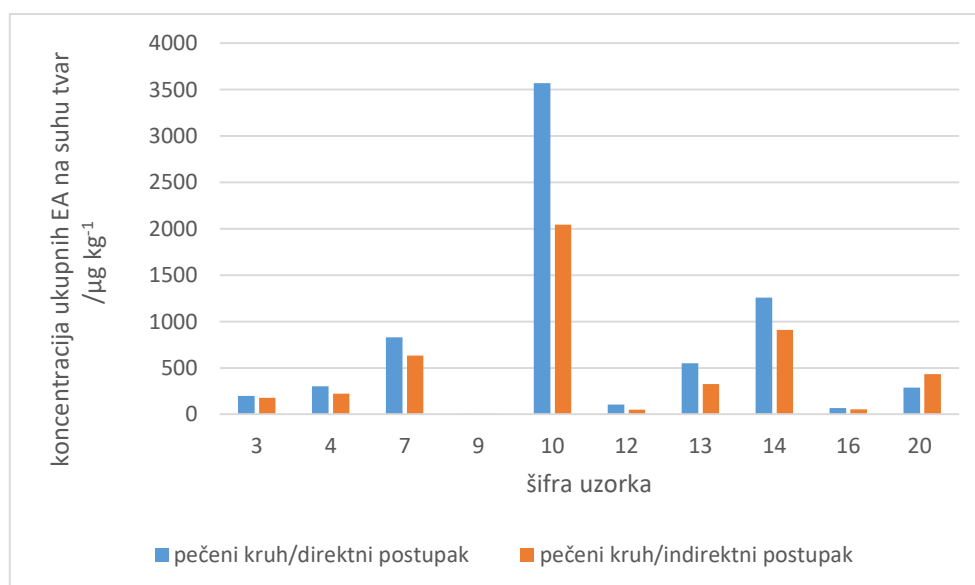
**Slika 45.** Utjecaj pečenja na prisustvo EA u kruhu proizvedenom indirektnim postupkom



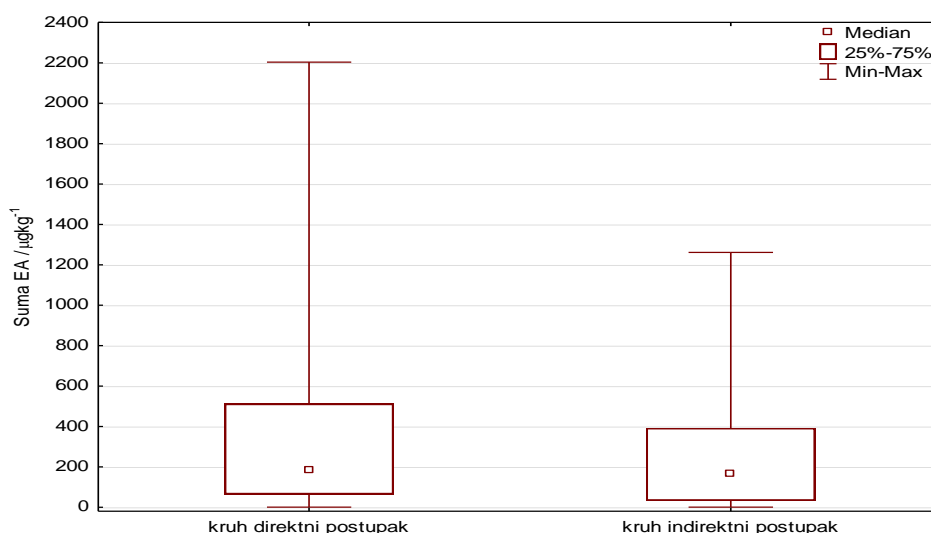


**Slika 46.** Statistička analiza ukupnih EA u tijestu za kruh i kruhu proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa

Uspoređujući koncentracije ukupnih EA u kruhovima proizvedenim različitim načinom zamjesa, utvrđeno je da kruh proizveden direktnim postupkom zamjesa zadržava više ukupnih EA u odnosu na kruh proizveden indirektnim postupkom zamjesa (**Slika 47**). Statističkom obradom podataka o ukupnim EA u kruhovima proizvedenim različitim postupcima zamjesa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između EA u kruhu proizvedenom direktnim i indirektnim postupkom zamjesa. Vrijednosti medijana su podjednake kod obje vrste zamjesa, dok je raspon koncentracija (25 % - 75 %) bio viši kod kruha nego kod tijesta za kruh, bez obzira na vrstu zamjesa (**Slika 48**).



**Slika 47.** Usporedba koncentracija ukupnih EA u kruhu od raženog brašna proizvedenom direktnim i indirektnim postupkom zamjesa



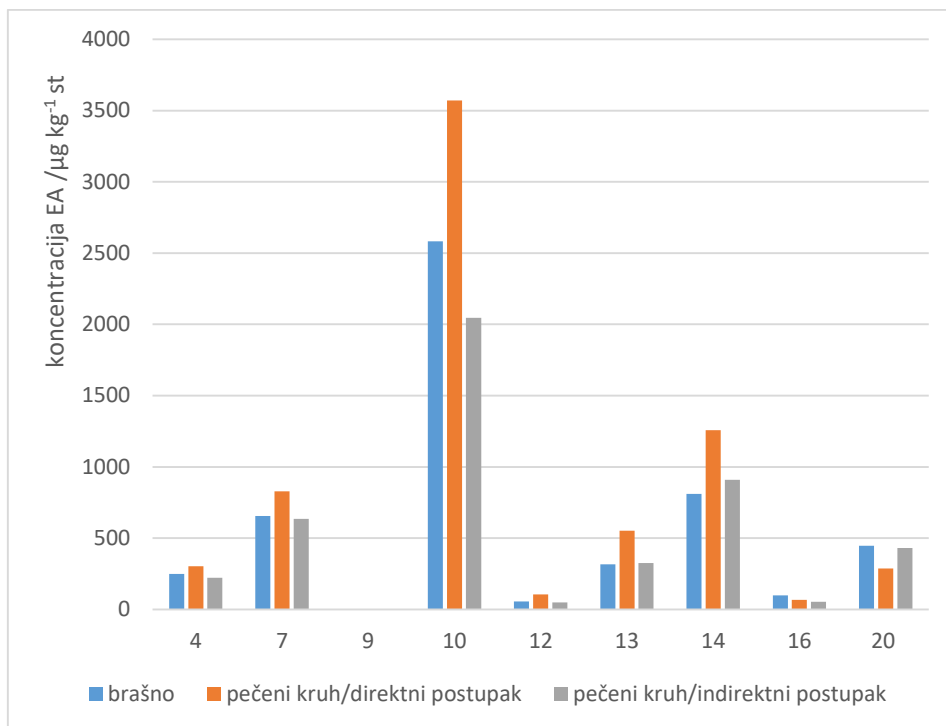
**Slika 48.** Statistička analiza ukupnih EA u kruhu proizvedenom direktnim i indirektnim postupkom zamjesa

#### 4.3.6. Fermentacija i pečenje

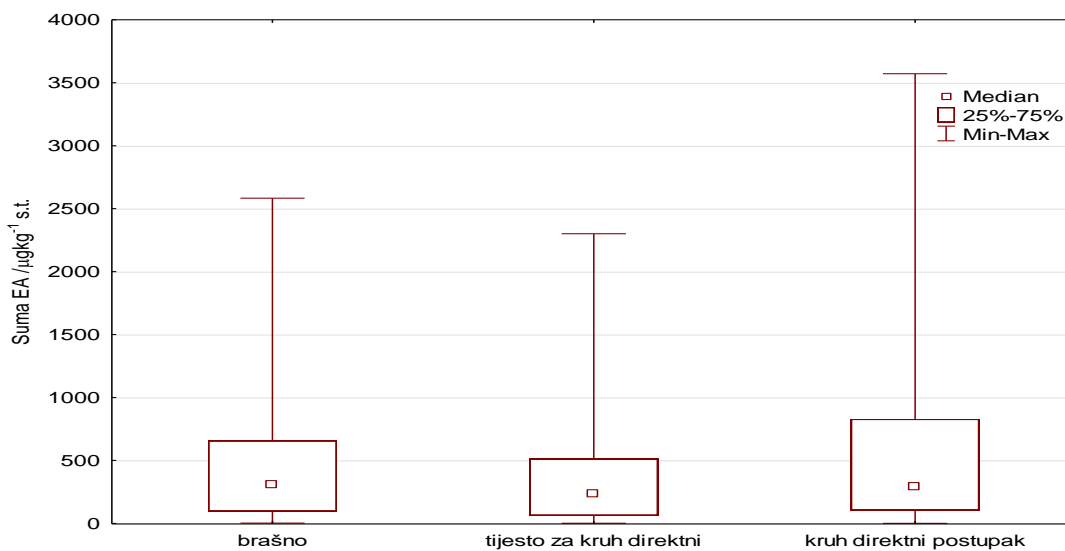
Fermentacijom i pečenjem kruha kod indirektnog postupka zamjesa dolazi do redukcije EA. Nasuprot tome, fermentacijom i pečenjem kruha kod direktnog postupka zamjesa dolazi do povećanja koncentracija ukupnih EA u kruhu (**Slika 49**).

Statističkom obradom podataka o ukupnim EA u brašnu, tijestu za kruh proizvedenom direktnim postupkom zamjesa i kruhu proizvedenom direktnim postupkom zamjesa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika. Najveći raspon koncentracija (25 % - 75 %) utvrđen je kod kruha proizvedenog direktnim postupkom zamjesa, dok su vrijednosti medijana približno jednake (**Slika 50**).

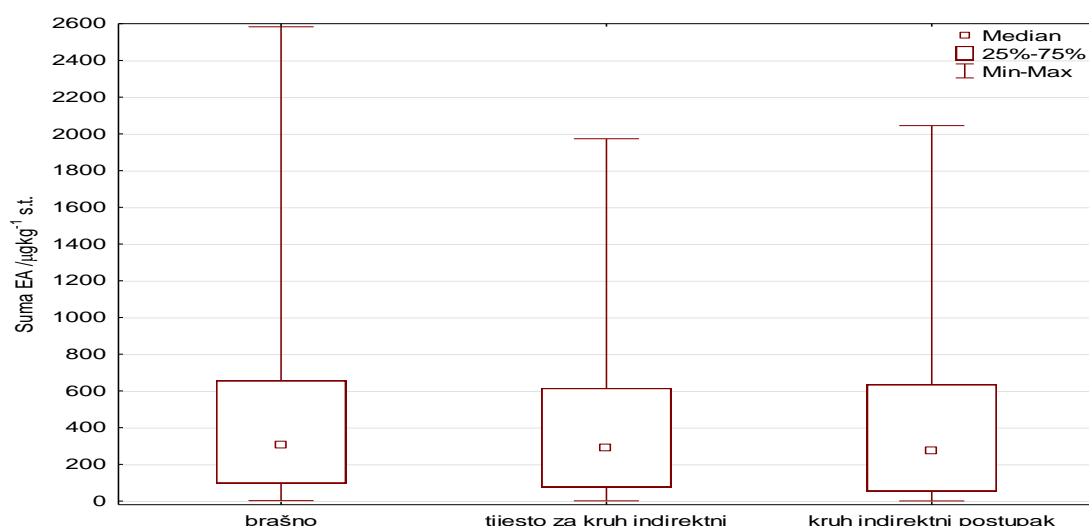
Statističkom obradom podataka o ukupnim EA u brašnu, tijestu za kruh proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa i kruhu proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika. Vrijednosti medijana i rasponi koncentracija (25 % - 75 %) nisu se značajno razlikovali kod brašna, tijesta za kruh proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa i kruha proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa (**Slika 51**).



**Slika 49.** Redukcija EA iz brašna u kruh proizveden direktnim i indirektnim postupkom zamjesa izraženim na suhu tvar

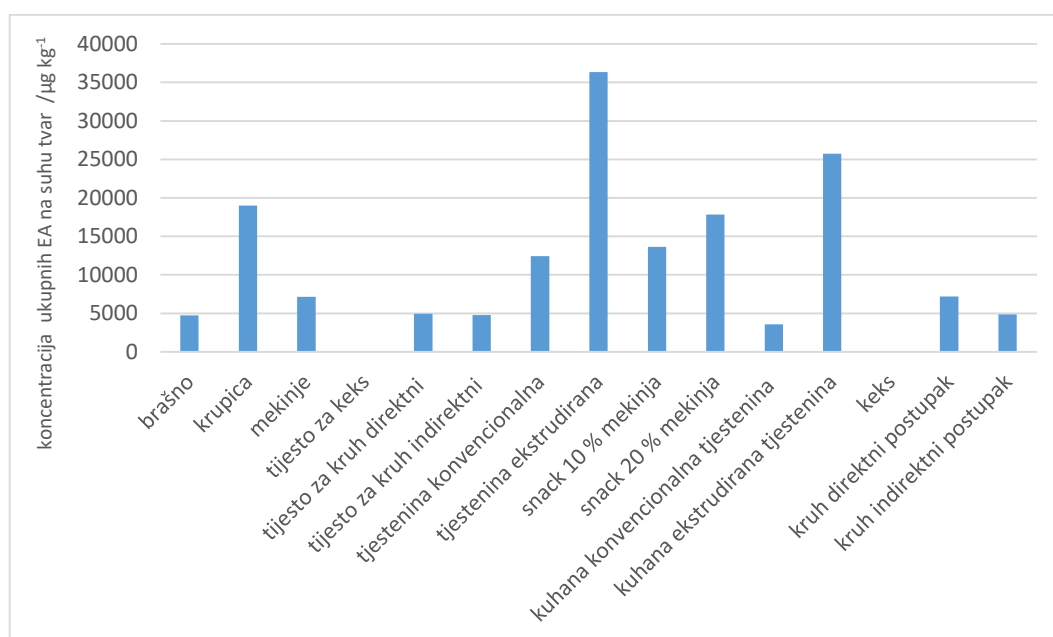


**Slika 50.** Statistička analiza podataka za redukciju EA iz brašna u kruh proizveden direktnim postupkom izraženim na suhu tvar

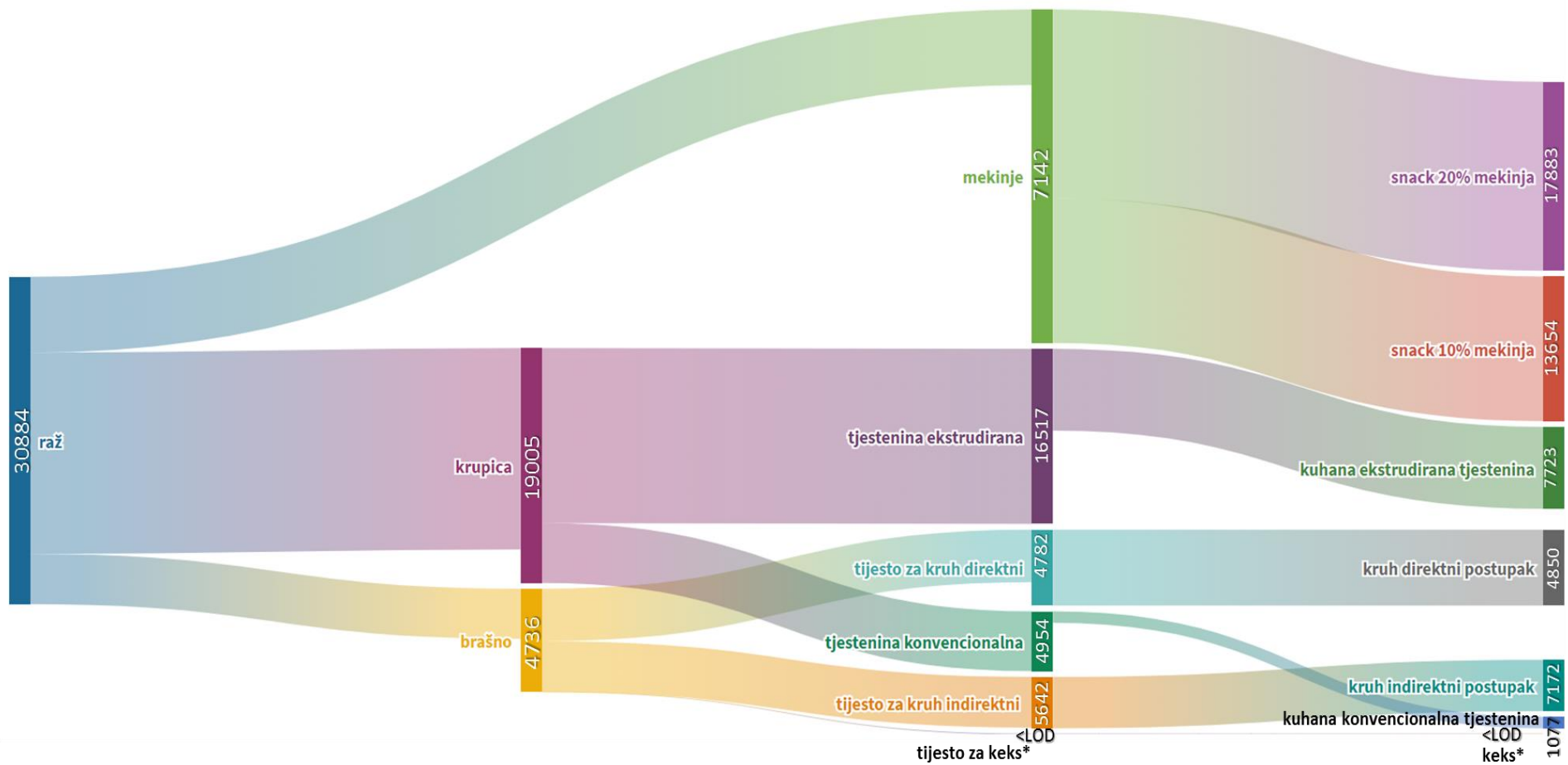


**Slika 51.** Statistička analiza podataka za redukciju EA iz brašna u kruh proizveden indirektnim postupkom izraženim na suhu tvar

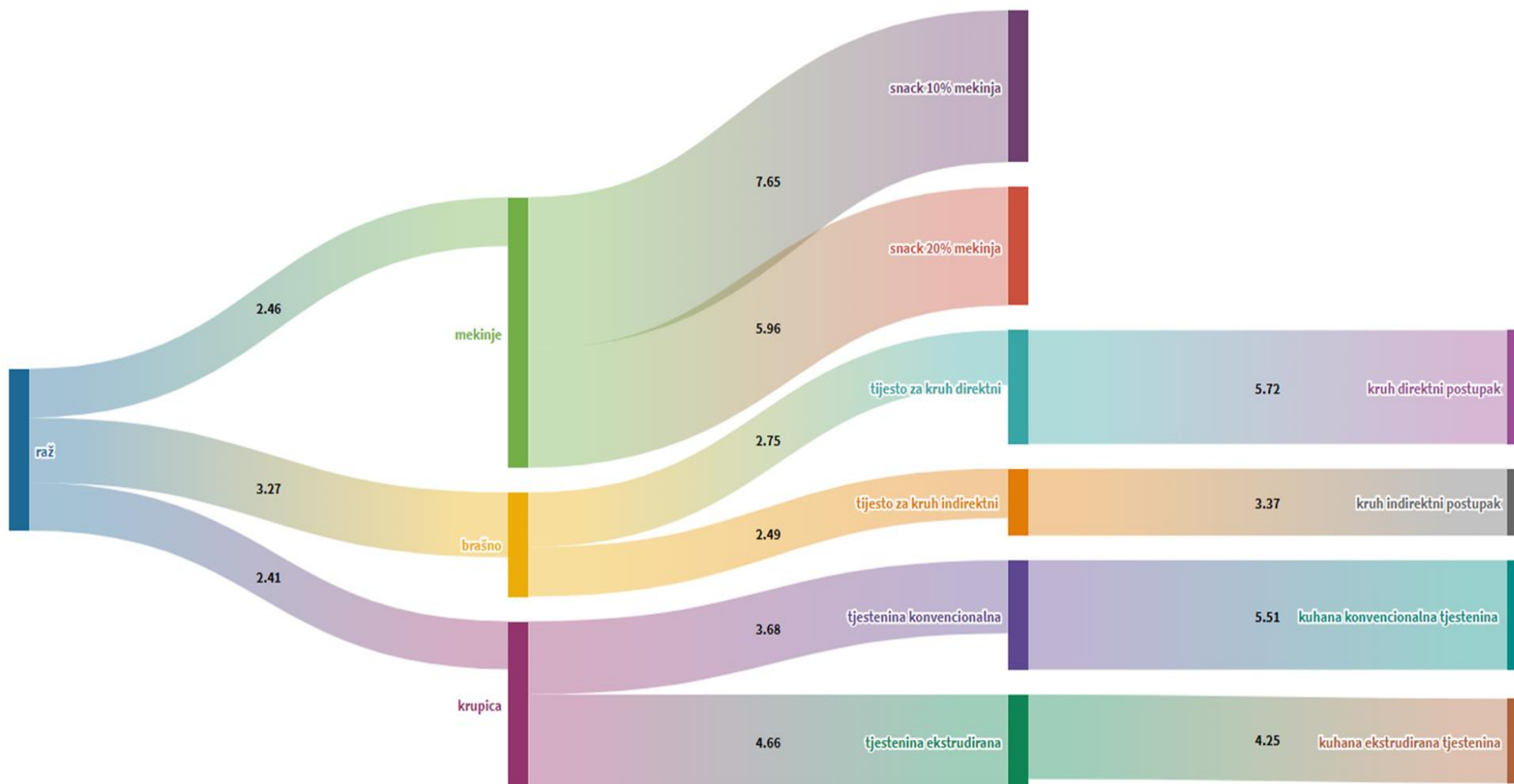
Usporedbom koncentracija ukupnih EA u svim uzorcima sirovina, poluproizvoda i proizvoda od raži utvrđena je najviša koncentracija ukupnih EA u ekstrudiranoj tjestenini (**Slika 52**). Slijedi kuhana ekstrudirana tjestenina, krupica, snack proizvod s 20 % mekinja, snack proizvod s 10 % mekinja, tjestenina konvencionalna, kruh direktni postupak zamjesa, mekinje, tijesto za kruh direktni postupak zamjesa, kruh indirektni postupak zamjesa te brašno. Najniža koncentracija ukupnih EA izmjerena je u kuhanoj konvencionalnoj tjestenini, dok u tijestu za kekse i keksima nije utvrđeno prisustvo EA tj. vrijednosti svih EA bile su ispod LOD vrijednosti (**Slika 52**, **Slika 53**).



**Slika 52.** Usporedba suma koncentracija ukupnih EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži



**Slika 53.** Raspodjela koncentracija ukupnih EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )



**Slika 54.** Omjeri (R)- i (S)- epimera ukupnih EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Pojavnost ergot alkaloida u raži u RH

Analizom neobrađene raži u RH te poluproizvoda i proizvoda od raži detektirani su i kvantificirani svi najznačajniji EA i njihovi epimeri: ergometrin, ergometrinin, ergozin, ergozinin, ergokornin, ergokorninin, ergokriptin, ergokriptinin, ergotamin, ergotaminin, ergokristin i ergokristinin.

Rezultati analiza neobrađene raži žetve 2016. godine utvrdili su najčešće prisustvo ergometrina (u 70 % uzoraka) te ergokristina, ergokristinina, ergozina i ergozinina (65 %), dok su ergokriptinin, ergometrinin i ergotaminin bili najrjeđe detektirani EA (45 %)(**Tablica 5**). Usporedbom suma koncentracija pojedinih EA u neobrađenoj raži utvrđena je najviša pojedinačna suma koncentracija kod ergometrina ( $982 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), pa ergozina ( $795 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i ergokristina ( $545 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Najmanja suma koncentracija detektirana je kod ergotaminina ( $42 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), pa ergometrinina ( $63 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i ergokorninina ( $91 \mu\text{g kg}^{-1}$ )(**Tablica 5**). Rezultati analiza frakcija mljevenja raži koje su se koristile kao sirovine za pripremu proizvoda od raži detektirali su prisustvo bar jednog EA u svim uzorcima raženog brašna i ražene krupice te u 90 % uzoraka raženih mekinja. Najviše ukupnih EA izmjereno je u raženoj krupici ( $19005 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), zatim u raženim mekinjama ( $7142 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najmanje u raženom brašnu ( $4736 \mu\text{g kg}^{-1}$ )(**Tablica 8, Tablica 9, Tablica 10**). Ergometrin je bio najzastupljeniji EA u svim frakcijama mljevenja raži, dok je ergokornin bio najrjeđe zastupljen. Najviša koncentracija ergometrina izmjerena je u raženoj krupici ( $2982 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najniža u raženom brašnu ( $973 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Postoji više publiciranih istraživanja o pojavnosti EA u raži i proizvodima od raži u Europi i svijetu (Bürk i sur. 2006; Appelt i Ellner, 2009; Blaney i sur. 2009; Crews i sur. 2009; Bryła i sur. 2015; EFSA, 2017), a prisutnost najznačajnijih vrsta se razlikuje. U većem broju istraživanja se najčešće spominje prisustvo ergotamina i ergozina u raži i proizvodima od raži, što nije u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Tako su rezultati istraživanja Blaney i suradnika (2009) o prisustvu EA u raži u Australiji detektirali najčešće prisustvo ergotamina, a slijede ga ergokriptin, ergokornin i ergozin. Ergotamin i ergozin su uz ergokristin bili najzastupljeniji EA u raži u centralnoj Europi (Scott i sur. 2009), a u Njemačkoj u proizvodima od raži (Malysheva i sur. 2014). Istraživanje Bryła i suradnika (2015) obuhvatilo je 65 uzoraka neobrađene raži, raženog brašna i raženih mekinja. Analize su utvrdile prisustvo EA u 83 % uzoraka neobrađene raži, 94 % raženog brašna i 100% raženih mekinja. Ergotamin i ergozin su uz ergokornin bili najzastupljeniji EA, dok je ergometrinin bio zastupljen u najmanjem broju uzoraka. Slični rezultati su dobiveni i u ovom istraživanju gdje su više koncentracije EA detektirane u krupici i mekinjama u odnosu na brašno (**Slika 29, Slika 30; Tablica 8, Tablica 9, Tablica 10**). Rezultati analiza 34 uzoraka raženog brašna uzorkovanih u Danskoj u razdoblju do 2000. do 2005. godine utvrdili su prisustvo ergotamina, ergokristina, ergometrina, ergokornina, ergokriptina i njihovih epimera. Ovi mikotoksini su detektirani u 94 % uzoraka brašna s prosječnom koncentracijom  $46 \mu\text{g kg}^{-1}$  do maksimalnih  $234 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Storm i sur. 2008). Müller i suradnici (2009) su proveli istraživanje na 39 uzoraka raži i proizvoda od raži, pri čemu su praćeni svi najznačajniji EA. Najviše ukupnih EA izmjereno je u raženom brašnu ( $714 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i grubo mljevenoj raži ( $740 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a ergokristin i ergotamin su bili prisutni u



najvišim koncentracijama. Ergokristin je također bio najprisutniji EA u raži s prosječnom koncentracijom  $54,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , dok prisutnost ergotamina nije bila tako značajna (prosječna koncentracija iznosila je  $20,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

U Europi su prema posljednjem EFSA-inom izvješću (EFSA, 2017), ergotamin, ergokristin i ergozin najčešće detektirani EA u neobrađenim žitaricama i u hrani, dok su ergokorninin i ergometrinin najrjeđe detektirani. U starijem EFSA-inom izvješću (EFSA, 2012), ergokornin je uz ergotamin, ergokristin i ergozin bio najčešće prisutan EA u hrani i hrani za životinje.

## 5.2. Pojavnost ergot alkaloida ovisno o načinu proizvodnje raži

Ovim istraživanjem obuhvaćeni su svi ekološki i konvencionalni proizvođači raži u RH u 2016. godini, a analizom rezultata istraživanja utvrđeno je prisustvo bar jednog EA u 66,7 % uzoraka ekološki proizvedene raži i 71,4 % uzoraka konvencionalno proizvedene raži (**Tablica 5**). Srednja vrijednost ukupnih EA kod ekološki proizvedene raži iznosila je  $175 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a kod konvencionalno proizvedene raži  $224 \mu\text{g kg}^{-1}$  (**Tablica 6**). Pojedinačna maksimalna koncentracija EA u ekološki proizvedenoj raži izmjerena je kod ergokriptina ( $68 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a u konvencionalno proizvedenoj raži kod ergometrina ( $217 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (**Tablica 5**). Rezultati provedenih analiza upućuju na zaključak kako način proizvodnje raži ne utječe na pojavnost EA. Međutim, iako su ovim istraživanjem obuhvaćeni svi uzorci raži iz 2016. godine, njihov broj je bio mali, pa bi za donošenje vjerodostojnijeg zaključka trebalo provesti novo istraživanje na reprezentativnijem broju uzoraka. U tom slučaju, istraživanje bi trebalo obuhvaćati osim EA i ostale važnije mikotoksine, sorte raži te vremenske uvijete kako bi se dobila sveobuhvatnija slika.

Postoji mali broj istraživanja o utjecaju načina proizvodnje raži na pojavnost EA, a ona koja postoje se razlikuju u zaključcima. Naime, rezultati istraživanja Klug i suradnika (1988) te Storm i suradnika (2008) doveli su do zaključka koje je u skladu sa zaključkom ovog istraživanja. U istraživanju Klug i suradnika (1988) o prisustvu EA u proizvodima na bazi žitarica detektirano je prisustvo EA u 58 % konvencionalnih i 37,5 % ekoloških proizvoda od raži te su rezultati analiza upućivali da među proizvodima ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama EA. Istraživanje koje su proveli Storm i suradnici (2008) obuhvaćalo je 34 uzoraka raženog brašna, od kojih je 17 bilo iz ekološke proizvodnje a ostalih 17 iz konvencionalne proizvodnje. EA su detektirani u 94 % analiziranih uzoraka, pri čemu su ergotamin i ergokriptin bili najčešće detektirani EA. Pokazalo se da je raspodjela između pojedinačnih EA vrlo varijabilna bez obzira na način proizvodnje jer su neki uzorci sadržavali sve EA, dok su drugi sadržavali samo nekoliko vrsta. Srednja vrijednost ukupnih EA kod ekološki proizvedenih uzoraka raži iznosila je  $32 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a kod konvencionalno proizvedenih uzoraka raži  $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Također, rezultati višegodišnjih istraživanja o prisustvu fuzarijskih mikotoksina u organskom i konvencionalnom proizvedenom ječmu (Edwards, 2009), ozimom pšenici (Karlsson i sur. 2017) i proizvodima na bazi žitarica (Jestoi i sur. 2004) utvrdili su kako poljoprivredna praksa nema utjecaja na intenzitet kontaminacije žitarica mikotoksinima.

Međutim, prema drugim autorima (Lauber i sur. 2005; Malysheva i sur. 2014), način proizvodnje žitarica ima utjecaja na pojavnost EA. Rezultati istraživanja Malysheve i suradnika (2014) koje je obuhvatilo 342 uzorka žitarica i proizvoda od žitarica detektirali su znatno više koncentracije EA u konvencionalno proizvedenim žitaricama u odnosu na ekološki proizvedene žitarice. Za konvencionalno proizvedene žitarice najveća koncentracija ukupnih EA iznosila je  $591 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a srednja vrijednost  $89 \mu\text{g kg}^{-1}$ , za razliku od ekološki proizvedenih žitarica gdje je zabilježena znatno niža ukupna koncentracija EA ( $72 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i srednja vrijednost od  $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Rezultati ranije provedenog istraživanja (Lauber i sur. 2005) također su utvrdili znatno niže koncentracije EA u ekološki proizvedenoj raži u odnosu na konvencionalno proizvedenu raž. Kao moguće objašnjenje Lauber i suradnici (2005) su naveli kako prema nekim smjernicama udruga koje se bave ekološkom proizvodnjom, hibridne vrste se ne preporučuju/dopuštaju za sjetvu jer su osjetljivije na infekciju *Clavicepsom*.

### 5.3. Vremenske prilike tijekom proizvodnje raži

Prema (Mainka i sur. 2007; Haarmann i sur. 2009; Appelt i Ellner, 2009; Coufal-Majewski i sur. 2016; Grusie i sur. 2017) na prevalenciju i intenzitet kontaminacije biljke EA uvelike utječu vremenski uvjeti, geografska regija, vrsta biljke i vrsta gljivica koja inficira biljku. Raž karakterizira križno oprašivanje s velikim otvorenim cvjetovima, što je čini posebno osjetljivom na infekciju gljivicom *C. purpurea* koja može rasti u širokom rasponu temperatura (Tittlemier i sur. 2015). Stoga je tijekom istraživanja praćena temperatura i količina oborina na području/županijama gdje je raž proizvedena. Praćenje vremenskih prilika obuhvaćalo je razdoblje od cvatnje raži (svibanj, lipanj), pa do žetve (srpanj) jer je poznato da su žitarice najpodložnije infekciji plijesnima u vrijeme cvatnje (Tittlemier i sur. 2015; Miedaner i Geiger, 2015; Grusie i sur. 2017; Likar i sur. 2018). Ukoliko su u to vrijeme prisutni hladni i kišni vremenski uvjeti, te je površina tla vlažna, dolazi do kontaminacije EA (Menzies i Turkington, 2014; Miedaner i Geiger, 2015; Grusie i sur. 2017; Likar i sur. 2018). Prema Dewell i Ensley (2014), idealni vremenski uvjeti za razvoj gljivica koje proizvode EA su hladno, vlažno proljeće praćeno visokim temperaturama početkom ljeta. Krska i Crews (2008) ističu kako su EA sveprisutni, te da prevalencija vrste ovisi o vremenskim uvjetima, a posebno je izražena u razdobljima jačih kiša i vlažnog tla. Nasuprot tome, Appelt i Ellner (2009) navode da nema dovoljno saznanja o utjecaju vremenskih uvjeta na produkciju EA te su potrebna daljnja detaljna istraživanja.

Budući da je ovim istraživanjem obuhvaćena samo jedna godina, raspoloživi podaci o prisutnosti EA i vremenskim uvjetima nisu bili dovoljni da bi se mogao donijeti zaključak o utjecaju vremenskih prilika na prisustvo EA u raži. Stoga se u budućnosti preporuča provođenje višegodišnjeg istraživanja (minimalno tri godine, na većem broju sorata i lokacija).

Mainka i suradnici (2007) su nakon dvogodišnjeg praćenja utjecaja vremenskih prilika na kontaminaciju raži EA došli do istog zaključka. Naime, njihovo istraživanje obuhvaćalo je mali broj uzoraka čiji su rezultati upućivali na zaključak kako ne postoji razlika u kontaminaciji raži EA između dvije godine s različitim vremenskim prilikama.

Kako bi se spriječila kontaminacija usjeva EA, postoji niz različitih strategija koje uključuju sjetvu sjemena bez sklerocija, plodored, duboko zaoravanje žetvenih ostataka, suzbijanje alternativnih domaćina (korovi), optimalno vrijeme sjetve. Međutim, nije otkrivena niti jedna od kontrolnih mjera koja se pokazala potpuno uspješnom u kontroli kontaminacije EA. Kao posljedica toga, proizvođači bi uvijek trebali pristupiti problemu kontaminacije EA kao integriranom procesu sa strategijama koje su usmjerene na sve komponente ove bolesti (Menzies i Turkington, 2014).

#### **5.4. Utjecaj tehnoloških postupaka na prisutnost ergot alkaloida**

Tehnološki postupci koji se koriste za preradu žitarica u finalni proizvod a koji mogu imati učinak na mikotoksine uključuju sortiranje, čišćenje, mljevenje, kuhanje, pečenje, prženje, konzerviranje, blanširanje i ekstruziju. Većina tehnoloških postupaka ima različite učinke na mikotoksine, a oni koji koriste najviše temperature najčešće pokazuju najveći učinak (Karlovsy i sur. 2016). Tako postupci prženja i ekstruzije imaju veliki potencijal za smanjenje koncentracije mikotoksina, iako su potrebne vrlo visoke temperature da bi se postiglo veliko smanjenje koncentracija mikotoksina (Bullerman i Bianchini, 2007). Fizički postupci koji prethode mljevenju također mogu biti vrlo učinkoviti; ručno sortiranje žitarica, orašastih plodova i plodova od strane poljoprivrednika kao i automatsko sortiranje od strane industrije znatno smanjuje sadržaj mikotoksina. Daljnja obrada kao što je mljevenje, namakanje i ekstruzija također mogu smanjiti sadržaj mikotoksina (Karlovsy i sur. 2016). Općenito, procesiranjem hrane može doći do oslobađanja modificiranih oblika mikotoksina (vezanih za druge biomolekule koje ih maskiraju poput glukoze, sulfata, masnih kiselina ili zarobljenih u škrobnoj strukturi), ili može doći do redukcije uslijed degradacije molekula mikotoksina na najčešće manje toksične produkte, koncentriranja u nusproizvodima koji se ne koriste za hranu (voda od kuhanja tjestenine, voda za proizvodnju slada) ili vezanja za biomolekule u maskirani oblik (Bryła i sur. 2014; Generotti i sur. 2017; Kovač i sur. 2018; Mastanjević i sur. 2018a; 2018b).

##### **5.4.1. Mljevenje**

Mljevenje žitarica je postupak kojim se nikako ne mogu ukloniti mikotoksini iz žitarica, već samo dolazi do raspodjele mikotoksina po određenim mlinskim frakcijama. Prema nekim autorima (Bullerman i Bianchini, 2007; Karlovsy i sur. 2016), postupkom suhog mljevenja pšenice, ječma, kukuruza i ostalih žitarica, mikotoksini se najčešće koncentriraju u frakcijama mekinja i klica, koji se dalje koriste kao hrana za životinje ili za dobivanje ulja, dok se najmanje mikotoksina nađe u brašnu. Prema Kushiro (2008) mljevenjem pšenice najveći udio DON-a se zadrži u mekinjama, dok u manjim količinama zaostaje u brašnu. Slični rezultati se navode za ZON u kontaminiranom mljevenom kukuruzu (Kushiro, 2008). Fajarado i suradnici (1995) su proveli istraživanje s većim

brojem frakcija mljevenja pšenice, a najviše količine EA izmjerene su u frakciji krupice (promjer čestica  $<1600 \mu\text{m}$  i  $>250 \mu\text{m}$ ), manje kod mekinja ( $>1600 \mu\text{m}$ ), a najmanje kod brašna ( $<250 \mu\text{m}$ ). Autori objašnjavaju kako su ES plastičniji od tvrdog zrna pšenice te se tijekom mljevenja spljošte pa se ne uspiju odvojiti s mekinjama.

Rezultati ovog istraživanja su u skladu s rezultatima istraživanja Fajando i suradnika (1995). Naime, utvrđeno je kako se mljevenjem raži najviše ukupnih EA zadržalo u raženoj krupici (oko 62 % ukupnih EA, uz pretpostavku da se mljevenjem raži 100 % EA raspodijelilo u frakcije mljevenja), znatno manje u raženim mekinjama (oko 23 % ukupnih EA), a najmanje u raženom brašnu (oko 15 % ukupnih EA) (**Slika 29**). Za pretpostaviti je da je tijekom mljevenja raži došlo do najveće raspodjele ES u raženoj krupici ili je krupica bila najviše kontaminirana prašinom iz ES koja je nastala tijekom mljevenja zbog specifične plastičnosti ES. Zbog tog fizikalnog svojstva ES se teže lome u fine čestice brašna, i češće ih nađemo u krupnijim frakcijama krupice te su sukladno tome najviše nađene u krupici i mekinjama, frakcijama koje zadržavaju teže lomljive i plastičnije dijelove zrna. Rezultati istraživanja Wolff i suradnika (1983) su za razliku od rezultata ovog istraživanja, utvrdili veću kontaminaciju raženog brašna EA u odnosu na ražene mekinje. Međutim, njihovo istraživanje nije uključivalo krupicu, a analize su pokazale da je 20 - 30 % ukupnih EA zaostalo u raženim mekinjama, a 60 - 70 % u raženom brašnu. Može se pretpostaviti da je krupica bila uključena u brašno. Ako se u našem istraživanju zbroje EA u krupici i brašnu i usporede s rezultatima Wolffa i suradnika (1983) dobiju se slični rezultati. Rezultati istraživanja Tittlemier i suradnika (2019) utvrdili su da oko 84% ukupnih EA u durum pšenici zaostaje u mekinjama koje sadrže vanjsku ovojnica jezgre, a ergokristin, ergokristinin i ergotamin su bili najčešće prisutni EA u frakcijama mljevenja i u špagetima. Naime, ergokristin je bio dominantan u cijelom zrnu i drugim frakcijama mljevenja, u rasponu od 37–55 % ukupnih EA, a ergotamin se kretao u rasponu od 10–14 % ukupnih EA u cijelom zrnu i svim frakcijama mljevenja. U ovom istraživanju udio ergokristina je u proizvodima mljevenja bio u rasponu od 6,90 % u krupici do 11,9 % u mekinjama i 17 % u brašnu, a udio ergotamina je bio znatno manji nego u spomenutom istraživanju (Tittlemier i sur. 2019)(od 3,4 % u mekinjama do 5,6 % u brašnu i krupici) (**Tablica 8, Tablica 9, Tablica 10**). Razlike u udjelima pojedinih EA moguće su zbog specifične podvrste *C. purpurea*, klimatskih uvjeta tijekom rasta te interakcije s mikroflorom na kojoj je sama raž rasla. Poznato je kako čišćenje i mljevenje zrna uklanja većinu ES koji bi dospjeli u brašno (Scott i Lawrence, 1980; Malysheva i sur. 2014). Iako fizičke metode mogu smanjiti kontaminaciju mikotoksinima, udio redukcije ovisi o mikotoksinu, sirovini i korištenoj metodi (Fratamico i sur. 2005). Neki autori (Franzmann i sur. 2011; Karlovsky i sur. 2016) navode da mljevenjem dolazi do drugačije raspodjele svakog pojedinačnog EA u različitim frakcijama mljevenja. Kao glavni problem ističu prašinu iz ES koja se ne može učinkovito ukloniti tijekom čišćenja žitarica. U ovom istraživanju, ES su nakon vizualne detekcije u uzorcima neobrađene raži vraćeni nazad u uzorak te samljeveni s ostatkom raži, a rezultati su utvrdili da je raspodjela pojedinačnih EA u različitim frakcijama mljevenja bila većinom podjednaka (**Tablica 8, Tablica 9, Tablica 10**). U ovom istraživanju je također zabilježena pojavnost EA iako nije bilo vidljive kontaminacije s ES, najvjerojatnije zbog prašine ES koja je bogata EA. To je još jedan od

argumenata zbog čega bi se legislativa trebala više bazirati na konkretnim EA umjesto dosadašnjih ES.

#### 5.4.2. Fermentacija

Utjecaj fermentacije tijesta na stabilnost mikotoksina proučavalo je više autora. Prema Karlovsky i suradnicima (2016), fermentacija ne utječe na stabilnost mikotoksina kao što su fumonizini i neki trihoteceni, dok su Samar i suradnici (2001) utvrdili da tijekom fermentacije tijesta za kruh na 50 °C dolazi do redukcije DON-a od 41 % do 56 % ovisno o vrsti kruha.

Kako bi u ovom istraživanju utvrdili utjecaj fermentacije na redukciju EA napravljen je zamjes tijesta za kruh direktnim i indirektnim postupkom. Kod direktnog postupka kao sredstvo za dizanje koristio se pekarski kvasac, a kod indirektnog postupka kao sredstvo za dizanje upotrijebljeno je kiselo tijesto koje je prije zamjesa krušnog tijesta podvrgnuto fermentaciji u trajanju 24 h pri 37 °C.

Rezultati analiza tijesta za kruhove proizvedene različitim načinima zamjesa utvrdili su da je kod oba postupka došlo do redukcije EA za 18 % u odnosu na raženo brašno, što dovodi do zaključka da način zamjesa i trajanje fermentacije ne utječu na redukciju EA, što je u skladu s zaključcima drugih autora (Fajardo i sur. 1995; EFSA, 2012). Može se pretpostaviti da je do redukcije došlo uslijed vezanja EA za stanice kvasca (Pfliegler i sur. 2015; Merrill i sur. 2007) ili laktobacila (Franco i sur. 2011), kao što je bio slučaj s drugim mikotoksinima (Karlovsky i sur. 2016). Drugi mogući razlog mogao bi biti vezanje EA u škrobnu strukturu i maskiranje na sličan način kao kod fumonizina (Berthiller i sur. 2013; Bryła i sur. 2014; Kovač i sur. 2018).

Rezultati istraživanja Meleard (2016) su također utvrdili kako tijekom pripreme tijesta za francuski kruh dolazi do redukcije EA iz brašna u tijesto za kruh za 30 %, a kao razlog redukcije autor navodi efekt razrjeđivanja brašna s vodom tijekom zamjesa tijesta. U ovom istraživanju uklonjena je mogućnost utjecaja razrjeđivanja s vodom zbog izražavanja rezultata na suhu tvar. Kada se rezultati izraze u  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , bez korekcije za sadržaj vode, uočava se podjednaka redukcija kao i kod Melearda (2016).

Rezultati analiza tijesta za kruhove proizvedene različitim načinima zamjesa također su utvrdili da su kod obje vrste zamjesa najviše ukupne koncentracije pojedinih EA izmjerene kod ergometrina ( $605 \mu\text{g kg}^{-1}$  kod direktnog i  $540 \mu\text{g kg}^{-1}$  kod indirektnog zamjesa), a najmanje kod ergokriptinina ( $18,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  kod direktnog i  $20,1 \mu\text{g kg}^{-1}$  kod indirektnog zamjesa) (**Tablica 11, Tablica 12**). Usporedbom koncentracija ukupnih EA kod tijesta proizvedenih različitim načinom zamjesa utvrđena je neznatno viša koncentracija ukupnih EA kod tijesta proizvedenih direktnim postupkom zamjesa ( $1982 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) u odnosu na tijesta proizvedena indirektnim postupkom zamjesa ( $1913 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (**Tablica 11, Tablica 12**). Najveća koncentracija ukupnih EA kod obje vrste tijesta izmjerena je u uzorku 10, a najmanja u uzorku 9, što odgovara rezultatima ukupnih EA u brašnima korištenim za proizvodnju tijesta za kruh (**Slika 31**).

### 5.4.3. Ekstruzija

Ekstruzija je posljednjih godina postala nezaobilazan proces u proizvodnji hrane zbog svoje višestruke primjene, energetske učinkovitosti i minimalnih gubitaka korisnih sastojaka hrane (Cetin i Bullerman; 2005; Stažić, 2017). Ovo istraživanje je prvo koje se bavi promjenama EA tijekom ekstruzije, dok su se ostala istraživanja bavila ostalim mikotoksinima. Također se pokazala učinkovitom za redukciju i smanjenje toksičnosti mikotoksina u proizvodima na bazi žitarica, a kao razlog navodi se upotreba visoke temperature tijekom ekstruzije (od 150 °C ili više) (Ryu i sur. 2019). Utvrđeno je kako ekstruzija dovodi do 40–43% redukcije OTA u zobnim pahuljicama te 78-82 % u rižinom brašnu. Povećanjem pH vrijednosti tj. dodatkom sode bikarbone, udio redukcije je veći (65 % kod zobi i 72 % kod raži)(Ryu i sur. 2019). Kushiro (2008) ističe kako ekstruzijom kukuruza dolazi do redukcije fumonizina, AF-a i ZEN-a za 100, 95 i 83 %, dok je za DON, OTA i moniliformin zabilježena redukcija od 55, 40 i 30 %.

Prema autorima (Castells i sur. 2005; Bullerman i Bianchini, 2007) na redukciju mikotoksina u gotovom proizvodu utječu temperature u ekstruderu, vrijeme zadržavanja u ekstruderu, sadržaj vlage u ekstruzijskoj smjesi, brzina vijka i početna koncentracija mikotoksina. Bullerman i Bianchini (2007) također navode da je učinak ekstruzije na sadržaj AF najvjerojatnije i pod utjecajem prisutnosti ili odsutnosti aditiva, a da najveći učinak na redukciju mikotoksina imaju temperatura ekstruzije i vrijeme zadržavanja u ekstruderu. Tako npr. samo ekstruzija smanjuje količinu AF za 50–80 %, a uz dodatak amonijaka; kao hidroksid (0,7 i 1,0 %) ili bikarbonat (0,4 %), dolazi do redukcije AF iznad 95 % (Bullerman i Bianchini, 2007). Kushiro i suradnici (2008) su utvrdili kako prisutnost natrijevog bisulfata tijekom ekstruzije dovodi do smanjenja DON-a u pšenici za 62 %. U slučaju fumonizina, na učinak ekstruzije utječe prisutnost aditiva, reducirajućih šećera i natrij klorida (Kovač i sur. 2018). Istraživanja pokazuju da do najveće redukcije fumonizina tijekom ekstruzije dolazi u prisutnosti glukoze na temperaturi od 160 °C ili višoj (Kovač i sur. 2018).

Kako bi u ovom istraživanju odredili utjecaj ekstruzije na redukciju EA, od ražene krupice proizvedena je tjestenina, a od raženih mekinja snack proizvodi. Za proizvodnju tjestenine korištena su dva načina oblikovanja. Kod konvencionalne tjestenine oblikovanje se vršilo ručno, a kod ekstrudirane tjestenine za oblikovanje se koristio ekstruder uz temperaturni režim od 35 i 40 °C. Za proizvodnju snack proizvoda koristili su se različiti udjeli raženih mekinja (10 % i 20 %) te jednopužni ekstruder uz temperaturni režim 135 °C i 170 °C.

#### 5.4.3.1. Tjestenina

Nakon izračuna i usporedbe koncentracija ukupnih EA u krupici i tjestenini vidljivo je da je kod tjestenine dobivene na konvencionalan način došlo do redukcije EA za 48 % u odnosu na raženu krupicu, dok je u ekstrudiranoj tjestenini došlo do povećanja koncentracije EA za 46 % u odnosu na raženu krupicu (**Slika 33**) što upućuje na pretpostavku da je prilikom ekstruzije došlo do otpuštanja EA koji su bili fizički zarobljeni u škrobnoj strukturi, kao što je bio slučaj s fumonizina tijekom pripreme kruha (Bryła i sur.

2014). Fumonizini se u hrani mogu vezati s ugljikohidratima (škrob), proteinima ili masnim kiselinama u maskirane komplekse čija je identifikacija i kvantifikacija blokirana ili nedostupna. Učinak maskiranja može se smatrati fizičkim zarobljavanjem molekula mikotoksina, a do zarobljavanja može lako doći već u zrnu ili toplinski neprerađenim proizvodima. Odgovarajući uvjeti (npr. pH, temperatura) mogu dovesti do oslobađanja fumonizina iz kompleksa te je moguće primijeniti konvencionalnu analitičku metodu za njegovu identifikaciju (Bryła i sur. 2014). Rezultati starijeg istraživanja (Fajardo i sur. 1995) također su utvrdili da kod rezanaca i špageta proizvedenih na konvencionalan način dolazi do redukcije EA (11-46 % tj. 20-42 %) u odnosu na durum brašno od kojeg su proizvedeni. Međutim, prilikom zamjesa rezanaca dodana je sol, što u ovom istraživanju nije bio slučaj.

Ergometrin je kao i kod ražene krupice ostao EA s najvišom ukupnom koncentracijom u konvencionalnoj ( $1370 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) i ekstrudiranoj tjestenini ( $6778 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (**Tablica 13**, **Tablica 14**). Nasuprot tome, ergokorninin je ostao kao i kod ražene krupice EA s najmanjom ukupnom koncentracijom kod ekstrudirane tjestenine ( $85,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) za razliku od konvencionalne tjestenine gdje je ergokriptinin bio EA s najmanjom ukupnom koncentracijom ( $24,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (**Tablica 13**, **Tablica 14**). Usporedbom koncentracija ukupnih EA u uzorcima tjestenina proizvedenih na konvencionalan način i ekstrudiranih tjestenina, utvrđeno je da je najveća koncentracija ukupnih EA izmjerena u uzorku 10, a najmanja u uzorku 9, što je utvrđeno i kod istih uzoraka krupica korištenih za proizvodnju tjestenine (**Slika 33**).

#### 5.4.3.2. Snack proizvod

Kod ekstruzije snack proizvoda s 10 % i 20 % raženih mekinja koristio se znatno viši temperaturni režim ( $135 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $170 \text{ }^\circ\text{C}$ ) nego kod tjestenine. Nakon izračuna i usporedbe koncentracija ukupnih EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja vidljivo je da je kod obje vrste snack proizvoda došlo do povećanja koncentracije ukupnih EA (**Slika 35**). To povećanje kod snack proizvoda s 10 % mekinja iznosilo je 68 % , a kod snack proizvoda s 20 % mekinja 156 % u odnosu na mekinje. Prilikom izračuna utvrđeno je da je kod tri uzorka snack proizvoda s 10 % i 20 % raženih mekinja (uzorci 9, 12 i 13) došlo do zaostatka malih količina analita na igli autosamplera i vijku za prespajanje autosamplera i MS/MS-a, pa su ta tri uzorka izuzeta iz izračuna.

Za pretpostaviti je da je do povećanja koncentracije EA vjerojatno došlo uslijed otpuštanja EA koji su bili fizički zarobljeni u škrobnoj strukturi, kao što je bio slučaj s prethodno spomenutom ekstrudiranom tjesteninom. Međutim, u slučaju snack proizvoda to povećanje koncentracije EA je bilo znatno veće u odnosu na ekstrudiranu tjesteninu, što se može pripisati višem temperaturnom režimu kod ekstruzije snack proizvoda. Naime, prema Ryu i suradnicima (2019) temperatura iznad  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom ekstruzije dovodi do najveće redukcije mikotoksina. Prema Bullerman i Bianchini (2007) ta temperatura bi bila pogodna za dobru redukciju ZEN-a, umjerenu redukciju AF, promjenjivu do nisku redukciju DON i dobru redukciju fumonizina. Iz **Slike 35** je vidljivo da se povećanjem udjela raženih mekinja u snack proizvodima povećao i ukupni udio EA, ali da povećanje nije bilo proporcionalno.

Ergometrin je kao i kod raženih mekinja ostao EA s najvišom ukupnom koncentracijom u snack proizvodima s 10 % i 20 % mekinja ( $1102$  tj.  $2621 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (**Tablica 10, Tablica 15, Tablica 16**). Uspoređujući koncentracije ukupnih EA u uzorcima snack proizvoda s 10 % i 20 % raženih mekinja, utvrđeno je da je najveća koncentracija ukupnih EA izmjerena u uzorku 10, a najmanja u uzorku 9, što je utvrđeno i kod istih uzoraka mekinja korištenih za proizvodnju snack proizvoda (**Slika 35**).

#### 5.4.4. Kuhanje

Kako bi utvrdili utjecaj kuhanja na redukciju EA u raži, obje vrste tjestenina (konvencionalna i ekstrudirana) analizirane su prije i poslije kuhanja na prisustvo EA. Rezultati analiza utvrdili su da je ukupna količina EA veća u tjestenini prije kuhanja, pa se može zaključiti da kuhanjem dolazi do redukcije EA bez obzira na način oblikovanja tjestenine (**Slika 37, Slika 39**). Kuhanjem tjestenine proizvedene na konvencionalan način postotak redukcije bio je znatno veći (63 % u odnosu na raženu krupicu) nego kod kuhanja ekstrudirane tjestenine (26 % u odnosu na raženu krupicu). Za pretpostaviti je kako proizvodnja tjestenine na konvencionalan način uzrokuje manje promjene u škrobnoj strukturi u odnosu na proizvodnju tj. oblikovanje u ekstruderu, zbog čega je tijesto kod konvencionalno proizvedene tjestenine poroznije pa ima više gubitaka EA tijekom kuhanja. Također, neki EA (posebno oni iz skupine ergoklavina i jednostavnih derivata lizergične kiseline) su donekle topivi u vodi (EFSA, 2012) pa je pretpostavka kako je kuhanjem došlo do otapanja EA u vodu ili oslobađanja EA iz škrobne strukture u vodu.

Važno je napomenuti kako je prilikom računanja utvrđeno da je kod jednog uzorka ekstrudirane tjestenine (uzorak 9) došlo do zaostatka malih količina analita na igli autosamplera i vijku za prespajanje autosamplera i MS/MS-a (kao i kod snack proizvoda), pa je taj uzorak izuzet prilikom izračuna.

Da kuhanjem dolazi do redukcije EA potvrdili su i Fajardo i suradnici (1995). Naime, prema rezultatima njihovog istraživanja, redukcija ukupnih EA u kuhanim slanim rezancima kretala se u rasponu 47-49 %, a u kuhanim špagetima 42-79 %. Autori navode da do redukcije malog dijela EA dolazi zbog ispiranja EA u vodu za kuhanje te zaključuju kako su EA donekle toplinski osjetljivi, što ovisi o sadržaju EA u sirovini. U najnovijem istraživanju kojeg su proveli Tittlemier i suradnici (2019) nisu zabilježeni značajni gubici EA tijekom proizvodnje ili kuhanja špageta od durum pšenice. Međutim, došlo je do promjena pojavnosti pojedinih EA tijekom kuhanja. Tako u svježe ekstrudiranim špagetima dominiraju EA-*ini*, a u kuhanim špagetima i vodi za kuhanje njihovi epimeri (*-inini*), što u ovom istraživanju nije bilo slučaj (**Tablica 13, Tablica 14, Tablica 17, Tablica 18**).

Ergometrin je također nakon kuhanja obje vrste tjestenina ostao EA s najvišom ukupnom koncentracijom EA. Tako je u kuhanoj tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način izmjerena koncentracija od  $735 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a u kuhanoj ekstrudiranoj tjestenini  $4559 \mu\text{g kg}^{-1}$  (**Tablica 17, Tablica 18**). Ergokriptinin je kod tjestenine proizvedene na konvencionalan način također nakon kuhanja ostao EA s najmanjom ukupnom koncentracijom EA ( $4,80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Međutim, kod ekstrudirane tjestenine (prije kuhanja) ergokorninin je bio EA s



najmanjom ukupnom koncentracijom ( $85,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), dok je nakon kuhanja ergokriptinin bio EA s najmanjom ukupnom koncentracijom ( $62,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ )(**Tablica 17, Tablica 18**). Usporedbom koncentracija ukupnih EA u uzorcima kuhanih tjestenina proizvedenih na konvencionalan način i kuhanih ekstrudiranih tjestenina, utvrđeno je da je najveća koncentracija ukupnih EA izmjerena u uzorku 10, a najmanja u uzorku 9, što je u skladu s rezultatima analiza tjestenina prije kuhanja (**Slika 37, Slika 39**).

Prema Karlovsky i suradnicima (2016), topljivost mikotoksina u kipućoj vodi određuje stupanj izloženosti konzumenata ovoj vrsti kontaminanata, a ponajviše ovisi o fizikalnim svojstvima samog mikotoksina. Stoga će se polarniji mikotoksini (npr. DON) prije otopiti i reducirati vodom, a nepolarni (npr. ZEA, OTA) će ostati u hrani. Tako Kushiro (2008) navodi da je DON topiv u vodi te da kuhanjem tjestenine u većoj količini vode dolazi do redukcije DON-a (većina DON-a ostane u vodi za kuhanje), što je potvrđeno i rezultatima istraživanja Visconti i suradnika (2004). Prema Kushiru (2008), na stupanj redukcije DON-a kuhanjem utječu vrijeme i temperatura kuhanja, pH hrane, sastav hrane, prisutnost aditiva za hrani i drugi čimbenici. Brera i suradnici (2013) istaknuli su da je tijekom prve faze proizvodnje tjestenine (od pšeničnog zrna do krupice), redukcija DON-a iznosila 63 %, a u drugoj fazi proizvodnje (od krupice do kuhane tjestenine) 41 %. Ovi rezultati odnosili su se na tjesteninu proizvedenu u pilot postrojenju i nije poznat način oblikovanja tjestenine. U ovom istraživanju je tijekom prve faze proizvodnje obje vrste tjestenina došlo do redukcije EA za 61,5 % u odnosu na raženu krupicu, dok je u drugoj fazi proizvodnje konvencionalne tjestenine postotak redukcije bio neznatno viši nego tijekom prve faze (63 %) u odnosu na raženu krupicu. Također, tijekom druge faze proizvodnje ekstrudirane tjestenine došlo je do redukcije EA za 26 % u odnosu na raženu krupicu.

#### 5.4.5. Pečenje

Podaci o utjecaju pečenja na stabilnost EA su različiti. Autori nekih istraživanja (Scott i Lawrence, 1982; EFSA, 2012; Merkel i sur. 2012; Meleard, 2016) navode značajno smanjenje koncentracija EA nakon pečenja (iznad 50 %), dok drugi autori ističu prilično visoku stabilnost tijekom pečenja tj. samo neznatno smanjenje koncentracije EA (do 25 %)(Bürk i sur. 2006). Merkel i suradnici (2012) navode da pečenjem kolača dolazi do redukcije EA od 2-30 %, a Scott i Lawrence (1982) ističu kako pečenjem kruha od cjelovitog zrna dolazi do 100 %-tne redukcije EA, dok pečenjem raženog kruha dolazi do 66-85 % -tne redukcije EA. Prema posljednjem EFSA-inom znanstvenom mišljenju (EFSA, 2017), tijekom pečenja dolazi do redukcije EA u raženom kruhu za 54–85 %, a u pšeničnom kruhu za 0–100 %. Takve razlike mogu se objasniti nehomogenom raspodjelom EA unutar ES (Bryła i sur. 2019). Stoga je vrlo važno primijeniti odgovarajuće postupke poput čišćenja i sortiranja zrna od ES te prosijavanja brašna kako bi smanjili mogućnost kontaminacije sirovina EA.

Kako bi u ovom istraživanju utvrdili utjecaj pečenja na redukciju EA, od raženih brašna kontaminiranih EA zamiješeni su i ispečeni keksi i kruhovi s različitim postupcima zamjesa.

#### 5.4.5.1. Keks

Rezultati analiza tijesta za kekse i kekisa su utvrdili kako u niti jednom uzorku tijesta za kekse, pa posljedično ni u keksima, nije utvrđeno prisustvo niti jednog EA što upućuje na zaključak kako je tijekom zamjesa tijesta za kekse došlo do 100 %-tne redukcije EA (**Slika 41**). Važno je napomenuti kako su svi uzorci raženog brašna koji su se koristili za proizvodnju kekisa sadržavali bar jedan EA, a čak 50 % uzoraka raženog brašna je sadržavalo sve EA (**Tablica 8**). Za pretpostaviti je da je korištenje natrijeva hidrogenkarbonata (sode bikarbone) kao sredstva za dizanje tijesta razlog 100 %-tne redukcije EA u tijestu za keks (Generotti i sur. 2017). Naime, pH tijesta je važan faktor za stabilnost proizvoda. Za proizvodnju kekisa i krepera, pH tijesta se regulira prvenstveno sredstvima za dizanje pri čemu je važno koje sredstvo se koristi, kao i njegova koncentracija. Tako je istraživanje Stadlera i suradnika (2019) pokazalo da korištenje sode bikarbone ( $\text{NaHCO}_3$ ) kao sredstva za dizanje tijesta dovodi do veće redukcije DON-a, dok uporaba amonijev hidrogen karbonata ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) ne utječe na koncentraciju DON-a. To se može objasniti različitim pH vrijednostima tijesta koje proizlaze iz različitih kemijske prirode sredstava za dizanje. Soda bikarbona se često koristi u pekarskoj industriji kao sredstvo za dizanje, ali se može koristiti i za poboljšanje fizikalna svojstva ekspanziranih ekstrudiranih žitarica (Ryu i sur. 2019). Kod upotrebe sode bikarbone, pH je početno 8,5 i pečenjem se blago povećava do pH 9. U odsutnosti kiselih spojeva, soda bikarbona se toplinski pretvara u natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), vodu i ugljikov dioksid. Budući da je karbonatni ion ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) jača baza od hidrogenkarbonatnog iona ( $\text{HCO}_3^-$ ), toplinska razgradnja sode bikarbone dovodi do povećanja pH vrijednosti. Upotreba amonijev hidrogen karbonata kao sredstva za dizanje uzrokuje smanjenje pH od 8 u tijestu do 6–7 u pečenim kolačima. Smanjenje pH vrijednosti može se objasniti razgradnjom amonijev hidrogen karbonata u amonijak ( $\text{NH}_3$ ), ugljikov dioksid i vodu, koji će ispariti tijekom pečenja (Stadler i sur. 2019). Kushiro (2008) također spominje da prisustvo prehrambenih aditiva, kao što je amonijev hidrogen karbonat sadržan u tijestu, može biti razlog odstupanja oko redukcije DON-a tijekom pečenja kekisa ili kruha. Međutim, u ovom istraživanju je do redukcije EA došlo prije pečenja, pa je za pretpostaviti da je formulacija recepture utjecala na sposobnost izdvajanja mikotoksina koji utječu na mikrostrukturu kekisa, što Generotti i suradnici (2017) navode kao jedan od značajnih razloga smanjenja mikotoksina u konačnim proizvodima (osim pH tijesta i vremena pečenja).

#### 5.4.5.2. Kruh

Rezultati analiza tijesta za kruhove i kruhova doveli su do zaključka kako pečenjem kruhova nije došlo do redukcije, već do povećanja ukupnih EA (**Slika 43**, **Slika 45**). Kod kruha proizvedenog direktnim postupkom zamjesa povećanje je iznosilo 43 % u odnosu na raženo brašno, dok je kod kruha proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa povećanje iznosilo 5 % u odnosu na raženo brašno. Za pretpostaviti je kako je prilikom pečenja kruha došlo do otpuštanja EA koji su bili fizički zarobljeni u škrobnoj strukturi, kao što je bio slučaj s fumonizinima tijekom pripreme kruha (Bryła i sur. 2014). Prosječna vrijednost ukupnih EA u tijestu za kruh proizvedenom direktnim postupkom zamjesa bila

je približno jednaka prosječnoj vrijednosti ukupnih EA u tijestu za kruh proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa i iznosila je  $198 \mu\text{g kg}^{-1}$ , tj.  $191 \mu\text{g kg}^{-1}$  (**Tablica 11, Tablica 12**). Prosječna vrijednost ukupnih EA u kruhu proizvedenom direktnim postupkom zamjesa iznosila je  $443 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a u kruhu proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa  $299 \mu\text{g kg}^{-1}$  (**Tablica 19, Tablica 20**). Usporedbom koncentracija ukupnih EA u kruhu nakon direktnog i indirektnog zamjesa utvrđeno je da se direktnim postupkom zamjesa više EA zadržava u finalnom proizvodu i to u prosjeku 17 % (**Slika 47**). Stoga bi u budućnosti u slučaju kontaminacije raženog brašna EA preporučili proizvodnju kruha indirektnim postupkom zamjesa.

Prisustvo pojedinih EA u raznim pekarskim proizvodima ovisi o brojnim čimbenicima kao što su mjesto na kojem su uzgajane žitarice, tehnike prerade brašna i postupak pečenja (Bryła i sur. 2019). U ovom istraživanju je utvrđeno kako je ergometrin i nakon pečenja ostao EA s najvišom ukupnom koncentracijom u kruhu bez obzira na način zamjesa ( $2852 \mu\text{g kg}^{-1}$  kod direktnog zamjesa i  $1366 \mu\text{g kg}^{-1}$  kod indirektnog zamjesa) (**Tablica 19, Tablica 20**). Međutim, ergokriptinin nije ostao EA s najmanjom ukupnom koncentracijom u kruhu bez obzira na zamjes. Naime, kod pečenja kruha s direktnim zamjesom utvrđeno je da je ergokorninin EA s najmanjom ukupnom koncentracijom ( $28,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), dok je nakon pečenja kruha s indirektnim zamjesom ergokriptinin ostao EA s najmanjom ukupnom koncentracijom ( $27,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (**Tablica 19, Tablica 20**). U istraživanju provedenom 2016. godine (Meleard, 2016), ergometrin se navodi kao najstabilniji EA tijekom pečenja kruha za razliku od ergotamina koji se navodi kao puno nestabilniji od ergometrina. Usporedbom koncentracija ukupnih EA u 10 uzoraka kruha proizvedenih direktnim postupkom, utvrđeno je da je najveća koncentracija ukupnih EA izmjerena u uzorku 10, a najmanja u uzorku 9, što je identično kao kod uzoraka kruha proizvedenih indirektnim postupkom i uzoraka tijesta proizvedenih različitim zamjesima i brašna upotrijebljenim za proizvodnju kruha (**Slika 29, Slika 43, Slika 45**).

#### 5.4.6. Fermentacija i pečenje

Kruh je najreprezentativniji i najviše proučavan pekarski proizvod. Njegov proizvodni tijek podrazumijeva fermentaciju tijesta prije pečenja. Fermentacija i kasnije pečenje kruha mogu se odvijati pri različitim temperaturnim i vremenskim režimima.

Kako bi u ovom istraživanju utvrdili utjecaj fermentacije i pečenja na redukciju EA, ispečen je kruh od tijesta proizvedenog direktnim postupkom zamjesa i kruh od tijesta proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa. Nakon pečenja kruhovi su analizirani na prisustvo EA te su izmjerene koncentracije ukupnih EA uspoređene s koncentracijama ukupnih EA u brašnu koji je korišten za proizvodnju kruha. Usporedbom koncentracija ukupnih EA u brašnu i kruhovima od raženog brašna proizvedenih direktnim i indirektnim postupcima zamjesa zaključeno je da kod indirektnog postupka zamjesa tijesta fermentacijom i pečenjem dolazi do redukcije EA za 16 % (**Slika 49**) što je vjerojatno rezultat produljene fermentacije i kontakta sa staničnom stjenkom laktobacila koji mogu vezati i imobilizirati veliki broj mikotoksina (Shetty i Jespersen, 2006). Međutim, kod direktnog postupka zamjesa tijesta za kruh fermentacijom i pečenjem dolazi do povećanja koncentracije ukupnih EA u kruhu za 19 % (**Slika 49**) što se razlikuje od zaključka većine

autora. Povećanje koncentracije ukupnih EA kod direktnog postupka zamjesa je vjerojatno posljedica otpuštanja EA koji su bili fizički zarobljeni u škrobnoj strukturi, kao što je bio slučaj s fumonizinima tijekom pripreme kruha (Bryła i sur. 2014).

U najnovijem istraživanju (Bryła i sur. 2019) navedeno je kako su EA stabilni tijekom pripreme kiselog tijesta i tijesta za kruh; ali je primijećena značajna redukcija EA nakon termičke obrade (pečenja) raženog kruha. Tako je prosječna koncentracija EA pala za 22% tj. s  $3970 \pm 582 \mu\text{g kg}^{-1}$  u raženom brašnu na  $3090 \pm 144 \mu\text{g kg}^{-1}$  u pečenom raženom kruhu. Da pečenjem dolazi do redukcije EA potvrdilo je više autora koji su objavili radove na ovu temu. Friedman i Dao (1990) su naveli različite čimbenike koji mogu utjecati na opseg ovog pada: stabilnost pojedinog EA na povišenim temperaturama, veličinu kruha, recept za tijesto i međusobne interakcije između EA ili između EA i komponenti tijesta. Stope redukcije koje navode razni autori spadaju u prilično široke raspone: 54–85% (raženi kruh, Scott, 2009), 20–74% (raženi kruh, Baumann i sur. 1985), 0–100% (pšenični kruh, Scott, 2009), 50% (Wolff i sur. 1988), 85 % (Scott i Lawrence, 1982), 25–55% (Fajardo i sur. 1995.), 33–46% (Franzmann i sur. 2010) i 25% (peciva od raži, Bürk i sur. 2006.). Scott (2009) je istaknuo kako obično do veće redukcije EA dolazi u korici kruha u usporedbi s mrvicama, što potvrđuju i rezultati istraživanja Fajarda i suradnika (1995). Oni su naime izvijestili da je praćenjem koncentracija šest EA (ergometrin, ergozin, ergotamin, ergokornin, ergokriptin, ergokristin), u kori pečenog kruha utvrđena redukcija EA od 22 – 55 %, dok u unutrašnjosti kruha (mrvicama) nije došlo do redukcije EA (Fajardo i sur. 1995). Treba naglasiti da raspodjela temperature u kruhu tijekom pečenja obično nije jednolična te da je temperatura u središtu kruha (mrvicama) značajno niža od temperature kore i najčešće ne prelazi 100 °C (Bryła i sur. 2014), pa Fajardo i suradnici (1995) pretpostavljaju da je viša temperatura kore tijekom pečenja razlog veće redukcije EA u kori.

Rezultati istraživanja Meleard (2016) o utjecaju pečenja francuskog kruha na degradaciju i epimerizaciju EA su utvrdili da se tijekom pečenja francuskog kruha koncentracija EA u kruhu smanjila za 59 % u odnosu na brašno, što je znatno više od rezultata dobivenim u ovom istraživanju za ukupni učinak fermentacije i pečenja kruha proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa. Važno je napomenuti kako u istraživanju Meleard (2016) nije naveden način zamjesa tijesta. Isti autor je istaknuo kako je tijekom fermentacije tijesta došlo redukcije ukupnih EA iz brašna u tijesto za 30 %, te da je tijekom pečenja tijesta došlo redukcije ukupnih EA iz tijesta u kruh za 40 %. Ovi rezultati se razlikuju od rezultata ovog istraživanja gdje je fermentacijom došlo do redukcije ukupnih EA za 18 % u odnosu na raženo brašno bez obzira na način zamjesa, dok je pečenjem došlo do suprotnog učinka tj. povećanja koncentracije EA za 43 % u odnosu na raženo brašno kod direktnog postupka zamjesa tj. 5 % kod indirektnog zamjesa.

Poznato je da su EA skloni epimerizaciji te da je ona najčešće potaknuta promjenom temperature, pH ili izlaganjem svjetlu (EFSA, 2012; Tittlemier i sur. 2019). Epimerizacijom EA tijekom prerade zrna dolazi do smanjenja koncentracija EA što rezultira transformacijom (*R*)- epimera u njihove biološki neaktivne (*S*)- epimere, a ponekad može

doći i do obrnute reakcije (transformacija (S)- epimera u toksični (R) -epimer) (Bryła i sur. 2019).

Velik broj autora ustanovio je da termička obrada doprinosi smanjenju toksičnosti konačnog proizvoda jer dolazi do pomaka epimernog omjera prema (S)- epimerima, što nije sukladno rezultatima ovog istraživanja (**Slika 54**). Ovaj trend primijećen je tijekom proizvodnje raženog kruha i palačinki (Scott i Lawrence, 1982), raženog peciva (Bürk i sur. 2006.), orijentalnih rezanaca i špageta (Fajardo i sur. 1995.), piva (Schwarz i sur. 2007), kolača od raženog brašna (Merkel i sur. 2012) i raženog kruha (Baumann i sur. 1985). Potonji autori primijetili su smanjenje koncentracija (R) -epimera za 75% i povećanje koncentracija (S)- epimera za 31%. Franzmann i suradnici (2010) također navode da tijekom postupka pečenja dolazi do redukcije ukupnih EA, pa je nakon 60 min pečenja stupanj redukcije iznosio 70 %, dok je koncentracija (S)- epimera porasla za 96 %. Ukupni doprinos (S)- epimera povećao se s 15 % u raženom brašnu na 54 % u finalnom proizvodu. Isti autori su također istaknuli ovisnost kiselosti tijesta za kruh na epimerizaciju EA tijekom postupka pečenja kruha. Naime, utvrđeno je da su EA manje sklone epimerizaciji tijekom pečenja kruha koje je proizvedeno na bazi kiselog tijesta (indirektnim postupkom zamjesa tijesta)(Franzmann i sur. 2010). Rezultati najnovijeg istraživanja (Bryła i sur. 2019) pokazuju malo veću stabilnost EA tijekom pečenja kruha od one navedene u podacima iz prethodne literature. Autori (Bryła i sur. 2019) navode kako se pečenjem kruha koncentracija (R)- epimera smanjuje za 46 %, dok se koncentracija (S)- epimera povećava za 21 %. Tijekom fermentacije nije bilo većih promjena u omjeru između (R)- i (S)- epimera. Bryła i suradnici (2019) pretpostavljaju kako je veća stabilnost EA vjerojatno rezultat niske pH vrijednosti kiselog tijesta koje je korišteno za zamjes tijesta.

Rezultati ovog istraživanja utvrdili su da su u raženom brašnu, mekinjama i krupici, te u svim poluproizvodima i proizvodima od raži prevladavali toksikološki značajniji (R)-epimeri, što je veći problem sa stajališta sigurnosti hrane. Kod svih tehnoloških postupaka nije primijećen značajan pomak epimerizacije prema (S)- epimerima, nego se u većini slučajeva omjer između (R)- i (S)- epimera povećavao u korist (R)- epimera. Uspoređujući omjere (R)- i (S)- epimera nakon pečenja kruhova proizvedenih različitim načinima zamjesa utvrđeno je da pečenjem kruhova bez obzira na način zamjesa nije došlo do pomicanja omjera prema (S)- epimeru, što prema literaturnim podacima nije bilo za očekivati. Nakon pečenja kruha proizvedenog direktnim postupkom zamjesa ukupni doprinos (S)- epimera smanjio s 23% u raženom brašnu na 15 % u kruhu, dok se nakon pečenja kruha proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa ukupni doprinos (S)-epimera neznatno smanjio (s 23% u raženom brašnu na 22 % u kruhu). Ovi rezultati su u skladu s navodom Franzmann i suradnika (2010) o manjoj sklonosti epimerizaciji EA tijekom pečenja kruha koji je proizveden indirektnim postupkom zamjesa. Merkel i suradnici (2012) su utvrdili da i tijekom pečenja kolačića dolazi do pomaka epimernog omjera prema (S)- epimeru, što u ovom istraživanju nije bilo moguće odrediti budući da su u svim uzorcima tijesta za keks, a posljedično i u keksima koncentracije svih EA bile ispod LOD vrijednosti. Međutim, tijekom fermentacije tijesta za kruh bez obzira na način zamjesa omjer između (R)- i (S)- epimera se smanjio (**Slika 54**), što nije u skladu s rezultatima istraživanjima drugih autora (Fajardo i sur. 1995; Bryła i sur. 2019). Tijekom

postupka ekstruzije dolazi do povećanja omjera između (*R*)- i (*S*)- epimera. Omjer je veći kod snack proizvoda s 10 % raženih mekinja nego kod u odnosu na snack proizvod s 20 % raženih mekinja.

Proizvodnjom ekstrudirane tjestenine i tjestenine proizvedene na konvencionalan način te kuhanjem tjestenine proizvedene na konvencionalan način također dolazi do povećanja omjera između (*R*)- i (*S*)- epimera, dok kuhanjem ekstrudirane tjestenine dolazi do smanjenja omjera između (*R*)- i (*S*)- epimera (**Slika 54**). Rezultati istraživanja Tittlemier i suradnika (2019) su utvrdili da su u suhoj tjestenini prevladavali (*R*)- epimeri, dok su u kuhanoj tjestenini prevladavali (*S*)- epimeri, što u ovom istraživanju nije bio slučaj. Kao što je ranije spomenuto, (*R*)- epimeri su prevladali kod obje vrste tjestenine prije i poslije kuhanja (**Tablica 13, Tablica 14, Tablica 17, Tablica 18**).

U ovom istraživanju po prvi puta do sada se sistematski pratio utjecaj pojedinih tehnoloških postupaka koji se koriste u procesiranju hrane na retenciju EA u finalnim proizvodima na bazi raži koje ljudi konzumiraju. Tehnološki postupci obuhvaćali su mljevenje, fermentaciju, ekstruziju, kuhanje i pečenje. Također, ovo je prvo istraživanje u kojem su se pratile promjene EA tijekom ekstruzije koja je postala nezaobilazan proces u prehrambenoj industriji. Rezultati analiza raženog brašna, raženih mekinja, ražene krupice te poluproizvoda i proizvoda od raži pokazali su da je najviša koncentracija ukupnih EA izmjerena u ekstrudiranoj tjestenini, a najniža u kuhanoj konvencionalnoj tjestenini (**Slika 52**). U svim uzorcima tijesta za keks i keksima koncentracije svih EA bile su ispod LOD vrijednosti.

Način fermentacije kruha nije značajno utjecao na redukciju EA iz brašna u tijesto za kruh (**Slika 31, Slika 52**). Proizvodnjom tjestenine na konvencionalan način došlo je do redukcije ukupnih EA iz krupice u tjesteninu, dok je kod proizvodnje ekstrudirane tjestenine došlo do povećanja koncentracije ukupnih EA iz krupice u tjesteninu (**Slika 33, Slika 52**). Ekstruzija je kod snack proizvoda također dovela do povećanja koncentracije ukupnih EA, a snack proizvod s većim udjelom mekinja je sadržavao više ukupnih EA (**Slika 35, Slika 52**). Kuhanje se pokazalo kao efikasan tehnološki postupak za redukciju EA. Kod kuhane tjestenine pripremljene na konvencionalan način učinak redukcije bio je znatno veći u odnosu na kuhanu ekstrudiranu tjesteninu (**Slika 37, Slika 39, Slika 52**). Pečenjem je došlo do povećanja koncentracije ukupnih EA u obje vrste kruha (**Slika 43, Slika 45, Slika 52**). Kod kruha proizvedenog direktnim postupkom zamjesa nakon pečenja je utvrđena znatno veća koncentracija EA nego kod kruha proizvedenog indirektnim postupkom zamjesa (**Slika 49, Slika 52**).

Rezultati ovog istraživanja doveli su do zaključka kako su proizvodnja keksa i pečenje keksa najučinkovitiji postupak redukcije EA, a slijede kuhanje pa fermentacija te fermentacija i pečenje. Nasuprot tome, pečenje bez fermentacije i ekstruzija dovode do povećanja koncentracija ukupnih EA. Dobiveni rezultati dali su detaljan uvid u raspodjelu EA iz sirovina u poluproizvode i proizvode od raži (**Slika 53**) te se može zaključiti da u slučajevima kada se utvrdi ili očekuje veća kontaminacija sirovina ovim mikotoksinima najsigurnije napraviti kekse od raženog brašna (prema recepturi navedenoj u ovom istraživanju, **Slika 24**) ili tjesteninu na konvencionalan način od ražene krupice. Također,

preporuča se izbjegavati proizvodnju ekstrudiranih proizvoda (snack, tjesteninu) i kruha direktnim postupkom zamjesa.

Ovi rezultati se u budućnosti mogu koristiti i u procjeni rizika konzumenata EA iz sirovina i poluproizvoda od raži, a ne samo iz finalnih proizvoda od raži. To ranije nije bilo moguće jer nisu bili poznati faktori konverzije EA iz sirovina u poluproizvode i finalne proizvode od raži tj. nije bilo poznato kako pojedini tehnološki postupci utječu na redukciju EA. Za kompletnu procjenu rizika potrebni su podaci o konzumaciji proizvoda od raži, koncentracijama pojedinih EA u proizvodima od raži te podaci o tehnološkim procesima koji se koriste u procesiranju proizvoda od raži, budući da je iz rezultata ovog istraživanja vidljivo da tehnološki procesi različito utječu na retenciju EA u finalnim proizvodima.

## **6. ZAKLJUČCI**



Na osnovu provedenog istraživanja mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Nema statistički značajne razlike u pojavnosti EA ovisno o načinu proizvodnje raži (konvencionalan ili ekološki).
2. Mljevenjem raži najveći udio EA se koncentrira u raženoj krupici (62 % ukupnih EA, uz pretpostavku da je mljevenjem 100 % EA iz neobrađene raži prešlo u frakcije raži), znatno manji u raženim mekinjama (23 %), a najmanji u raženom brašnu (15 % ukupnih EA).
3. Fermentacijom tijesta dolazi do redukcije ukupnih EA za 18 %. Način zamjesa tijesta i vrijeme fermentacije ne utječu na redukciju EA tijekom fermentacije.
4. Ekstruzijom dolazi do oslobađanja EA iz škrobnog matriksa što uzrokuje povećanje koncentracija EA u proizvodu.
5. Oblikovanje tjestenine ekstruzijom dovodi do povećanja koncentracije ukupnih EA u tjestenini za 46 %, dok oblikovanje tjestenine na konvencionalan način dovodi do redukcije ukupnih EA za 48 %.
6. Korištenjem ekstruzije pri proizvodnji snack proizvoda s 10 % i 20 % raženih mekinja dolazi do povećanja koncentracije ukupnih EA za oko 112 %. Povećanje udjela raženih mekinja u snack proizvodima nije proporcionalan s povećanjem koncentracije ukupnih EA.
7. Kuhanjem dolazi do redukcije EA. Kod kuhanja konvencionalne tjestenine postotak redukcije je znatno veći (63 %) u odnosu na kuhanje ekstrudirane tjestenine (26 %).
8. Fermentacijom i pečenjem dolazi do redukcije EA. Učinak redukcije je neznatno veći kod indirektnog postupka zamjesa (18 %) u odnosu na direktan postupak zamjesa (14 %).
9. Proizvodnja i pečenje keksa od raži je najefikasniji tehnološki postupak za redukciju EA.

## **7. LITERATURA**

- Andrašek I. 2017 Prijelaz ergot alkaloida iz raži u frakcije brašna i kruh. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Appelt M, Ellner FM. 2009. Investigations into the occurrence of alkaloids in ergot and single sclerotia from the 2007 and 2008 harvests. *Mycotox Res* 25:95-101.
- Arendt Elke K., Zannini M. 2013. Cereal grains for the food and beverage industries. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 248 pp.
- Banerjee S, Mazumdar S. 2012. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* 2012:282574.
- Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, Moretti A, Camardo Leggieri M, Brera C, Rortais A, Goumperis T, Robinson T. 2016. Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep* 6:24328.
- Baumann U, Hunziker HR and Zimmerli B. 1985. Ergot alkaloids in Swiss cereal products. *Mitt Lebensm Hyg* 76:609-630.
- Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ. 2013. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nat Clim Change* 3:985-988.
- Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J. 2013. Masked mycotoxins: A review. *Mol Nutr Food Res* 57:165-186.
- Blaney BJ, Molloy JB, Brock IJ. 2009. Alkaloids in Australian rye ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia: implications for food and stockfeed regulations. *Anim Prod Sci* 49:975-982.
- Brajdić N. 2014. Ražena glavica (*Claviceps purpurea*), ergotizam i ergot alkaloidi. *Preddiplomski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Brera C, Peduto A, Debegnach F, Pannunzi E, Prantera E, Gregori E, De Giacomo M, De Santis B. 2013. Study of the influence of the milling process on the distribution of Deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. *Food Control* 32:309.
- Bryła M, Roszko M, Szymczyk K, Jędrzejczak R, Iłowik HS, Obiedzinski MW. 2014. Effect of Baking on Reduction of Free and Hidden Fumonisin in Gluten-free Bread. *J Agric Food Chem* 62:10341-10347.
- Bryła M, Krystyna S, Jędrzejczak R, Roszko M. 2015. Application of liquid chromatography/ion trap mass spectrometry technique to determine ergot alkaloids in grain products. *Food Technol Biotechnol* 53:18-28.
- Bryła M, Ksieniewicz-Woźniak E, Waśkiewicz A, Podolska G, Szymczyk K. 2019. Stability of ergot alkaloids during the process of baking rye bread. *LWT-Food Sci Technol* 110:269–274.

- Budimir J. 2016. Određivanje granice kvantifikacije antibiotika u medu vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa. *Diplomski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Bullerman LB, Bianchini A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol* 119:140-146.
- Bürk G, Hobel W, Richt A. 2006. Ergot alkaloid sin cereal products: results from the Bavarian Health and Food Safety Authority. *Mol Nutr Food Res* 50:437-442.
- Castells M, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. 2005. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review. *Food Addit Contam* 22: 150-157.
- Cetin Y, Bullerman LB. 2005. Evaluation of Reduced Toxicity of Zearalenone by Extrusion Processing As Measured by the MTT Cell Proliferation Assay. *J Agric Food Chem* 53: 6558-6563.
- Coufal-Majewski S, Stanford K, McAllister T, Blakley B, McKinnon J, Chaves AV and Wang Y. 2016. Impacts of cereal Ergot in food animal production. *Front Vet Sci* 3:15.
- Crews C, Anderson WAC, Rees G, Krska R. 2009. Ergot alkaloid sin some rye-based UK cereal products. *Food Addit Contam* 2:79-85.
- Ćosić J, Jurković D, Vrandečić K. 2006. Influence of environmental factors on deoxynivalenol content in wheat flour. *Cereal Res Commun* 34:17-20.
- Ćosić J, Jurković D, Vrandečić K. 2013. Fuzarijska palež klasova. *Glasnik zaštite bilja* 4:64-67.
- Dewell G, Ensley S. 2014. Ergot Poisoning in Cattle. Izvor: <https://vetmed.iastate.edu/sites/default/files/vdpam/Extension/Ergot-Poisoning-in-Cattle.pdf> (24.7.2019.)
- Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Službeni list Europske unije, L140.
- Edwards S. 2009. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional barley. *Food Addit Contam* 26:1185-1190.
- EFSA, European Food Safety Authority 2011. Survey on ergot alkaloid in cereals intended for human consumption and animal feeding. *EFSA Journal* 8:12.
- EFSA, European Food Safety Authority 2012. Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 10:2798.
- EFSA, European Food Safety Authority 2017. Scientific report: Human and animal dietary exposure to ergot alkaloids. *EFSA Journal* 15:4902.
- Fajardo JE, Dexter JE, Roscoe MM, Nowicki TW. 1995. Retention of Ergot Alkaloids in Wheat During Processing. *Cereal Chem* 72:291-298.

- Floss HG, Cassady JM, Robbers JE. 1973. Influence of ergot alkaloids on pituitary prolactin and prolactin-dependent processes. *J Pharm Sci* 62:699-715.
- Franco TS, Garcia S, Hirooka EY, Ono YS, Santos JS. 2011. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *J Appl Microbiol* 111:739-748.
- Franzmann C, Steinmeier A, Dittmer N, Humpf HU. 2010. Mutterkorn in Roggen-Vorkommen, Nachweis und Stabilität der Mutter kornalkaloide. *Cereal Technol* 4: 213–219.
- Franzmann C, Schröder J, Münzing K, Wolf K, Lindauer MG, Humpf HU. 2011. Distribution of ergot alkaloids and ricinoleic acid in different milling fractions. *Mycotox Res* 7:13–21.
- Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL. 2005. Foodborne Pathogens. Microbiology and Molecular Biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Friedman M, Dao L. 1990. Effect of autoclaving and conventional and microwave baking on the ergot alkaloid and chlorogenic acid contents of morning glory (*Ipomoea tricolor* Cav. cv.) heavenly blue seeds. *J Agric Food Chemistry* 38:805–808.
- Generotti S, Cirlini M, Šarkanj B, Sulyok M, Berthiller F, Dall’Asta C, Suman M. 2017. Formulation and processing factors affecting trichothecene mycotoxins within industrial biscuit-making. *Food Chem* 229:597–603.
- Grbeša D, Duvnjak M, Kljak K. 2014. Ublažavanje pojave mikotoksina u krmi i njihovih učinaka na zdravlje. *Krmiva* 56:15-32.
- Grec M. 2014. Mikotoksini u žitaricama žetve 2013. u Hrvatskoj. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Griffith RW, Grauwiler J, Hodel C, Leist KH, Matter B. 1978. Ergot – toxicology considerations. U: Heffter-Heubner’s Handbook of experimental pharmacology. 805-851.
- Gross JH. 2004. Mass spectrometry - A Textbook. Springer, Berlin.
- Grusie T, Cowan V, Singh J, McKinnon J, and Blakley B. 2017. Correlation and variability between weighing, counting and analytical methods to determine ergot (*Claviceps purpurea*) contamination of grain. *World Mycotoxin J* 10:209-218.
- HAH, Hrvatska agencija za hranu. 2012. Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje.
- HAH, Hrvatska agencija za hranu. 2017. Znanstveno mišljenje o ergot alkaloidima u hrani i hrani za životinje.

Hansen HB, Moller B, Andersen SB, Jorgensen JR, Hansen A. 2004. Grain characteristics, chemical composition, and functional properties of rye (*Secale cereale* L.) as influenced by genotype and harvest year. *J Agric Food Chem* 52:2282-2291.

Haraldsson J. 2010. Development of a Method for Measuring Pasta Quality Parameters. Degree project work, Linnaeus University.

Haarmann T, Rolke Y, Giesbert S, Tudzynski P. 2009. Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Mol Plant Pathol* 10:563-577.

Heiniö RL, Katina K, Wilhelmson A, Olavi M, Rajamaki T, Latva-Kala K, Liukkonen KH, Poutanen K. 2003. Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated, sourdough fermented and native rye following the extrusion process. *Lebensm Wiss Technol* 36:533-545.

Janssen GB, Beems RB, Speijers GJ i van Egmond HP 2000a. Subacute toxicity of alphaergocryptine in Sprague - Dawley rats. 1: general toxicological effects. *Food Chem Toxicol* 38:679-688.

Janssen GB, Beems RB, Elvers LH i Speijers GJ 2000b. Subacute toxicity of alpha - ergocryptine in Sprague - Dawley rats. 2: metabolic and hormonal changes. *Food Chem Toxicol* 38:689-695.

Jestoi M, Somma MC, Kouva M, Veijalainen P, Rizzo A, Ritieni A, Peltonen K. 2004. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. *Mol Nutr Food Res* 48:299-307.

Jozinović A. 2015. Svojstva kukuruznih snack proizvoda obogaćenih s nusproizvodima prehrambene industrije. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Karlovsy P, Suman M, Berthiller F, De Meester J, Eisenbrand G, Perrin I, Oswald IP, Speijers G, Chiodini A, Recker T, Dussort P. 2016. Impact od food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotox Research* 32:179-205.

Karlsson I, Friberg H, Kolseth AK, Steinberg C, Persson P. 2017. Agricultural factors affecting Fusarium communities in wheat kernels. *Int J Food Microbiol* 252:53-60.

Kill RC, Turnbull K. 2001. *Pasta and Semolina Technology*. Blackwell Science.

Klug C, Baltus W, Kröinert W, Weber R. 1988. Methode zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Lebensmitteln. *Z Lebensm Unters Forsch* 186:108-113.

Kosović I. 2017. Mogućnosti primjene ječma u proizvodnji nutritivno poboljšane tjestenine – utjecaj udjela ječma i procesnih parametara. *Doktorska disertacija*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

- Kovač M, Šubarić D, Bulaić M, Kovač T, Šarkanj B. 2018. Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next? *Arh Hig Rada Toksikol* 69:196-214.
- Krnić J. 2012. Utjecaj vremena miješanja i udjela vode u zamjesu na kvalitetu tjestenine. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Krnjak M 2010. Ispitivanje kvalitete. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Krska R, Crews C. 2008. Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: A review. *Food Addit Cont* 25:722–731.
- Kujala T. 1994. Rye and health. Izvor: <http://rye.vtt.fi/rye&health.pdf> (12.2.2019.)
- Kushiro M. 2008. Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. *Int J Mol Sci* 9:2127-2145.
- Lauber U, Schnauffer R, Gredziak M, Kiesswetter Y. 2005. Analysis of rye grains and rye meals for ergot alkaloids. *Mycotox Research* 21:258-262.
- Likar M, Grandič M, Jakovac Strajn B, Kos K, Celar FA. 2018. Links Between Genetic Groups, Host Specificity, and Ergot-Alkaloid Profiles within *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. on Slovenian Grasses. *Plant Dis* 102:1334-1340.
- Lovrić T. 2003. Ekstruzija (Ekstruzijsko kuhanje). U *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, 287-299 pp.
- Madeira P, Florêncio M. 2012. Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. In *Tandem Mass Spectrometry – applications and principles*. InTech, Rijeka. 6 pp.
- Mainka S, Dänicke S, Böhme H, Ueberschär KH, Liebert F 2007. On the alkaloid content of ergot (*Claviceps purpurea*). *Landbauforsch Voelk* 57:51-59.
- Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R. 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography – tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 1362:145-156.
- Malysheva SV, Larionova DA, Di Mavunga DJ, De Saeger S. 2014. Pattern and distribution of ergot alkaloids in cereals and cereal products from European countries. *World Mycotoxin J* 7:217-230.
- Manley D. 2000. *Technology of biscuits, crackers and cookies*. Woodhead Publishing Limited, England 395-397 pp.
- Mastanjević K, Šarkanj B, Krska R, Sulyok M, Warth B, Mastanjević K, Šantek B, Krstanović V. 2018a. From malt to wheat beer: A comprehensive multi-toxin screening, transfer assessment and its influence on basic fermentation parameters. *Food Chem* 254:115-121.

- Mastanjević K, Šarkanj B, Šantek B, Mastanjević K, Krstanović V. 2018b. Fusarium culmorum mycotoxin transfer from wheat to malting and brewing products and by-products. *World Mycotoxin J* 12:55-66.
- Medina A, Rodriguez A, Sultan Y, Magan N. 2015. Climate change factors and Aspergillus flavus: effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin J* 8:171-179.
- Medina A, Akbar A, Baazeem A, Rodriguez A, Magan N. 2017. Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biology Reviews* 31:143–154.
- Međimurec T. 2018. Agrotehnika proizvodnje raži. Izvor: <https://www.savjetodavna.hr/wp-content/uploads/publikacije/AgrotehnikaRazWeb102018.pdf> (13.4.2019.)
- Meleard B. 2016. Degradation and epimerization of wheat ergot alkaloids during French baking test. Izvor: [https://www.researchgate.net/publication/303941846\\_Degradation\\_and\\_epimerization\\_of\\_wheat\\_ergot\\_alkaloids\\_during\\_French\\_baking\\_test](https://www.researchgate.net/publication/303941846_Degradation_and_epimerization_of_wheat_ergot_alkaloids_during_French_baking_test) (2.5.2019.)
- Menzies JG, Turkington TK. 2014. An overview of the ergot (*Claviceps purpurea*) issue in western Canada: challenges and solutions. *Can J Plant Pathol* 37:40-51.
- Merkel S, Dib B, Maul R, Köppen R, Koch M, Nehls I. 2012. Degradation and epimerization of ergot alkaloids after baking and in vitro digestion. *Anal Bioanal Chem* 404:2489–2497.
- Merrill LM, Bohnert DW, Harmon DL, Craig MA, Schrick FN. 2007. The ability of a yeast-derived cell wall preparation to minimize the toxic effects of high-ergot alkaloid tall fescue straw in beef cattle. *J Anim Sci* 85:2596-2605.
- Miedaner T, Geiger H. 2015. Biology, genetics and Management of ergot (*Claviceps* spp.) in rye, sorghum and pearl millet. *Toxins* 7:659-678.
- Miller LD, Wrigley C. 2004. Cookies, biscuits, and crackers / Methods of manufacture. U: Wrigley C, Corke H, Walker CE. Encyclopedia in grain science, 295-300 pp.
- Miraglia M, Marvin HJ, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E, Cubadda F, Croci L, De Santis B, Dekkers S, Filippi L, Hutjes RW, Noordam MY, Pisante M, Piva G, Prandini A, Toti L, van den Born GJ, Vespermann A 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food Chem Toxicol* 47:1009-1021.
- Móscicki L. 2011. Extrusion - Cooking Techniques: applications, theory and sustainability. WILEY-VCH, Weinheim, Germany. 81-88 pp.
- Mrvčić J, Mikelec K, Stanzer D, Križanović S, Bačun-Družina V, Stehlik-Tomas V. 2011. Sourdough – Traditional Methods for Improving Quality of Bakery Products. *Croat J Food Sci Technol* 6:89-99.



- Mulac D, Huwel S, Galla HJ, Humpf HU. 2012. Permeability of ergot alkaloids across the bloodbrain barrier in vitro and influence on the barrier integrity. *Mol Nutr Food Res* 56:475-485.
- Müller C, Kemmlein S, Klaffke H, Krauthause W, Preiß-Weigert A, Wittkowsk R. 2009. A basic tool for risk assessment: A new method for the analysis of ergot alkaloids in rye and selected rye products. *Mol Nutr Food Res* 53:500-507.
- Pagani MA, Resmini P, Dalbon G. 1989. Influence of the extrusion process on characteristics and structure of pasta. *Food Microstruct* 8:173-182.
- Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *B World Health Organ* 77:754-766.
- Peraica M, Rašić D. 2012. Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva* 54:81-87.
- Peters-Volleberg GW, Beems RB, Speijers GJ. 1996. Subacute toxicity of ergometrine maleate in rats. *Food Chem Toxicol* 34:951-958.
- Pfliegler WP, Pusztahelyi T, Pócsi I. 2015. Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *J Basic Microbiol* 55:805-818.
- Pleadin J, Frece J, Vasilj V, Markov K. 2015. Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Hrvat čas prehrambenu tehnol biotehnol nutr* 10:6-13.
- Pratima NA, Shraddha B, Zibran S. 2013. Review of Ultra Performance Liquid Chromatography and its Applications. *Int J Res Pharm Pharm Sci* 3:19-40.
- Preporuka Europske komisije od 15. ožujka 2012. o praćenju prisutnosti ergot alkaloida u hrani i hrani za životinje (2012/154/EU). Službeni list Europske unije, L77/20.
- Rakha A, Aman P, Andersson R. 2010. Characterisation of dietary fibre components in rye products. *Food Chem* 119:859–867.
- Ryu D , Kowalski RJ , Ganjyal G, Lee HJ. 2019. Reduction of ochratoxin A in oats and rice by twin-screw extrusion processing with baking soda. *Food Control* 105:21-28.
- Saeleaw M, Dürschmid K, Schleining G. 2012. The effect of extrusion conditions on mechanical-sound and sensory evaluation of rye expanded snack. *J Food Eng* 110:532-540.
- Samar MM, Neira MS, Resnik SL, Pacin A. 2001. Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology. *Food Add Contam* 18:1004-1010.
- Schwarz PB, Hill NS, Rottinghaus GE. 2007. Fate of ergot (*Claviceps purpurea*) alkaloids during malting and brewing. *J Am Soc Brew Chem* 65:1–8.
- Scott PM, Lawrence GA. 1980. Analysis of ergot alkaloids in flour. *J Agric Food Chem* 28:1258–1261.

- Scott PM, Lawrence GA. 1982. Losses of Ergot Alkaloids during Making of Bread and Pancakes. *J Agric Food Chem* 30:445-450.
- Scott PM. 2009. Ergot alkaloids: extent of human and animal exposure. *World Mycotoxin J* 2:141-149.
- Schünemann C, Treu G. 2012. Tehnologije proizvodnje pekarskih i slastičarskih proizvoda. TIM ZIP d.o.o., Zagreb.
- Shaar CJ, Clemens JA. 1972. Inhibition of Lactation and Prolactin Secretion in Rats by Ergot Alkaloid. *Endocrinology* 90:285-288.
- Shetty PH, Jespersen L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trend in Food Science & Technology* 17:48-55.
- Shogren MD, Finney KF. 1984. Bread-Making Test for 10 Grams of Flour. *Cereal Chem* 61:418-423.
- Sissons M. 2008. Role of Durum Wheat Composition on the Quality of Pasta and Bread. *Food* 2, 75-90.
- Speijers GJA, Wester PN, van Leeuwen FXR, de la Fonteyne-Blankestijn L, Post W, van Egmond HP, Sizoo EA, Janssen GB. 1993. Subchronic toxicity experiment with rats fed a diet containing ergotamine tartrate. Izvor: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/618312002.html> (21.4.2019.)
- Stadler D, Lambertini F, Woelflingseder L, Schwartz-Zimmermann H, Marko D, Suman M, Berthiller F, Krska R. 2019. The Influence of Processing Parameters on the Mitigation of Deoxynivalenol during Industrial Baking. *Toxins* 11:317.
- Stazić A. 2017. Ekstruzija u procesima prehrambene industrije. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Storm ID, Rasmussen PH, Strobel BW, Hansen HC. 2008. Ergot alkaloids in rye flour determined by solid-phase cation-exchange and high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Add Contam Part A* 25:338-346.
- Sulyok M, Stadler D, Steiner D, Krska R. 2020. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Anal Bioanal Chem*
- Šarkanj B. 2014. Utjecaj inhibitora glutation S – transferaze na proukciju aflatoksina plijesni *Aspergillus flavus*. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Šimonji K. 2011. Ispitivanje kvalitete tjestenine proizvedene od mješavine krupica pšenica *Triticum durum* i *Triticum aestivum*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek
- Taleuzzaman M, Ali S, Gilani SJ, Imam SS, Hafeez A. 2015. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – A Review. *Austin J Anal Pharm Chem* 2:1056.

Tanasković I. 2014. Utjecaj dodatka zobi na svojstva ekstrudiranih proizvoda na bazi kukuruzne krupice. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Tittlemier SA, Drul D, Roscoe M, McKendry T. 2015. Occurrence of ergot and ergot alkaloids in western Canadian wheat and other cereals. *J Agricult Food Chem* 63: 6644-6650.

Tittlemier SA, Drul D, Roscoe M, Turnock D, Taylor D, Fu BX. 2019. Fate of Ergot Alkaloids during Laboratory Scale Durum Processing and Pasta Production. *Toxins* 11:195.

Uredba Komisije (EU) 2015/1940 od 28. listopada 2015. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina sklerocija glavice raži na određenim neprerađenim žitaricama te odredaba o praćenju i izvješćivanju. Službeni list Europske unije, L283/3.

Uredba Komisije (EU) br. 1272/2009 od 11. prosinca 2009. o utvrđivanju zajedničkih detaljnih pravila za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 1234/2007 u pogledu otkupa i prodaje poljoprivrednih proizvoda u okviru javne intervencije. Službeni list Europske unije, L349/2009.

Varga E. 2010. 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.

Vink CJA, Delcour JA. 1996. Rye (*Secale cereale* L.) arabinoxylans: A critical review. *J Cer Sci* 24:1-14.

Visconti A, Haidukowski EM, Pascale M, Silvestri M. 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicol Lett* 153:181-189.

Wolff J, Ocker HD, Zwingelberg H. 1983. Bestimmung von Mutterkornalkaloiden in Getreide und Mahlprodukten durch HPLC. *Getreide, Mehl und Brot* 37:331-335.

Wolff J, Neudecker C, Klug C, Weber R. 1988. Chemische und toxikologische Untersuchungen über Mutterkorn in Mehl und Brot. *Z Ernährungswiss* 27:1-22.

Woolf A. 2000. Witchcraft of Mycotoxin? The Salem Witch Trials. *Clin Toxicol* 38:457-460.

Wrigley C, Corke H, Walker CE. 2004. Encyclopedia of Grain Science. Elsevier Academic Press, 409-418 pp.

Zeilmacker GH, Carlsen RA. 1962. Experimental studies on the effect of ergocornine methanesulphonate on the luteotrophic function of the rat pituitary gland. *Acta Endocrinol-cop* 41:321-335.

Zweifel C. 2001. Influence of High-Temperature Drying on Structural and Textural Properties of Durum Wheat Pasta. *Doctoral thesis*, ETH, Zurich.

## **8. PRILOZI**

## 8.1. Popis oznaka, kratica i simbola

AF	Aflatoksin
CONTAM	Odbor za kontaminante Europske agencije za sigurnost hrane
DON	Deoksinivalenol
EA	Ergot alkaloidi i njihovi epimeri
ES	Ergot sklerocij
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> , Europska agencija za sigurnost hrane
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> , Ionizacija elektroraspršenjem
HAH	Hrvatska agencija za hranu
LC-MS/MS	Metoda tekućinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom
LD <sub>50</sub>	<i>Lethal dose</i>
LOD	<i>Limit of detection</i> , Limit detekcije
LOQ	<i>Limit of quantification</i> , Limit kvantifikacije
MS	<i>Mass spectrometry</i> , Masena spektrometrija
NDK	Najveća dopuštena količina
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> , Razina bez uočenog štetnog učinka
OTA	Okratoksin
(U)HPLC	<i>(Ultra) high performance/pressure liquid chromatography</i> , (Ultra) Visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija
ZEN	Zearalenon

## 8.2. Popis slika

Slika 1. Tetraciklički ergolinski prsten

Slika 2. Kemijske strukture i molekulske mase najznačajnijih EA i njihovih –inin epimera

Slika 3. Ergot sklerocij na klasu raži

Slika 4. Strome ne ergot sklerociju

Slika 5. Zrno raži zaraženo ergot sklerocijem

Slika 6. Očekivani rizik kontaminacije aflatoksinima u kukuruzu kod a) trenutnih temperatura; porasta srednje temperature za b) 2°C te c) 5 °C

Slika 7. Suđenje „vješticama iz Salema“

- Slika 8. Isječak iz Uredbe (EU) 2015/1940 (Službeni list Europske unije, L 283/3)
- Slika 9. Raž – od klasa do kruha
- Slika 10. Uređaj za sušenje tjestenine
- Slika 11. Presjek jednopužnog ekstrudera s odgovarajućim zonama
- Slika 12. Shematski prikaz rada MS/MS sustava
- Slika 13. Princip rada ESI sustava
- Slika 14. Princip rada MS/MS uređaja
- Slika 15. Broj uzoraka neobrađene raži uzorkovanih iz pojedinih županija RH
- Slika 16. Broj uzoraka ekološki proizvedene raži po županijama
- Slika 17. Laboratorijska tresilica s vibrirajućim sitima
- Slika 18. Shema pripreme proizvoda od neobrađene raži do finalnih proizvoda
- Slika 19. Shematski prikaz proizvodnje raženog kruha (direktni postupak)
- Slika 20. Shematski prikaz proizvodnje raženog kruha (indirektni postupak)
- Slika 21. Shematski prikaz konvencionalne proizvodnje tjestenine
- Slika 22. Shematski prikaz proizvodnje ekstrudirane tjestenine
- Slika 23. Shematski prikaz proizvodnje snack proizvoda s 10 % raženih mekinja
- Slika 24. Shematski prikaz proizvodnje snack proizvoda s 20 % raženih mekinja
- Slika 25. Laboratorijski jednopužni ekstruder Brabender 19/20 DN
- Slika 26. Shematski prikaz proizvodnje keksa
- Slika 27. Primjer kromatograma uzorka raži kontaminiranog EA
- Slika 28. Statistička analiza ukupnih EA u konvencionalno i ekološki proizvedenoj raži
- Slika 29. Koncentracija ukupnih EA u frakcijama mljevenja raži ispitivanih uzoraka
- Slika 30. Statistička analiza ukupnih EA u brašnu, mekinjama i krupici
- Slika 31. Redukcija EA iz raženog brašna u tijesto za kruh nakon direktnog i indirektnog postupka
- Slika 32. Statistička analiza ukupnih EA u tijestu za kruhove proizvedene direktnim i indirektnim postupkom zamjesa
- Slika 33. Utjecaj ekstruzije na prisustvo EA u konvencionalnoj i ekstrudiranoj tjestenini
- Slika 34. Statistička analiza ukupnih EA u konvencionalnoj i ekstrudiranoj tjestenini

Slika 35. Utjecaj ekstruzije na prisustvo EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja

Slika 36. Statistička analiza ukupnih EA u snack proizvodima s 10 % i 20 % raženih mekinja

Slika 37. Redukcija EA iz tjestenine proizvedene na konvencionalan način u kuhanu tjesteninu proizvedenu na konvencionalan način

Slika 38. Statistička analiza ukupnih EA u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način i kuhanj tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način

Slika 39. Redukcija EA iz ekstrudirane tjestenine u kuhanu ekstrudiranu tjesteninu

Slika 40. Statistička analiza ukupnih EA u ekstrudiranoj tjestenini i kuhanj ekstrudiranoj tjestenini

Slika 41. Redukcija EA iz brašna u tijesto za keks

Slika 42. Statistička analiza ukupnih EA u brašnu, tijestu za keks i keksu

Slika 43. Utjecaj pečenja na prisustvo EA u kruhu proizvedenom direktnim postupkom

Slika 44. Statistička analiza ukupnih EA u tijestu za kruh i kruhu proizvedenom direktnim postupkom

Slika 45. Utjecaj pečenja na prisustvo EA u kruhu proizvedenom indirektnim postupkom

Slika 46. Statistička analiza ukupnih EA u tijestu za kruh i kruhu proizvedenom indirektnim postupkom

Slika 47. Usporedba koncentracije ukupnih EA u kruhu od raženog brašna proizvedenom direktnim i indirektnim postupkom

Slika 48. Statistička analiza ukupnih EA u kruhu od raženog brašna proizvedenom direktnim i indirektnim postupkom

Slika 49. Redukcija EA iz brašna u kruh proizveden direktnim i indirektnim postupkom zamjesa izraženim na suhu tvar

Slika 50. Statistička analiza podataka za redukciju EA iz brašna u kruh proizveden direktnim postupkom izraženim na suhu tvar

Slika 51. Statistička analiza podataka za redukciju EA iz brašna u kruh proizveden indirektnim postupkom izraženim na suhu tvar

Slika 52. Usporedba suma koncentracija ukupnih EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži

Slika 53. Raspodjela koncentracija ukupnih EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži

Slika 54. Omjeri (*R*)- i (*S*)- epimera ukupnih EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži

### 8.3. Popis tablica

Tablica 1. Uspostavljene LD<sub>50</sub> vrijednosti na pojedinim životinjskim vrstama pri intravenoznom unosu ergometrina, ergotamina i ergozina

Tablica 2. Sadržaj minerala i vitamina u raženom zrnu

Tablica 3. Prosječni sastav zrna raži i ostalih žitarica

Tablica 4. LOD i LOQ metode za određivanje EA u sirovinama, poluproizvodima i proizvodima od raži

Tablica 5. Koncentracije pojedinih EA i njihovih epimera ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) u uzorcima neobrađene raži, po županijama

Tablica 6. Deskriptivna statistika usporedbe ukupnih EA iz konvencionalne i ekološke proizvodnje raži

Tablica 7. Koncentracije ukupnih EA i vremenske prilike po županijama/mjernim postajama za travanj, svibanj, lipanj i srpanj 2016. godine

Tablica 8. Koncentracija EA u raženom brašnu

Tablica 9. Koncentracija EA u raženoj krupici

Tablica 10. Koncentracija EA u raženim mekinjama

Tablica 11. Koncentracija EA u tijestu za kruh od raženog brašna proizvedenom direktnim postupkom zamjesa

Tablica 12. Koncentracija EA u tijestu za kruh od raženog brašna proizvedenom indirektnim postupkom zamjesa

Tablica 13. Koncentracija EA u tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način

Tablica 14. Koncentracija EA u ekstrudiranoj tjestenini

Tablica 15. Koncentracija EA u snack proizvodu s 10 % raženih mekinja

Tablica 16. Koncentracija EA u snack proizvodu s 20 % raženih mekinja

Tablica 17. Koncentracija EA u kuhanoj tjestenini proizvedenoj na konvencionalan način



Tablica 18. Koncentracija EA u kuhanoj ekstrudiranoj tjestenini

Tablica 20. Koncentracija EA u kruhu od raženog brašna proizvedenom indirektnim postupkom

## **9. ŽIVOTOPIS**

Mr.sc. Jasenka Petrić rođena je 23. lipnja 1974. godine u Osijeku. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u III. Gimnaziji u Osijeku upisala je Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, te se nakon 3. semestra prebacila na Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirala 1999. godine te stekla zvanje diplomiranog inženjera prehrambene tehnologije. Nakon završenog fakultetskog obrazovanja 1999. godine zapošljava se u firmi Vodovod - Osijek d.o.o. u laboratoriju Gradskog vodovoda gdje radi na poslovima ispitivanja zdravstvene ispravnosti vode za piće, mikrobiološkim analizama otpadnih voda i testovima toksičnosti na indikatorske organizme. Iste godine upisuje Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, polje Biologija - Toksikologija na kojem je magistrirala 2003. godine s temom „Onečišćenje podzemnih voda preparatima atrazina“. Od 2015. godine radi u Hrvatskoj agenciji za hranu, kao viši stručni savjetnik u Odjelu za procjenu rizika, a od 1.1.2019. g radi u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu na istim poslovima. U međuvremenu, od 2007. do 2010. godine radila je kao Asistent koordinator za Hrvatsku na Predpristupnom projektu Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA).

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Zaštita prirode i okoliša na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku upisala je 2011. godine. Član je Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog društva tehnologa, biotehnologa i nutricionista . Aktivno sudjeluje na znanstvenim i stručnim skupovima, radionicama te stručnim edukacijama u zemlji i inozemstvu.

Kao autor i koautor izdala je desetak znanstvenih i stručnih radova:

**Petrić J**, Šarkanj B, Mujić I, Mujić A, Sulyok M, Krska R, Šubarić D, Jokić S. 2018. Effect of pretreatments on mycotoxin profiles and levels in dried figs. *Arh Hig Rada Toksikol.* 69:328-333.

Stražanac D, Matijević L, **Petrić J**, Čagalj D, Babić J, Hengl B. 2018. Population exposure of Zagreb city area to contaminants from drinking water. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 10:234-238.

Matijević L, **Petrić J**, Stražanac D, Gross-Bošković A, Hengl B. 2017. Ergot alkaloids presence in cereals from Croatia. In 9<sup>th</sup> International Congress „Flour-bread'17“ i 11<sup>th</sup> Croatian Congress of Cereal Technologists „Brašno-kruh '17“, Opatija, 18.

**Petrić J**, Hengl B, Plavšin I, Gross Bošković A. 2017. Rezultati trogodišnjeg praćenja mikotoksina u hrani za životinje. U XXIV Međunarodno savjetovanje Krmiva 2017, Opatija, 66-67.

Matijević L, Stražanac D, Hengl B, Babić J, Čagalj D, **Petrić J**. 2017. Unos mikroelemenata iz vode iz javne opskrbe stanovništva Zagreba i okolice. U *III Hrvatski kongres zdravstvene ekologije*, Terme Tuhelj, 65-66.

**Petrić J**, Gross-Bošković A, Hengl B. 2017. Insects as protein source for food and feed – consumer perception in Croatia and other European countries. *INSECTA Conference 2017*, Book of Abstracts, Potsdam-Bornim, 134.

Prukner-Radovcic E, Hengl B, Gross-Boskovic A, Petric J. 2017. *Salmonella* Infantis, a potential human pathogen from broiler meat in Croatia. In EGGMEAT 2017, XVIIth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Product; XXIIIth European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Edinburgh University, 76.

Hengl B, Gross – Bošković A, Vuljanić K, Crnić AM, Vazdar R, **Petrić J.** 2016. *Salmonella* Infantis u pilećem mesu na tržištu u Hrvatskoj. *Meso* 4:342-347.

**Petrić J,** Hengl B, Gross-Bošković A. 2016. Kukci kao proteinska komponenta u hranidbi peradi. *Krmiva* 57:37-45.

**Petrić J,** Gross-Bošković A, Hengl B, Leuštek M. 2015. Insekti kao izvor proteina u hrani za životinje-percepcija potrošača. U 5. *Znanstveno-stručni skup Okolišno prihvatljiva proizvodnja kvalitetne i sigurne hrane*, Osijek, 69-70.

Krivohlavek A, Marinčić S, Šmit Z, Puntarić D, **Petrić J.** 2006. Onečišćenje podzemnih voda s-triazinskim herbicidom atrazinom na području vodocrpilišta Grada Osijeka. U *Stručni sastanak laboratorija ovlaštenih za ispitivanje voda*, Osijek.

**Petrić J,** Marinčić S, Krivohlavek A, Šmit Z, Puntarić D. 2005. Contamination of groundwater with triazine herbicide. U IX. *Znanstveno-stručni skup "Voda i javna vodoopskrba"*, Zbornik radova, Osijek, 203-204.

Romić Ž, **Kozić J.** 2000. Ispitivanje kakvoće vode u zdencima Osječko-baranjske županije. 10. Ružičkini dani, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Vukovar.

Romić Ž, **Kozić J.** 2000. Ispitivanje toksičnosti koagulanata na indikatorski organizam *Daphnia magna*. IV. znanstveno-stručni skup „Voda i javna vodoopskrba“, Veli Lošinj, 127-131.