



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Elizabet Janić Hajnal

**Mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria*
toksina u pšenici primenom odabranih
tehnoloških postupaka**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Marija Škrinjar

Dr Jasna Mastilović

Kandidat:

Elizabet Janić Hajnal, dipl. inž.

Novi Sad, 2015. godine

Veliku zahvalnost dugujem svom internom mentoru dr Jasni Mastilović na svojoj pruženoj pomoći koja daleko prevazilazi okvire ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr Mariji Škrinjar na ukazanom poverenju i svojoj pruženoj pomoći.

Iskreno se zahvaljujem dr Aleksandri Torbici na svojoj podršci tokom svih godina naše saradnje.

Zahvalila bih se i predsednici komisije prof. dr Evi Lončar na pažljivom isčitavanju materijala disertacije i svim sugestijama i korekcijama.

Za svu stručnu pomoć pri postavljanju ogleda na polju zahvaljujem se prof. dr Ferencu Bagiju i dr Dragani Budakov, a za tehničku pomoć na poljoprivrednom gazdinstvu u Kupusini veliku zahvalnost dugujem Zoranu Bogdanoviću i Gaboru Fridriku i njegovoj porodici.

Neizmernu zahvalnost dugujem doc. dr Dejanu Orčiću na znanju, iskustvu, nesebičnom zalaganju i bezrezervnoj pomoći pri realizaciji eksperimentalnog dela ove disertacije.

Želim da zahvalim i dr Lati Pezo koji mi je pomogao na statističkoj obradi dela rezultata, kao i njihovom adekvatnom tumačenju.

Iskreno se zahvaljujem mojoj dragoj kolegici dr Jovani Kos na velikoj podršci i prijateljskim savetima kao i na pruženoj tehničkoj podršci.

Želela bih da se zahvalim mojim kolegama Radmilu Čoloviću, Dragani Plavšić, Ivanu Milovanoviću, Đuri Vukmiroviću, Mioni Belović i Jovani Đisalo, kao i tehničkim saradnicima Zoranu Mastiloviću, Draganu Tankosiću i Sari Kiš za pruženu pomoć oko tehničke realizacije dela ove doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i projektima III 46001 i TR31007, kao i FINSLab-u koji su doprineli da se ovo istraživanje realizuje.

Svojoj porodici, suprugu Branku, kćerkama Teodori i Galini, svecrkovi Branislavi, najtoplije se zahvaljujem na stalnoj bezuslovnoj podršci, ljubavi i velikom razumevanju.

Zahvaljujem se svima koji su pomogli na bilo koji način, a nisu pojedinačno spomenuti.

Autor

Univerzitet u Novom Sadu

Tehnološki fakultet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):

Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora:

Elizabet Janić Hajnal, dipl. inž.

AU

Mentor (titula, ime, prezime,
zvanje):

Dr Marija Škrinjar, redovni profesor

Dr Jasna Mastilović, naučni savetnik

MN

Naslov rada:

Mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria*
toksina u pšenici primenom odabranih
tehnoloških postupaka

NR

Jezik publikacije:

Srpski, latinica

JP

Jezik izvoda:

Srpski / engleski

JI

Zemlja publikovanja:

Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje:

Vojvodina

UGP

Godina:

2015.

GO

Izdavač:

autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
MA
Fizički opis rada: 7 poglavlja, 134 stranica, 37 slika, 31 tabela,
FO 245 referenci
Naučna oblast: Biotehničke nauke
NO
Naučna disciplina: Prehrambeno inženjerstvo
ND
Predmetna odrednica, ključne reči: *Alternaria* toksini, pojava, pšenica, tehnološki
PO postupci
UDK
Čuva se: U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom
ČU Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: nema
VN
Izvod:
IZ

Potreba za potpunijom informacijom o važnosti kontaminacije useva *Alternaria* toksinima su nedavno dobili na značaju. Imajući u vidu toksičnost metabolita koje proizvode pojedine vrste gljive iz roda *Alternaria* u sistemu od njive do trpeze uticalo je na to da se u sklopu istraživanja u oblasti mikotoksikologije registruje porast interesovanja za *Alternaria* toksine i gljive koje ih proizvode. S obzirom na činjenicu da sa naših prostora nema dostupnih podataka o prirodnoj kontaminaciji pšenice sa *Alternaria* toksinima, a o ponašanju *Alternaria* toksina tokom procesa prerade pšenice nema dostupnih podataka u naučnoj literaturi, proizišli su ciljevi ove doktorske disertacije. Osnovni cilj planiranih istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio sagledavanje uticaja konvencionalno primenjenih mehaničkih (čišćenje i suvo mlevenje) i hidrotermičkih (ekstrudiranje) tehnoloških postupaka na redukciju prisutnih *Alternaria* toksina u pšenici. Primenom postupaka čišćenja pšenice uobičajenih u praksi rada silosne i mlinske čistione postiže se značajna redukcija prisustva svih ispitivanih *Alternaria* toksina u zrnenoj masi. U postupku mlinske prerade pšenice, čak i u slučaju prerade pšenice u kojoj je sadržaj pojedinih *Alternaria* toksina ispod granice detekcije u frakcijama mlevenja pšenice u koje dospevaju periferni delovi pšeničnog zrna, odnosno kasnijim prolazištima krupljenja i mlevenja, kao i sporednim proizvodima meljave, može se očekivati povišen sadržaj *Alternaria* toksina. Optimalni efekti procesa ekstrudiranja u slučaju korišćenja jednopužnog ekstrudera ostvareni su u slučaju visoke vlage polaznog materijala ($w=24\%$) velike brzine protoka materijala ($q=25$ kg/h) i srednje brzine obrtanja puža ekstrudera ($v=390$ obrtaja/min), pri čemu je postignuta redukcija $TeA=60-65\%$, $AOH=90\%$ i $AME=95\%$. Dodatni cilj je bio da se sagleda učestalost pojave *Alternaria* toksina, i stekne preliminarni uvid u pojavu i opseg koncentracije *Alternaria* toksina u pšenici sa teritorije Vojvodine sa ciljem da se dobiju preliminarni podaci o uticaju proizvodne godine, lokaliteta i najkarakterističnijih klimatskih uslova na pojavu *Alternaria* toksina

u pšenici, kao i da se sagleda uticaj uslova introdukovane stimulacije i inhibicije kontaminacije pšenice sa *Alternaria* spp. na sadržaj *Alternaria* toksina u pšenici. Analiza učestalosti incidencije *Alternaria* toksina u pšenici sa područja Vojvodine ukazuju na evidentnu pojavu značajnog broja partija pšenice kontaminirane sa TeA, praćenu sporadičnom pojavom partija kontaminiranih sa AOH i AME. Kako prosečne, tako i maksimalne koncentracije TeA u pšenici iz Vojvodine proizvedene u trogodišnjem periodu od 2011. do 2013. godine bile su više od zvanično objavljenih višegodišnjih podataka od strane Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA). Utvrđene koncentracije AME i AOH u pšenici iz Vojvodine su daleko niže od koncentracije TeA kao najčešćeg kontaminanta iz grupe *Alternaria* toksina. Preliminarno ima indicija da se najviše, ekstremne koncentracije ispitivanih *Alternaria* toksina u pšenici iz pojedinih proizvodnih godina i iz najugroženijih regiona mogu povezati sa višim prosečnim dnevnim temperaturama sa jedne i povećanom sumom padavina u maju i junu sa druge strane, u odnosu na dugogodišnji prosek (1981-2010). Inokulacija pšenice sa *Alternaria tenuissima* dovela je do povećanja koncentracije TeA u zrnoj masi u odnosu na netretiranu pšenicu, dok je tretman iste pšenice fungicidom uticao na smanjenje prisutva ovog *Alternaria* toksina, što ukazuje da infekcija prodire u zrno u većem obimu kod inokulisanih uzoraka pšenice, dok je u netretiranim i zaštićenim manje izražena. Koncentracija *Alternaria* toksina u plevi pšenice je bila značajno viša u odnosu na zrnenu masu ovršene pšenice, što ukazuje na izvesnu zaštitnu funkciju pleve od prodiranja *Alternaria* toksina u unutrašnji deo endosperma zrna pšenice. Krajnji cilj istraživanja je bio da se na osnovu dobijenih podataka o efikasnosti primenjenih tehnoloških postupaka u pogledu redukcije *Alternaria* toksina u pšenici i podataka o učestalosti i uzrocima pojave *Alternaria* toksina u pšenici da okvirna procena mogućnosti smanjenja rizika od pojave visokih udela *Alternaria* toksina u proizvodima prerade pšenice na tržištu. U lancu proizvodnje, prometa, skladištenja i prerade pšenice kao proizvodi sa niskim rizikom u pogledu pojave i koncentracije *Alternaria* toksina, mogu se istaći bela brašna i hidrotermički obrađeni proizvodi, kao što su na primer ekstrudirani proizvodi od pšenice. Kao proizvodi visokog rizika u pogledu pojave i koncentracije *Alternaria* toksina ističu se pleva dobijena tokom žetve pšenice, nečistoće dobijene u procesu silosnog postupka čišćenja pšenice, tamne frakcije brašna dobijene u postupku mlevenja pšenice i sporedni proizvodi mlevenja pšenice – mekinje i osevci.

Datum prihvatanja teme od strane 11.09.2014.

Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje /
naziv organizacije / status)

KO

dr Eva Lončar, redovni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik

dr Marija Škrinjar, redovni profesor,
Tehnološki fakultet, Novi Sad, mentor

dr Jasna Mastilović, naučni savetnik, Naučni
institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad,
mentor

dr Aleksandra Torbica, naučni savetnik,
Naučni institut za prehrambene tehnologije,
Novi Sad, član

University of Novi Sad

Faculty of Technology

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monographic publication

DT

Type of record:

Textual material, printed

TR

Contents code:

PhD Thesis

CC

Author:

Elizabet Janić Hajnal

AU

Mentor:

PhD Marija Škrinjar, full professor

MN

PhD Jasna Mastilović, research fellow

Title:

Possibilities of utilization of selected technological processes for reduction of *Alternaria* toxins content in wheat

TI

Language of text:

Serbian, latin

LT

Language of abstract:

Serbian / English

LA

Country of publication:

Republic of Serbia

CP

Locality of publication:

Vojvodina

LP

Publication year:

2015.

PY

Publisher:

Author's reprint

PU

Publication place: Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: 7 chapters, 134 pages, 37 figures, 31 tables, 245
PD references

Scientific field Biotechnical sciences
SF

Scientific discipline Food engineering
SD

Subject, Key words *Alternaria* toxins, occurrence, wheat,
SKW technological procedures

UC

Holding data: Library of Faculty of Technology, Novi Sad
HD

Note:
N

Abstract:
AB

The need for more complete information about the importance of contamination of crops with *Alternaria* toxins recently gained in importance. The toxicity of metabolites produced by certain species from *Alternaria* genus in the whole supply chain resulted in the area of mycotoxicological research in increased interest for *Alternaria* toxins and fungi producing them. Having in mind that there are no available data about natural contamination of wheat with *Alternaria* toxins in the region of Serbia, and not any data is available in academic literature about the influence of processing procedures on *Alternaria* toxins in wheat, the aims of this PhD thesis have been defined. The basic aim of this dissertation was to investigate the influence of conventional mechanical (cleaning and dry milling) and hydrothermal (extrusion) technological processes on reduction of *Alternaria* toxins present in wheat. The application of wheat cleaning processes common in wheat warehouses and mills significant reduction of concentration of all investigated *Alternaria* toxins is achieved. In wheat milling process, even for wheat with concentration of *Alternaria* toxins under the limit of detection, in fraction containing peripheral kernel parts, including last break and milling flows and by products, increased concentration of *Alternaria* toxins can be expected. Optimal effects of extrusion process with application of single screw extruder are achieved in the case of high raw material moisture ($w=24\%$), high capacity ($q=25$ kg/h) and medium speed of extruder screw rotation ($v=390$ rpm) when reduction of $TeA=60-65\%$, $AOH=90\%$ and $AME=95\%$ is achieved. Additional aim was to obtain data about the frequency of *Alternaria* toxins including occurrence and ranges of concentration of *Alternaria* toxins in wheat for the region of Vojvodina with the aim to obtain preliminary data about the influence of production season, locality and the most characteristic climatic conditions on occurrence of *Alternaria* toxins in wheat, as well as to perceive the influence of introduced stimulation and inhibition of wheat contamination with *Alternaria* spp. on concentration of *Alternaria*

toxins in wheat. Analysis of frequency of occurrence of *Alternaria* toxins in wheat from the region of Vojvodina points out at evident incidence of significant number of wheat lots contaminated with TeA accompanied with sporadic occurrence of lots contaminated with AOH and AME. Both, average and maximal concentrations of TeA in wheat produced in Vojvodina in the period from 2011 to 2013 were above the official multiannual data published by European Food Safety Agency (EFSA). Concentrations of AME and AOH in wheat from Vojvodina were far under the concentrations of TeA as the most frequent contaminant from the group of *Alternaria* toxins. Preliminary there are indications that the highest concentrations of analysed *Alternaria* toxins in wheat from certain production seasons and the most affected production regions can be related with higher average daily temperatures at one, and increased sum of precipitation at the other hand in comparison to multiannual average (1981-2010). Inoculation of wheat with *Alternaria tenuissima* resulted in increased concentration of TeA in comparison to non-treated wheat, while the treatment of the same wheat with fungicide influences at decrease of the same *Alternaria* toxins, pointing out that the infection penetrates to higher extent into inoculated wheat while in non-treated and protected wheat this process is less expressed. Concentration of *Alternaria* toxins in wheat chaff is much higher in comparison to harvested wheat pointing out at certain protective function of chaff in the process of penetration of *Alternaria* toxins into inner kernel parts. Final aim of the research was to provide the general assessment of possibilities for reduction of risk of occurrence of high *Alternaria* toxins concentrations in wheat products at the market based on obtained data about efficiency of applied technological processes for reduction of *Alternaria* toxins in wheat products and obtained data on frequency of occurrence of *Alternaria* toxins. In the wheat supply chain white flours and hydrothermally processed like extruded wheat products can be emphasized as the products with low risk regarding *Alternaria* toxins. As the high risk products regarding *Alternaria* toxins chaff obtained during harvesting, impurities obtained in wheat cleaning processes, dark flours obtained in wheat milling process and wheat milling by-products, shorts and bran, can be emphasized.

Accepted on Senate on: 11.09.2014.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

PhD Eva Lončar, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, chairman

PhD Marija Škrinjar, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, menthor

PhD Jasna Mastilović, research fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad, menthor

PhD Aleksandra Torbica, research fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad, member

LISTA SKRAĆENICA

AFSSA	fr. „Agence française de sécurité sanitaire des aliments“
ALT	Alternuen
AME	Alternariol monometil etar
AOH	Alternariol
APCI	Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom
ASL	Altenuisol
ATX-I	Altertoksin-I
ATX-II	Altertoksin-II
ATX-III	Altertoksin-III
a_w	Aktivnost vode
BfR	nem. „Bundesinstitut für Risikobewertung“
CA	eng. „Cluster analysis“
CE	Koliziona energija
CEN	Evropski Komitet za Standardizaciju
CSCF	eng. „Scientific Committee on Food of the Czech Republic“
CYA	Podloga po Czapek-u
DAD	Detektor sa nizom dioda
DHTEN	Dihidrotentoksin
DNA	Dezoksiribonukleinska kiselina
DNPH	2,4 - dinitrofenilhidrazin
E	Specifična potrošnja energije
EC	Evropska komisija
EC ₅₀	Polovina maksimalne efektivne koncentracije
ECD	Elektrohemijski detektor
EFSA	eng. „European Food Safety Authority“
EIC	Hromatogram po određenom jonu
ELISA	eng. „Enzyme Linked Immunosorbent assay“
ELSD	eng. „Evaporative light-scattering“
ESI	Elektron sprej jonizacija
Et OAc	Etil acetat
EU	Evropska unija
FAO	eng. „Food and Agriculture Organization of the United States“
FLD	Fluorescentni detektor
FV	Napon fragmentacije
GC	Gasna hromatografija
GPC	eng. „Gel permeation chromatography“
HCl	Hloridna kiselina
HCOOH	Mravlja kiselina
HPLC	Visoko efikasna tečna hromatografija
IARC	eng. „International Agency for Research on Cancer“
izo - TeA	Izo-tenuazonska kiselina
LC-MS/MS	Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom
LD	Letalna doza
LLE	Tečno-tečna ekstrakcija
LOD	Granica detekcije
LOQ	Granica kvantifikacije
ME	Matriks efekat
MEA	Sladni ekstrakt agar
MeOH	Metanol
MMC	eng. „Matrix matched calibration“
MRM	Mod za praćenje višestruke fragmentacije
MS	Masena spektrometrija

p	pritisak
PCA	eng. „Principal component analyses“
PCA _p	Krompir šargarepa agar
PDA	Krompir dekstrozni agar
PDSI	Indeks jačine suše
PRC	eng. „Polymerase Chain Reaction“
PSA	Krompir saharozni agar
q	Brzina unosa materijala u bubanj ekstrudera
RP-HPLC	Obrnuto fazna tečna hromatografija visoke efikasnosti
RS	Republika Srbija
RSD	Relativna standardna devijacija
RSM	eng. „Response Surface Method“
SAD	Sjedinjene Američke Države
SC	eng. „Solvent calibration curve“
SD	Standardna devijacija
SIDA	eng. „Sable isotope dilution assay“
SOP	eng. „Second order polynomial“
SPE	Čvrsto-fazna ekstrakcija
SPI	Standardizovani padavinski indeks
SS	eng. „Standard Score“
SSE	Odnos povećanja i smanjenja signala
T	Temperatura
TDI	Dozvoljeni dnevni unos
TeA	Tenuazonska kiselina
TEN	Tentoksin
TFA	Trifluorsirćetna kiselina
TLC	Tankoslojna hromatografija
TM	Telesna masa
tr	Retenciono vreme
TTC	eng. „Treshold Toxicological Concern approach“
ULR	Unutar laboratorijska reproduktivnost
UV	Ultraljubičasta oblast spektra
v	Brzina puža ekstrudera
V8	Podloga od soka paradajza
w	Vlaga brašna od celog zrna pšenice
Z - indeks	Palmerov indeks suše
λ _{em}	Talasna dužina emisije
λ _{ex}	Talasna dužina ekscitacije

SADRŽAJ

1. Uvod.....	4
2. Pregled literature.....	6
2.1. Mikotoksini	6
2.2. Vrste roda <i>Alternaria</i> kao kontaminanti hrane	11
2.3. Pojava, rasprostranjenost i štetan uticaj vrsta roda <i>Alternaria</i> na žitima.....	13
2.3.1. Toksigene vrste gljiva roda <i>Alternaria</i>	13
2.3.2. Mehanizmi kontaminacije žita sa <i>Alternaria</i> spp.....	19
2.3.3. Simptomi kontaminacije žita <i>Alternaria</i> spp.....	20
2.3.4. <i>Alternaria</i> toksini.....	22
2.3.5. Fizičko hemijske osobine <i>Alternaria</i> toksina	24
2.3.6. Toksičnost <i>Alternaria</i> toksina	28
2.3.6.1. Alternariol	28
2.3.6.2. Alternariol monometil etar	29
2.3.6.3. Tenuazonska kiselina.....	29
2.3.6.4. Alvertoksini -I, -II i -III.....	30
2.4. Mogućnost redukcije sadržaja <i>Alternaria</i> toksina u procesima prerade pšenice.....	36
2.5. Određivanje <i>Alternaria</i> toksina.....	37
2.5.1. Uzorkovanje	37
2.5.2. Metode pripreme uzoraka.....	38
2.5.3. Analitičke metode.....	38
2.5.4. Referentni materijali, validacija metoda i testovi osposobljenosti.....	44
2.6. Procena rizika od pojave <i>Alternaria</i> toksina na zdravlje ljudi i životinja	45
3. Cilj rada.....	47
4. Materijal i metodi	48

4.1. Materijal.....	50
4.1.1. Uzorci pšenice.....	50
4.2. Metodi.....	54
4.2.1. Karakterizacija uzoraka pšenice.....	54
4.2.1.1. Određivanje intenziteta zaraze.....	54
4.2.1.2. Identifikacija gljiva sa zrna pšenice	54
4.2.1.3. Identifikacija vrsta iz roda <i>Alternaria</i>	55
4.2.1.4. Instrumentalno merenje površinske boje klasova i zrna pšenice	55
4.2.1.5. Određivanje udela tamnokličnih zrna.....	55
4.2.1.6. Klasifikacija klasova uz primenu vizuelne skale	56
4.2.1.7. Određivanje sadržaja vode	56
4.2.2. Tehnološki postupci	56
4.2.2.1. Postupak čišćenja pšenice.....	56
4.2.2.2. Postupak dobijanja brašna od celog zrna pšenice	57
4.2.2.3. Postupak mlevenja i separacije mlevnih frakcija	57
4.2.2.4. Postupak ekstrudiranja.....	58
4.2.3. Metodi ispitivanja prisustva <i>Alternaria</i> toksina.....	59
4.2.3.1. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode.....	59
4.2.3.2. Odabir optimalnog postupka ekstrakcije <i>Alternaria</i> toksina	63
4.2.3.3. Ispitivanje uticaja matriksa	64
4.2.3.4. Validacija metode	65
4.2.4. Metodi eksperimentalnog dizajna i statistički metodi	68
5. Rezultati i diskusija	70
5.1. Učestalost pojave i uticaj proizvodnih uslova na pojavu najčešćih <i>Alternaria</i> toksina...71	
5.1.1. Učestalost pojave <i>Alternaria</i> toksina u pšenici	71
5.1.2. Zavisnost pojave <i>Alternaria</i> toksina u pšenici od proizvodne godine	72
5.1.3. Zavisnost pojave <i>Alternaria</i> toksina u pšenici od proizvodnog regiona	74
5.1.4. Učestalost istovremene pojave više <i>Alternaria</i> toksina u pšenici	74
5.1.5. Zavisnost pojave <i>Alternaria</i> toksina u pšenici od klimatskih faktora	78
5.1.6. Odnos prisustva <i>Alternaria</i> toksina i udela tamnokličnih zrna u pšenici.....	82
5.1.7. Uticaj stimulacije i inhibicije zaraženosti sa <i>Alternaria</i> spp. na sadržaj <i>Alternaria</i> toksina u pšenici.....	83

5.2. Mogućnosti redukcije sadržaja <i>Alternaria</i> toksina primenom odabranih postupaka prerade pšenice	86
5.2.1. Redukcija sadržaja <i>Alternaria</i> toksina tokom žetve pšenice	87
5.2.2. Mogućnosti redukcije sadržaja <i>Alternaria</i> toksina primenom postupaka čišćenja pšenice	88
5.2.3. Mogućnosti redukcije sadržaja <i>Alternaria</i> toksina primenom postupaka mlevenja i razvrstavanja mliva	90
5.2.4. Mogućnosti redukcije sadržaja <i>Alternaria</i> toksina primenom postupaka ekstrudiranja	99
5.2.5. Optimizacija procesnih parametara ekstrudiranja za maksimalnu redukciju sadržaja <i>Alternaria</i> toksina	100
5.3. Procena rizika prisustva <i>Alternaria</i> toksina u pšenici primenom ispitivanih tehnoloških postupaka	109
6. Zaključak	113
7. Literatura	116
Biografija.....	134

1. Uvod

U lancu proizvodnje hrane osnovni cilj je da se obezbede dovoljne količine hrane visokog nutritivnog kvaliteta koja je zdravstveno bezbedna, bez bioloških, fizičkih i hemijskih kontaminenata.

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma filamentoznih gljiva koji mogu kontaminirati veliki broj različitih poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda, kao i hranu za životinje, usled čega se ubrajaju u grupu najpoznatijih i najučestalijih hemijskih kontaminenata hrane. Žita predstavljaju primarni izvor ljudske ishrane, pri čemu u svetskoj proizvodnji pšenica zauzima treće mesto po proizvedenoj količini, a u Srbiji zauzima drugo mesto, odmah iza kukuruza. Naučni literaturni podaci svedoče da je oko 25% ukupne svetske proizvodnje žita kontaminirano bar jednim mikotoksinom. Kao posledica klimatskih promena i globalnog zagrevanja, intenzivna pojava mikobiota na strnim žitima može proizvesti negativan uticaj na bezbednost prehrambenih proizvoda, ali i na njihov kvalitet, što nužno dovodi i do velikih ekonomskih gubitaka. Toksogene gljive koje se najčešće izoluju sa zrna pšenice pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* i *Alternaria*. Iako *Fusarium* spp. i dalje predstavlja glavni izvor kontaminacije pšenice mikotoksinima, u poslednjih nekoliko godina zbog evidentnih klimatskih promena koje utiču na poljoprivrednu proizvodnju došlo je i do pojave drugih toksigenih gljiva koje su postale važni kontaminanti pšenice. Među njima se ističu gljive iz roda *Alternaria*, posebno *A. alternata*, koja dovodi do diskolorizacije klice i semena i prouzrokuje bolest zvanu „tamnokličnost“.

Dostupni objavljeni podaci svedoče o pojavi zaraženosti pšeničnog zrna gljivama iz roda *Alternaria* u različitim zemljama sveta, uključujući Italiju, Nemačku, Kinu, Rusiju, Argentinu, Tunis i Slovačku.

Pod određenim, za njih povoljnim uslovima, pojedine vrste roda *Alternaria* produkuju toksične metabolite i alergene koji predstavljaju problem ne samo u proizvodnji i preradi žita nego su rizični za zdravlje ljudi i životinja.

Alternaria toksini mogu da izazovu akutna i hronična oboljenja, ispoljavajući citotoksičnu, kancerogenu, fetotoksičnu, teratogenu, antitumornu, antivirusnu i antibakterijsku aktivnost. Sve navedeno utiče na to da se u sklopu istraživanja u oblasti mikotoksikologije registruje porast interesovanja za *Alternaria* toksine i gljive koje ih produkuju.

Imajući u vidu toksičnost metabolita koje produkuju pojedine vrste gljiva roda *Alternaria* u sistemu od njive do trpeze, za sprovođenje sistematske kontrole pojave *Alternaria* toksina neophodne su specifične i osetljive analitičke metode koje treba da zadovolje kriterijume savremene analitičke prakse u pogledu osetljivosti i tačnosti, a da ujedno ispune zahteve vezane za jednostavnost izvođenja, što veću brzinu i ekonomičnost.

Usled mogućeg štetnog dejstva na zdravlje ljudi i životinja, kao i sve češću pojavu u žitima, *Alternaria* toksini čine izuzetan izazov kao predmet istraživanja širom sveta. Stoga su istraživanja u vezi sa *Alternaria* toksinima u razvijenim zemljama u stalnom porastu, dok je obim naučnih istraživanja koja se bave ovom problematikom u Srbiji i u zemljama regiona ograničen nepovoljnom ekonomskom situacijom.

Relativno brojne informacije su dostupne o pojavi, stabilnosti, uticaju pojedinih tehnoloških postupaka prerade na postojanost mikotoksina čije su maksimalno dozvoljene koncentracije regulisane propisima. Međutim, tek odnedavno je postala aktuelna i potreba za potpunijim informacijama o kontaminaciji useva *Alternaria* toksinima i njihovoj postojanosti tokom skladištenja i prerade, a u cilju procene rizika za zdravlje ljudi i životinja usled štetnog dejstva ovih mikotoksina (EFSA, 2011).

2. Pregled literature

2.1. Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma filamentoznih gljiva, koji su toksični ili imaju druge negativne biološke efekte po zdravlje ljudi i životinja. Naziv im potiče od grčke reči „mykes“ što znači gljiva i latinske reči „toxicum“ što znači otrov. Oni se međusobno razlikuju po vrsti toksigenih gljiva koja ih sintetiziraju, hemijskoj strukturi, mehanizmu delovanja i toksičnosti. Mikotoksine može da produkuje čitav niz rodova toksigenih gljiva. Najveći broj vrsta koje proizvode mikotoksine svrstava se u tri roda: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Dalji rodovi koji produkuju toksine su *Claviceps* i *Alternaria* (Bhat i sar., 2010). Ova jedinjenja obično nisu potrebna za rast i razvoj gljiva (Fox i Howlett, 2008) i stoga se posmatraju kao sekundarni metaboliti (Bhat i sar., 2010).

Do danas je otkriveno oko 650 različitih mikotoksina, koji po hemijskoj strukturi svrstavaju u oko 25 različitih grupa hemijskih jedinjenja (Klaffke, 2010). Tačna uloga mikotoksina u gljivama nije razjašnjena, ali je njihovo nastajanje povezano sa ekologijom i preživljavanjem organizama pod različitim uslovima (Magan i Aldred, 2007). Rast gljiva i produkcija toksina mogu se odvijati u različitim stadijumima razvoja biljaka, bilo u polju pre žetve, bilo u fazama skladištenja i transporta, ukoliko su uslovi povoljni (Bhat i sar., 2010). Sekundarni metabolizam gljiva regulisan je genetskim mehanizmima koji predstavljaju odaziv na stimuluse iz okruženja (Shwab i Keller, 2008), pri čemu su temperatura i aktivnosti vode glavni faktori koji utiču na nastajanje mikotoksina (Sanchis i Magan, 2004).

Konjugovani oblici mikotoksina, koji se još nazivaju „maskirani“ ili vezani mikotoksini mogu biti rastvoreni ili združeni sa makromolekulama. Oni mogu nastati u metabolizmu gljiva, drugih mikroorganizama, biljaka i sisara, ili mogu nastati prilikom prerade hrane (Berthiller i sar., 2009). Oblast ovoga tipa izmenjenih mikotoksina nije intenzivnije proučavana do sada, ali se veruje da oni znatno doprinose ukupnoj rasprostranjenosti mikotoksina i samim tim i bezbednosti hrane. U **Tabeli 2.1** dat je pregled najčešćih mikotoksina, njihovo poreklo i hrana u kojima se pojavljuju.

Tabela 2.1- Pregled najčešćih mikotoksina, gljiva koji ih sintetiziraju i hrana u kojima se pojavljuju (Hajslova i sar., 2011)

Mikotoksin	Gljive	Hrana
Aflatoksini Aflatoksin B1, G1, B2, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>Emericella</i> <i>astellata</i> , <i>E. venezuelensis</i> , <i>E. olivicola</i>	kukuruz, pšenica, pirinač, začini, badem, uljarice, suvo voće, sir,
Aflatoksin M1, M2	metaboliti aflatoksina B1 i B2	mleko, jaje, meso
Ohratoksini Ohratoksin A, B, C	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. alutaceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. albertensis</i> , <i>A. citricus</i> , <i>Neopetromyces</i> <i>muricatus</i> , <i>Penicillium</i> <i>viridicatum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. carbonarius</i>	žita, sušeno voće, suvo grožđe, vino, kafa, ovas, začini, raž
Ohratoksin A	metaboliti ohratoksina A	
Zearalenoni Zearalenon	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. equiseti</i> ,	ječam, zob, pšenica, sirak, susam, soja, proizvodi na bazi žita
α-zearalenon, β-zearalanon	<i>F. sporotrichioides</i> metaboliti zearalenona	

Tabela 2.1- nastavak

Mikotoksin	Gljive	Hrana
Trihoteceni tipa A: T-2 toksin, HT-2 toksin, diacetoksiscirpenol, neosolaniol, verrucarol	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Cephalosporium sp.</i> , <i>Myrothecium sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Trichothecium sp.</i> , <i>Phomopsis sp.</i> , <i>Stachybotrys sp.</i> , <i>Verticimonosporium sp.</i>	neprerađeno žito žito za ljudsku ishranu proizvodi na bazi žita hrana na bazi žita za odojčad i malu decu
Trihoteceni tipa B: nivalenol, deoksinivalenol, 3-acetilDON, 15-acetilDON, fusarenon-X Deoksinivalenol-3-glukozid	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. lunulosporum</i> metaboliti deoxynivalenola	žita i proizvodi na bazi žita
Fumonizini Fumonizini A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, Hidrolizovani i delimično hidrolizovani fumonizini	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>Alternaria alternata</i> Prehrambeni proizvodi	kukuruz i proizvodi na bazi kukuruza, sirak, špargle, pirinač
Patulin	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. longivesica</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Penicillium griseofulvum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>Byssochlamys sp.</i>	jabuke, sok od jabuke, trešnje, žita, grožđe, kruške, borovnice

Tabela 2.1- nastavak

Mikotoksin	Gljive	Hrana
Alternaria toksini altenuene, alternariol, alternariol monometil eter, altertoksin I, altertoksin II, altertoksin III, tenuazonska kiselina	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. cucumerina</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. citri</i>	pšenica, pirinač, raž, masline, sirak, duvan, jabuka, paprika, suncokretovo seme, uljana repica, hikori orah, paradajz, mandarina
Beauvericin	<i>F. bulbicola</i> , <i>F. denticulatum</i> , <i>F. lactis</i> , <i>F. phyllophilum</i> , <i>F. pseudocircinatum</i> , <i>F. succisae</i>	pšenica, kukuruz, ječam, ovseno brašno, pirinač, prezla
Ergot alkaloidi Ergocornine/inine, ergocristine/inine, ergocryptine/ inine, ergosine/ inine, ergotamine/ inine	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. africanana</i> , <i>C. fusiformis</i> , <i>C. fusiformis</i> , <i>C. paspali</i> , <i>Neotyphodium</i> <i>coenophialum</i>	pšenica, raž, ječam, proso, zob, sirak, tritikale
Fusaroproliferin	<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>F. concentricum</i> , <i>F. antophilum</i> , <i>F. begoniae</i> , <i>F. succisae</i> , <i>F. bulbicola</i> , <i>F. circinatum</i> , <i>F. udum</i> , <i>F. subglutinans</i>	pšenica, kukuruz, ječam, ovseno brašno, pirinač, prezla
Enniatini Enniatin A, enniatin A1, enniatin B, enniatin B1	<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. orthoceras</i> , neke vrste <i>Alternaria</i> , <i>Halosarpheia</i> , <i>Verticillium ssp.</i>	pšenica, kukuruz, ječam, ovseno brašno, pirinač, prezla

Od navedenih mikotoksina u **Tabeli 2.1** kao kontaminenata hrane maksimalno dozvoljene koncentracije su za ukupne aflatoksine (B1, B2, G1, G2), aflatoksin B1, aflatoksin M1, ohratoksina A, zearalenon, deoksinivalenol, fumonizin B1 i B2, i patulin regulisane propisima (European Commission, EC 1881/2006 izmena i dopuna EC 1126/2007; „Sl. glasnik RS“, 79/2014), dok je za T-2/HT-2 toksine Evropska komisija za standardizaciju dala preporuku o njihovoj dozvoljenoj maksimalnoj koncentraciji u žitu i proizvodima na bazi žita namenjenih ljudskoj upotrebi i za ishranu životinja (European Commission, 2013/165/EU). *Alternaria* toksini, ergot alkaloidi, enniantini, beauvericin i fusaroproliferin su takođe česti kontaminanti hrane i poslednjih godina predmet su istraživanja u različitim oblastima naučno-istraživačkog rada, ali njihove maksimalno dozvoljene koncentracije u hrani i u hrani za životinje za sada nisu regulisane propisima EU.

Mikotoksikoze su zajednički naziv za bolesti ljudi i životinja izazvanih dejstvom mikotoksina. Pretežno nastaju kao posledica konzumiranja kontaminirane hrane, a u manjoj meri nastaju i nakon udisanja mikotoksina ili njihovog unosa preko kože u organizam (International Agency for Research on Cancer, IARC, 1993; IARC, 2002; IARC, 2012). Mikotoksini mogu biti ili akutno ili hronično toksični. Štetno dejstvo mikotoksina zavisi od unete koncentracije mikotoksina, kao i od trajanja izloženosti mikotoksinima putem ishrane, od zdravstvenog stanja organizma ljudi i životinja, kao i od starosti i pola. U prirodi je malo verovatno da se jedan mikotoksin pojavljuje bez još nekoliko drugih mikotoksina, a simptomi kod ljudi i životinja koji su konzumirali hranu kontaminiranu mikotoksinima variraju u zavisnosti od toga koji su mikotoksini prisutni (Husein i Brasel, 2001). Mnogobrojni literaturni podaci svedoče o neurotoksičnom, kancerogenom, estrogenom, mutagenom i imunosupresivnom efektu pojedinih mikotoksina. Većina mikotoksina može uticati na imuni sistem čoveka i životinja, što može imati za posledicu podložnost drugim bolestima (Prelusky i sar., 1993). Dijagnoza mikotoksikoza u opštem slučaju je otežana, pošto su biološki efekti mikotoksina raznovrsni i često nespecifični, praćeni simptomima kao što su: mučnina, gubitak apetita, smanjena konzumacija hrane i smanjenje telesne mase (Prelusky i sar., 1993).

S druge strane pojava toksigenih gljiva i mikotoksina u lancu ishrane predstavlja globalni problem. Naime, na osnovu procene Organizacije Ujedinjenih nacija za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organization of the United States*, FAO) oko 25% ukupne svetske proizvodnje žita kontaminirano je bar jednim mikotoksinom, pri čemu globalni gubici zbog mikotoksina se kreću u rasponu od oko 1000 miliona tona žita godišnje (http://www.fao.org/ag/agn/agns/chemicals_mycotoxins_en.asp). Sve navedeno, povećava potrebu za stalnim istraživanjima u oblasti mikologije i mikotoksikologije.

2.2. Vrste roda *Alternaria* kao kontaminanti hrane

Rod *Alternaria* od kada je prvi put opisan 1816. godine (Nees) njegove vrste su opsežno istraživane od strane mikologa iz različitih naučno-istraživačkih oblasti. Procenjuje se da postoji nekoliko stotina vrsta ovog roda, ali je teško sakupiti tačne podatke o broju vrsta koje pripadaju ovom rodu zbog ogromnog broja sinonima nepoznate taksonomske ispravnosti. U savremenoj dijagnostici, pored klasičnih fitopatoloških metoda identifikacije, razvijanjem tehnika molekularne biotehnologije, naročito metode lančane reakcije polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) omogućen je novi način identifikacije i karakterizacije fitopatogenih mikroorganizama (Ivanović i sar., 2004). Molekularne metode zbog visoke osetljivosti, specifičnosti i brzine izvođenja, našle su primenu i u detekciji *Alternaria* vrsta, čime su unapređena taksonomska istraživanja i bolje definisani odnosi unutar taksonomskih kategorija. S druge strane, pouzdana i precizna identifikacija vrsta roda *Alternaria* je od izuzetnog značaja i zbog blagovremenih i efikasnih mera suzbijanja fitopatogenih vrsta ovog roda.

Vrste roda *Alternaria* su široko rasprostranjene i obuhvataju veliki broj saprofitnih i fitopatogenih vrsta. Kao izraziti kosmopoliti sa izuzetnom sposobnošću prilagođavanja različitim uslovima spoljašne sredine, prisutne su i u vlažnim i u semi-aridnim regionima, gde mogu inficirati brojne biljne kulture, napadajući listove, stabljike, cvetove i plodove (Desphande, 2002). Pored toga, mogu se naći širom sveta na različitim materijama kao što su fasade zgrada, na spomenicima, celulozi, papiru, koži, tekstilu, prašini, zemljištu, kao i na izumrlim biljnim tkivima (Rotem, 1994).

Alternaria spp. su identifikovane na žitima, uljanim kulturama, povrću (fam. *Apiaceae*, *Sola-naceae*, *Brassicaceae* itd.), voću (citrusima, maslini, jabuci) i ukrasnom bilju (Thomma, 2003). Pored šteta koje uzrokuju na polju i sposobnosti razvoja i na niskim temperaturama čak i na $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sommer, 1985) *Alternaria* spp. mogu prouzrokovati kvarljivost poljoprivrednih proizvoda tokom skladištenja, transporta i u procesu prerade (Ostry, 2008). *Alternaria* spp. imaju izuzetnu sposobnost da prežive duži vremenski period i sačuvaju vitalnost i do nekoliko godina (Rotem, 1994).

Konidije *Alternaria* spp. su obično prisutne na mnogobrojnom voću i povrću, koje može postati vidno inficirano, posebno kad je tkivo oslabljeno nakon dugog stajanja ili hlađenja. Voće koje je osetljivo na vrste roda *Alternaria* su jabuke (King i Schade, 1984, loc. cit. Battilani i sar., 2009), grožđe, borovnice, breskve, trešnje, citrusi (limun i pomorandže) (Stinson i sar., 1980, 1981, loc. cit. Battilani i sar., 2009) i mandarine (Logrieco i sar., 1988, loc. cit. Battilani i sar., 2009).

Od povrća, osetljivi su na vrste roda *Alternaria* krastavci, bundeva, plavi patlidžan, paprika, krompir, paradajz (Harwig i sar., 1979; Mundt i Norman, 1982, loc. cit. Battilani i sar., 2009; Andersen i Frisvad, 2004), grašak, luk i kupus (Balaž i sar., 2010). Vrste roda *Alternaria* nađene su i u maslinama u Apuliji (južna Italija) (Bottalico i Logrieco, 1993, loc. cit.

Battilani i sar., 2009) i u suncokretu (Logrieco i sar., 1988, loc. cit. Battilani i sar., 2009; Dalcero i sar., 1989). *A. alternata* nalazi se uglavnom na semenu i korenu šargarepe. *A. radicina* je patogen korena koji prouzrokuje sušenje sadnica i listova šargarepe i prouzrokovatelj je i crne truleži korena šargarepe, a *A. dauci* prouzrokovatelj lisne pegavosti i sušenja listova šargarepe (Tylkowska, 1992, Pryor i sar., 1998, 2001; Konstantinova i sar., 2002; Coles i Wicks, 2003, loc. cit. Battilani i sar., 2009).

Alternaria vrste pod uticajem određenih spoljašnjih faktora produkuju *Alternaria* toksine, odnosno sekundarne metabolite različite toksičnosti koji mogu imati štetan uticaj na zdravlje ljudi i životinja (Logrieco i sar., 2009). Neki od *Alternaria* toksina ispoljavaju fetotoksični i teratogeni efekat na žive organizme, a u mnogim *in vitro* istraživanjima zabeležena su takođe i mutagena i genotoksična svojstva ovih patogena. Pojava ezofagealnog kancera kod ljudi u pojedinim regionima Kine dovodi se u vezu sa prisustvom *Alternaria* toksina u žitima (Liu i sar., 1992).

Nadalje, spore *Alternaria* spp. imaju alergeno dejstvo, uzrokovano glikoproteinom ALTA1 i kod osetljivih osoba mogu uticati na smetnje u respiratornom sistemu, kao i na razvoj astme kod dece (Corden i sar., 2003, Kilic i sar., 2010; Pavón i sar., 2010; Pryor, 2011; Lyons 2011). Usled prisustva ovih patogena u pekarama, smatra se da su ovi patogeni čest uzrok pojave "pekarske astme" (Klaustermeyer i sar., 2006). Pored toga, kako navode Linas i sar. (1998) spore *Alternaria* spp. mogu prouzrokovati epidermalna oštećenja i najčešće se javljaju kod pacijenata koji primaju terapiju kortikosteroidima ili kod pacijenata sa slabo kontrolisanim dijabetesom (lok. cit. Vučković, 2012).

Radi preduzimanja pravovremenih mera u cilju kontrole pojave *Alternaria* spp. brojni istraživači širom sveta radili su na različitim modelima prognoze pojave ovog patogena na bazi meteoroloških faktora. Ovi modeli omogućavaju pravovremenu primenu preventivnih mera u cilju kontrole ovog patogena u Australiji (Stennett i Beggs, 2004), Argentini (Moschini i sar., 2006) Pensilvaniji, SAD (Madden i sar., 1978) i Španiji (Iglesias i sar., 2007, De Linares i dr, 2010). Sundström (2010) je u Švedskoj postavio osnovu za razvoj modela prognoze pojave *Alternaria* toksina u strnim žitima, fokusirajući se na pojavu vrsta roda *Alternaria* i tenuazonske kiseline (TeA) koju produkuju ovi mikroorganizmi. Neke vrste *Alternaria* spp. imaju izrazito alergensko dejstvo i uzrok su pojave astme, te prognoza pojave *Alternaria* spp. je od izuzetnog značaja (Kilic i sar., 2010).

2.3. Pojava, rasprostranjenost i štetan uticaj vrsta roda *Alternaria* na žitima

2.3.1. Toksigene vrste gljiva roda *Alternaria*

U novije vreme, vrste gljiva roda *Alternaria* predstavljaju glavne kontaminente među izolovanim vrstama gljiva strnih žita (Deshpande, 2002). *Alternaria* spp. su prouzrokovajući karakterističnog oboljenja poznatog kao crna pegavost i javljaju se na svim nadzemnim delovima strnih žita. Tamna boja inficiranih delova biljnog tkiva potiče od crnog pigmenta melanina, koji pruža zaštitu gljivama od nepovoljnih uslova spoljašne sredine, temperaturnih stresova, UV zračenja i jedinjenja koja luče njihovi antagonisti, utičući na vitalnost, opstanak i duži životni vek patogena (Linan i sar., 1998; Kawamura i sar., 1999, lok. cit. Vučković, 2012). Ovi patogeni narušavaju izgled i kvalitet zrna, kao i zdravstvenu bezbednost proizvoda na bazi žita kako za ljudsku, tako i za ishranu životinja (Battilani i sar., 2009; EFSA, 2011).

Kako navodi Simmons (2007) u mnogim zemljama širom sveta na žitima opisan je veći broj infektivnih vrsta roda *Alternaria*: *A. alternata*, *A. triticola*, *A. tenuissima*, *A. metachromatica*, *A. frumenti*, *A. oregonensis*, *A. triticimaculens*, *A. californica*, *A. longissima*, *A. triticina*, *A. arborescens*, *A. graminicola*, *A. infectoria*. U mediteranskim zemljama *A. alternata* i *A. tenuissima* su najčešće identifikovane vrste na pšenici (Bensassi i sar., 2009), dok je *A. triticina* prisutna u Argentini, Indiji, Italiji, Meksiku i severnoj Africi.

U **Tabeli 2.2** dat je pregled identifikovanih vrsta roda *Alternaria* u prirodno kontaminiranoj pšenici u različitim državama.

Osim pšenice, rasprostranjenost *Alternaria* spp. zabeležena je na ovsu (Kwasna i Kosiak, 2003; Kosiak i sar., 2004), ječmu (Kosiak i sar., 2004; Medina i sar, 2006; Hudec, 2007) i raži (Grabarkiewicz Szczesna i sar, 1989; Semaskiene i sar., 2005). Na sirku identifikovane su vrste *A. infectoria* i *A. alternata* (Ansari i Shrivastava, 1990; Broggi i sar., 2007), a na kukuruzu *A. alternata*, *A. radicina*, *A. tenuissima* i *A. infectoria* (Torres i sar., 1998; Broggi i sar, 2007).

Alternaria spp. su takođe značajni prouzrokovajući bolesti biljaka i u našoj zemlji, kako u polju, tako i u skladištu (Stojanović, 1999; Bulajić, 2006; Maširević i Jasnić, 2006; Balaž i sar., 2010a, lok. cit. Vučković, 2012). Kako navode Jevtić i sar. (2008) učestalost i intenzitet pojave na strnim žitima menjaju se u zavisnosti od regiona i godine.

Štete koje prouzrokuju ovi patogeni na pšenici i drugim žitima ne odnose se u tolikoj meri na prinost, koliko na gubitke koji nastaju u postžetvenim delatnostima. Tamnoklična zrna pšenice spadaju u kategoriju neodvojivih primesa, tako da se u fazi pripreme pšenice za mlevenje ne mogu izdvojiti iz zrnene mase, izuzev u slučaju da mlin u odeljenju za pripreme pšenice za mlevenje raspolaže uređajem koji radi na bazi kolorimetrije (Sortex). Tako, veće zaraze pšenice *Alternaria* spp. dovodi do tamne obojenosti brašna. Pri proizvodnji krupice (semoline) od durum pšenice, sirovine za proizvodnju testenine, crna pegavost

prouzrokovana *Alternaria* spp. predstavlja veliki problem, jer broj crnih tačaka u proizvedenoj krupici (semolini) se povećava, a za posledicu ima da su vidljive na gotovoj testenini i narušavaju izgled i boju testenine. Štetan uticaj ovih patogena u pekarsko-konditorskoj industriji ogleda se u smanjenju tehnološkog kvaliteta pšenice, jer ovi mikroorganizmi mogu u značajnoj meri da naruše tehnološki kvalitet zrna razarajući gluten (Magan i sar., 1984; Logrieco i sar., 2003, lok. cit. Vučković, 2012).

Tabela 2.2 – Pregled identifikovanih vrsta roda *Alternaria* u prirodno kontaminiranoj pšenici u različitim državama

Zemlja	<i>Alternaria</i> spp.	Referenca	
Argentina	<i>A. alternata</i>	Patriarca i sar. (2007)	
	<i>A. tenuissima</i>		
	<i>A. longipes</i>		
	<i>A. arborescens</i>		
	<i>A. gaisen</i>		
	<i>A. mali</i>		
	<i>A. triticimaculans</i>		Perelló i Mónaco (2007)
	<i>A. triticina</i>		
Estonija	<i>A. alternata</i>	Kütt i sar. (2010)	
	<i>A. tenuissima</i>		
Indija	<i>A. triticina</i>	Prasada i Prabhu (1962)	
Mađarska	<i>A. hungarica*</i>	Tóth i sar. (2011)	
Norveška	<i>A. infectoria</i>	Kossiak i sar. (2004)	
	<i>A. tenuissima</i>		
	<i>A. alternata</i>		
Slovačka	<i>A. alternata</i>	Mašková i sar. (2012)	
	<i>A. tenuissima</i>		
Srbija	<i>A. tenuissima</i>	Ivanović i sar. (2001)	
	<i>A. longipes</i>		
Tunis	<i>A. alternata</i> ,	Bensassi i sar. (2009)	
	<i>A. tenuissima</i>		
	<i>A. japonica</i>		

*nova vrsta, minorni folijarni patogen

Ispitivanjem mikološke kontaminacije pšenice i proučavanjem uticaja stepena mikološke kontaminacije na intenzitet narušavanja fizičkih, hemijskih i bioloških osobina pšenice, kao i na njen tehnološki kvalitet u poslednjih 15 godina bavili su se i mnogi domaći autori.

U doktorskoj disertaciji Bočarov – Stančić (1996) jedan od ciljeva bio je determinacija mikopopulacije u uzorcima kukuruza, pšenice i ječma sa teritorije Jugoslavije u dve uzastopne, po vremenskim prilikama izrazito različite godine (semi – aridna 1990. i semi – humidna 1991). U ispitivanim uzorcima pšenice i ječma (roda 1991) često je bila prisutna i

Alternaria alternata (kod 14,3% uzoraka pšenice, odnosno 33,3% ječma). U uzorcima zrna kukuruza poreklom iz 1990. godine takođe je identifikovana i gljiva roda *Alternaria*, pri čemu je procenat kontaminiranih uzoraka kod sveže požnjevenih hibrida, kod prirodno sušenih uzoraka i veštački sušenih uzoraka iznosio 40%, 30% i 10%, odnosno. Kontaminacija zrna kukuruza roda 1991. godine gljivama roda *Alternaria* kod prirodno sušenih uzoraka iznosilo je 33,3%, dok u veštačkim suvim uzorcima nisu bile identifikovane.

Značajan pad tehnološkog kvaliteta pšeničnog zrna usled napada *Fusarium* spp. i *Alternaria* spp. je dokazan i u istraživanjima Šarić i sar. (1997). Prema ovim autorima, povećana aktivnost enzima u uzorcima sa jakom infekcijom poljskim gljivama ima negativan uticaj na fizičke osobine testa, koji može da vodi do potpune neupotrebljivosti pšenice za dalju preradu. Takođe, prisustvo ovih patogena utiče značajno na promenu biološkog kvaliteta zrna, odnosno jaka infekcija ovim gljivama može da ima katastrofalne posledice na semenski kvalitet i mogućnost reprodukcije (Šarić i sar., 2000).

U višegodišnjim ispitivanjima (žetve 2002, 2003. i 2004) mikopopulacije semena strnih žita, durum pšenice, tritikalea, ozimog ječma i ovasa sa većeg broja lokaliteta u Srbiji, najzastupljenije su bile gljive iz rodova *Alternaria* i *Fusarium*. Najveći intenzitet zaraženosti je utvrđen kod ovasa, zatim sledi tritikale, dok je nivo zaraženosti durum pšenice i ječma bio na istom nivou. Na pšenici roda žetve 2002. godine na ispitivanim uzorcima semena strnih žita najzastupnije su bile vrste iz roda *Alternaria* (ovas - 72,2%, durum pšenica - 25,1%, tritikale - 29,3% i ječam - 28,8%). Kljavost ispitivanog semena je takođe bila najniža kod ovasa (22,5%), dok je kljavost ostale tri kulture smanjena u manjem obimu (ječam - 80,1%, durum pšenica - 84,7%, tritikale - 91,6%). Najzastupljenije gljive na semenu strnih žita iz vegetacije 2002/2003. godine takođe su bile vrste iz roda *Alternaria* koje su činile 70,3% ukupne mikopopulacije semena durum pšenice, 78,1% ovasa, 82,2% tritikalea i 90,1% ukupne mikopopulacije semena ječma. Zaraženost zrna gljivama iz roda *Alternaria* bila je između 23,2% kod ovasa i 55,4% kod ječma.

Proizvodne 2003/04. godine nizak tehnološki kvalitet zrna pšenice u Srbiji je bio ograničavajući faktor za preradu i izvoz pšenice. To je dovelo do velikih problema u mlinskoj industriji, s obzirom na to da su mlinari bili primorani da sa malim udelima mešaju takvu pšenicu sa visokokvalitetnom, kako bi dobili brašno adekvatnih pecivnih svojstava. Pretpostavka stručnjaka je bila da se energija testa znatno smanjila usled prisustva gljive *Alternaria* spp. koja je bila zastupljena na 60-70% zrna pšenice (Balaž i sar., 2003, 2005; Bagi i sar., 2004, 2005). Nadalje, na bazi analize strukture primesa ispitivanih uzoraka sorti pšenice (pšenica roda 2004. godine) sagledani su mogući uzroci odstupanja tehnološkog kvaliteta od potencijala sorti da ostvare određeni nivo tehnološkog kvaliteta (Šarić i sar., 2004). Od strane ovih autora je pri ispitivanju neodvojivih primesa utvrđeno da one imaju direktan uticaj na izmenjen tehnološki kvalitet, kao posledica oštećenja od napada poljskih štetočina, odnosno pre svega uboda žitnih stenica i poljskih gljiva (*Fusarium* spp. *Alternaria* spp. i druge). Utvrđeno je da u slučaju većeg udela pojedinih kategorija ovih primesa dolazi do izuzetno značajnog pogoršanja tehnološkog kvaliteta pšenice, čak do nivoa neupotrebljivosti za

preradu, a stepen pogoršanja tehnološkog kvalitet pšenice zavisni od udela oštećenih zrna, ali i od faze razvoja zrna u kome je došlo do oštećenja.

Takođe, u doktorskoj disertaciji Stojanović (1999) ispitivan je stepen mikološke i mikotoksikološke kontaminacije uzoraka pšenice i brašna (šest sorti) sa tri različita lokaliteta roda 1995/1996. godine, podeljenih u četiri kvalitetne frakcije (zdrava frakcija, tamnoklična frakcija, malo fuzariozna frakcija i jako fuzariozna frakcija) i uticaj stepena mikološke i mikotoksikološke kontaminacije na intenzitet narušavanja fizičkih, hemijskih i bioloških osobina pšenice, kao i na njen tehnološki kvalitet U frakcijama pšenice na lokalitetu Kruševca utvrđeno je prisustvo 9 rodova gljiva, pri čemu su dominirale gljive roda *Fusarium* (77,78%), zatim gljive iz roda *Alternaria* (13,78%) i *Gilmaniella* (4,44%). Dominantne vrste u okviru ovih rodova bile su: *A. alternata* (67,74%), *F. oxysporum* (38,29%) i *G. humicola* (4,44%). U mikopopulaciji roda *Alternaria*, determinisane su još dve vrste *A. raphani* (12,90%) i *A. cheiranthi* (19,35%). Na lokalitetu Kikinde registrovano je 13 rodova gljiva, pri čemu su u uzorcima pšenice dominirale *Fusarium* vrste (59,2% u odnosu na ukupan broj gljiva) i *Alternaria* vrste (13,8%). Najučestalija vrsta roda *Fusarium* koja je izolovana iz ispitivanih uzoraka pšenice bila je *F. oxysporum* (50%), dok je dominantna vrsta roda *Alternaria* bila *A. alternata* (90,48% u odnosu na mikopopulaciju ovog roda), a još je identifikovana i vrsta *A. raphani* (9,52%). Iz uzoraka pšenice područja Pirot izolovane gljive su svrstane u četiri roda: *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* i *Cladosporium*. Dominantne vrste pripadale su rodu *Alternaria* (68,18%), dok su *Fusarium* vrste bile prisutne sa udelom od 22,72%. Od *Alternaria* vrsta uočena je dominacija vrste *A. alternata* (60% u ukupnoj mikopopulaciji *Alternaria* spp.). Vrednosti zapreminske mase opadale su od zdravih zrna ka tamnokličnim i malo fuzarioznim frakcijama, a ubedljivo najniže su bile kod jako fuzarioznih uzoraka pšenice na svim lokalitetima. Masa 1000 zrna ispitivanih uzoraka pšenice je bila najviša kod tamnokličnih frakcija i pravilno se smanjivala ka jako fuzarioznim frakcijama pšenice. Najveći procenat najkrupnijih zrna bio je skoncentrisan u zdravim i tamnokličnim uzorcima pšenice, a najsitnija zrna su redovno bila prisutna u jako fuzarioznim uzorcima. Energija klijanja i klijavost su bile izuzetno visoke kod zdravih i tamnokličnih frakcija. Ove vrednosti biološkog kvaliteta osetno su opadale kod malo fuzarioznih i jako fuzarioznih frakcija pšenice, gde je došlo do povećanja broja nenormalnih klijanaca i bolesti zrna u njima. Vlažnost brašna svih ispitivanih sorti se pravilno smanjivala od zdravih ka jako fuzarioznim frakcijama. Slične konstatacije važe i za nivoe izbrašnjavanja, dok sadržaj pepela brašna stoji u indirektnoj zavisnosti sa stepenom izbrašnjavanja. Sve ispitivane sorte brašna su imale visok sadržaj proteina, a najviši su bili kod brašna dobijenih od jako fuzarioznih frakcija pšenice. Sadržaj i kvalitet glutena u pšeničnom testu opadao je od zdravih ka jako fuzarioznim uzorcima, kod kojih je pokazivao najslabije tehnološke osobine (lepljiv, krt i nepovezan gluten, sivo mrke boje). Strukturni Berlinerov broj Q_0 i proteolitički Berlinerov broj Q_{30} su se manje-više pravilno smanjivali od zdravih ka jako fuzarioznim frakcijama na svim lokalitetima. Rastegljivost glutena određena "probom stajanja" definiše njegov kvalitet. Zdrave frakcije imale su srednje rastegljiv gluten, uglavnom čvrst, sedefast i elastičan. Kvalitet glutena postepeno je opadao kod tamnokličnih i malo fuzarioznih frakcija, da bi kod jako fuzarioznih pokazao najslabiji kvalitet (lepljiv, mek, neelastičan i sluzav).

Isti autori, Stojanović i sar. (2002) pri ispitivanju mikološke kontaminacije pšenice i brašna na uzorcima dve sorte sa lokaliteta Pirota, utvrdili su slabiji stepen gljivične infekcije, koja je varirala od 0,79 do 0,88 gljive po zrnu, pri čemu su determinisane mikopopulacije pripadale rodovima *Alternaria* (75,0%), *Fusarium* (12,5%) i *Penicillium* (12,5%). U mikopopulaciji roda *Alternaria* determinisane su četiri vrste, pri čemu je *A. alternata* (Fr.) Keisler (*A. tenuis* C.G. Ness) najučestalija sa udelom od 49%, zatim slede *A. sonchi*, *A. radicina* i *A. dianchi* sa udelom od po 17,0% koja se javlja u umerenoj klimi širom sveta i izaziva poleganje i propadanje klijanaca i trulež korena u polju. Slaba infekcija gljivama, kod ispitivanih uzoraka pšenice i brašna, potvrđena je kroz postojanost i dobar biološki i tehnološki kvalitet kod obe ispitivane sorte.

Godinu dana kasnije u saopštenju Stojanović i sar. (2003) su objavljeni rezultati ispitivanja mikološke i mikotoksikološke kontaminacije pšenice i njenog uticaja na tehnološki kvalitet na frakcijama (zdrava, tamnoklična, malo fuzariozna i jako fuzariozna) uzoraka pšenice (Levčanka) koje su poticale sa dva ogleđna mesta. U ispitivanim uzorcima pšenice identifikovano je prisustvo sledećih rodova gljiva: *Alternaria* (12,27%), *Aspergillus* (3,03%), *Cladosporium* (1,52%), *Culvularia* (1,52%), *Fusarium* (60,61%), *Gilmaniella* (7,58%), *Monilia* (4,55%), *Penicillium* (6,07%), *Rhizopus* (1,52%) i *Scopulariopsis* (1,52%), pri čemu je stepen infekcije navedenim gljivama u frakciji zdravih zrna bio najmanji (od 0,83 do 1,08 gljiva po zrnu), u frakciji zrna sa tamnom klicom veći (od 2,42 do 2,94 gljiva po zrnu), dok su frakcije sa jako fuzarioznim zrnima pokazivale najveću osetljivost na kontaminaciju gljivama (stepen infekcije je varirao od 2,76 do 3,21 gljiva po zrnu). Kvalitet testa praćen je preko sadržaja i kvaliteta vlažnog glutena. Utvrđeno je da je najveća vrednost sadržaja vlažnog glutena kod zdravih i tamnokličnih frakcija pšenice, da bi kod jako fuzarioznih frakcija dostigla najniži nivo. Potpuno identičan trend dobijen je i za strukturni i za proteolitički Berlinerov broj (Q_0 i Q_{30}) pri ispitivanju kvaliteta vlažnog glutena u navedenim frakcijama pšenice. Rastegljivost glutena praćena je probom stajanja glutena u slanom rastvoru. Gluten zdravih frakcija je bio mek, umereno rastegljiv i sedefast. Kvalitet glutena je postepeno opadao kod frakcija sa tamnom klicom i frakcija sa malo fuzarioznih zrna da bi najslabije osobine imao kod frakcije sa jako fuzarioznim zrnima. Kod ove frakcije gluten je bio suviše rastegljiv, jako mek i sluzav, bez elastičnosti, što ukazuje da su fuzarioze na žitima najviše uticale na pogoršanje tehnološkog kvaliteta.

Takođe, Šarić i sar. (2008) ispitivali su uticaj gljiva na zdravstvenu bezbednost i tehnološki kvalitet *Triticum aestivum*. Cilj ispitivanja je bio da se utvrdi prisustvo gljiva u zrnoj masi pšenice. Posebno je bilo važno da se izvrši identifikacija izolovanih vrsta i to pre svega toksigenih vrsta gljiva kao i ispitivanje njihovog uticaja na tehnološki kvalitet i zdravstvenu bezbednost pšenice. Ispitano je šest sorti pšenice kontaminiranih gljivama i svi uzorci su senzorno razdvojeni na četiri frakcije zrna: zdrava, tamnoklična, malo i jako fuzariozna. Kontaminacija zrna pšenice gljivama, posebno iz roda *Alternaria* pogoršava kvalitet pšeničnog zrna u zavisnosti od nivoa zaraze i sadržaja inficiranih zrna. Poljske gljive razaraju zrna pšenice, smanjuju tehnološki kvalitet i zdravstvenu ispravnost.

Stanković i sar. (2007) ispitivali su učestalost toksigenih vrsta *Fusarium* i fuzariotoksina u zrnu pšenice u Srbiji. Osamdeset osam i 40 uzoraka pšenice, prikupljenih neposredno pred žetvu u 2005. i 2006. godini u različitim agroekološkim uslovima u Srbiji proučavani su radi praćenja pojave *Fusarium* spp. i stvaranja fuzariotoksina. Najveći broj uzoraka bio je zaražen vrstama roda *Fusarium* (81,8 i 65,0%), a zatim sa *Alternaria* spp. (36,3 i 17,5%) sa intenzitetom 9,4 - 84,0% u 2005. i 23,4-80,6% u 2006. godini.

Autori Krnjaja i sar. (2007) su proučavali dinamiku pojave i učestalosti populacija *Fusarium* vrsta na uskladištenom zrnu kukuruza. Na osnovu proučavanja pojave gljiva na uskladištenom kukuruzu, koji je bio namenjen za ishranu životinja, utvrđeno je da su u periodu od februara 2005. do marta 2006. godine neke gljive bile prisutne sukcesivno (*Fusarium* spp., *Penicillium* spp.), druge diskontinuirano sa prekidom od jednog (*Nigrospora* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Alternaria* spp.), tri (*Mucor* spp., *Chaetomium* spp., *Rhizopus* spp.) ili četiri meseca (*Cladosporium* spp.), a treće sporadično u toku tri (*Epicoccum* spp., *Rhizopus* spp., *Trichothecium* spp.), dva (*Gliocladium* spp.) ili jednog meseca (*Papulaspora* spp., *Phialophora* spp.).

Pri ispitivanju mikopopulacije sirka u istraživanjima Lević i sar. (2008) rezultati ukazuju na veliku raznovrsnost mikobiota semena sirka i varijabilnost u intenzitetu pojave pojedinih vrsta od kojih su najučestalije vrste roda *Alternaria* (10 - 100%, prosek 86,6%).

Pri ispitivanju prisustva toksigenih *Fusarium* vrsta i fuzariotoksina deoksinivalenola i zearalenona u ozimoj pšenici roda 2009. godine Krnjaja i sar. (2011) ustanovili su da su najčešće izolovane vrste gljiva pripadale rodovima *Alternaria* (81,55%) i *Fusarium* (12%), a zatim su sledili *Rhizopus* spp. (3,75%), *Acremoniella* spp. (1,15%) i druge gljive koje su izolovane sa udelom manjim od 1% (*Acremonium* spp., *Arthrimum* spp., *Aspergillus* spp., *Bipolaris* spp., *Chaetomium* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp. i *Ramichloridium* spp.).

U istraživanjima Bodroža-Solarov i sar., (2012) došlo se do saznanja da brašno dobijeno od kontaminirane pšenice gljivama roda *Fusarium* spp. i *Alternaria* spp. pokazuju manju moć upijanje vode i manju stabilnost tokom mešenja, kao i veći stepen slabljenja proteinskog kompleksa tokom zagrevanja u odnosu na brašno od pšenice koje je tretirano fungicidima.

U istraživanjima Lević i sar. (2012) na uzorcima zrna ječma, kukuruza, soje i suncokreta (iz žetve 2008. godine) rezultati ukazuju na veliku raznovrsnost mikobiota na ispitivanim semenima žita i industrijskih biljaka u Srbiji ukupno su izolovali 41 vrstu gljiva, od toga na zrnu ječma 35 vrsta ili 87,8%, na zrnu soje 17 vrsta ili 41,5%, suncokreta 16 vrsta ili 39,0% i kukuruza 15 vrsta ili 36,9% i varijabilnost u intenzitetu pojave pojedinih vrsta gljiva od kojih su najučestalije vrste roda *Alternaria* na zrnu ječma (99,5%), suncokreta (52,9%) i soje (50,0%). Osim toga, na zrnu ječma utvđena je statistički značajna negativna korelacija između intenziteta napada *F. graminearum* i *Alternaria* spp. ($r = -0,678^*$), kao i između *Fusarium* spp. i *Alternaria* spp. ($r = -0,614^*$).

Cilj istraživanja Vučković i sar. (2012) bio je da se oceni intenzitet zaraze roda *Alternaria* na zrnu spelte (*Triticum aestivum* spp. *Spelta*), kao i da se uporedi intenzitet zaraze oljuštenih zrna (bez plevičastog omotača) i zrna sa plevičastim omotačem uz determinaciju

dominantnih vrsta *Alternaria* spp. Pregledom i ocenom zaraženosti zrna utvrđeno je da su oljuštena zrna imala manji stepen zaraze za 50% u odnosu na zrna sa plevičastim omotačem. Plevičasti omotači su se pokazali kao fizička zaštita od patogena. Determinisane su vrste *A. tenuissima* i *A. alternata*. Dominantna vrsta u istraživanjima je bila *A. tenuissima* (90%).

2.3.2. Mehanizmi kontaminacije žita sa *Alternaria* spp.

Gljive roda *Alternaria* prezimljavaju na zaraženim ostacima useva, semena i korova u vidu micelije, konidija ili spora (Laemmlen, 2001), a mogu se širiti putem insekata, vetra, kiše, kao i prekomernim navodnjavanjem (Battilani i sar., 2009). Tokom vegetacije u zemljištu širi se micelijom, dok vazдушna strujanja prenose konidije i spore patogena na nadzemne delove biljaka.

Infekcija žita od strane *Alternaria* spp. se ostvaruje putem konidija u fazi cvetanja i formiranja zrna. *Alternaria* vrste proizvode ekstracelularne enzime (kutinaze, lipaze, endo- i egzo-glukonaze), koji u procesu infekcije razgrađuju polimere ćelijskog zida domaćina (Thomma, 2003).

Uslovi spoljašnje sredine koji pogoduju nastanku infekcije roda *Alternaria* zavise, pre svega, od vrste ovog roda kao i od domaćina, ali interakcija odgovarajuće temperature i vlažnosti, usled obilnih padavina, zadržavanja rose ili prekomernog navodnjavanja neophodni su za razvoj ovog patogena (lok. cit. Vučković, 2012). U tkivo domaćina prodiru kroz oštećena mesta, stome ili kutikulu. Optimalna temperatura za razvoj micelije je 18 – 25 °C, dok su temperaturni minimum i maksimum 4 °C odnosno 35 °C. Relativna vlažnost vazduha i aktivnost vode (količina slobodne vode a_w) su takođe značajni faktori u razvoju infekcije. U optimalnim temperaturnim uslovima, za razvoj micelije potrebno je zadržavanje vlage na biljnim delovima minimum 5-8 h (Rotem, 1994; Barkai-Golan, 2008, lok. cit. Vučković, 2012). Prvi simptomi infekcije nastaju nakon 2 do 3 dana (Battilani i sar., 2009). U periodu kasne vegetacije povoljni klimatski uslovi i prekomerne padavine pogoduju ne samo razvoju crne pegavosti na strnim žitima već i produkciji altenuena (ALT), alternariola (AOH), alternariol metil etra (AME) i tenuazonske kiseline (TeA) (Magan i sar., 1984). Pored toga, neke *Alternaria* vrste mogu rasti čak i na niskim temperaturama; minimalna temperatura za razvoj iznosi -3 °C (Sommer, 1985). Ova činjenica objašnjava mogućnost kvarenja voća i povrća tokom transporta i skladištenja u hladnjačama, kao posledice infekcije *Alternaria* spp. (Ozcelik i sar., 1990). U slučaju žita, žetva tokom kišnog perioda ili skladištenje u uslovima visoke vlažnosti pogoduju razvoju *Alternaria* spp. (Bottalico i Logrieco, 1998). Tokom skladištenja, *Alternaria* spp. se mogu preneti i sa zaraženih biljnih proizvoda na zdrave putem sekundarnih infekcija (Rotem, 1994; Barkai-Golan, 2008).

2.3.3. Simptomi kontaminacije žita *Alternaria* spp.

Generalno, vrste roda *Alternaria* napadaju biljke oslabljene usled dejstva raznih faktora, kao što su nedostatak vlage, pojava temperaturnih ekstrema, zaraženosti biljaka nekim drugim patogenima i starenjem pojedinih biljnih organa.

Kod strnih žita *Alternaria* spp. napadaju sve nadzemne organe prouzrokujući crnu pegavost. Zaraženi delovi biljaka nekrotiraju i dobijaju crnu boju, što dovodi do raspadanja biljnog tkiva i inhibiranja fotosinteze. Usled infekcija, na zaraženom tkivu, formiraju se crni koncentrični krugovi u kojima se nalaze toksični metaboliti, dok se na oštećenom tkivu formira fina, crna paperjasta prevlaka, kao rezultat sporulacije patogena (Laemmlen, 2001; Thomma, 2003). Izgled pega zavisi, pre svega, od organa na kojima se formira (lok. cit. Vučković, 2012).

Prilikom infekcije klasa simptomi se najpre javljaju u vidu crne pegavosti, nakon čega dolazi do gubljenja margina i formiranja pega nepravilnog oblika sive do sivocrne boje (Slika 2.1). Takođe, može doći i do prevremenog sazrevanja biljaka, s obzirom na to da je crna boja klasa često povezana i sa bolestima korena i stabla. Kasna žetva u vlažnim vremenskim uslovima dovodi do jačeg crnila na klasovima, što uzrokuje promenu boje i crnilo zrna. Simptomi na površini zrelih klasova registrovani su kod pšenice, ječma, raži i ovsu (Murray i sar., 2009, lok. cit. Vučković, 2012).



Slika 2.1 – Simptomi infekcije *Alternaria* spp. na klasu (desni) (<http://www.hgca.com>)

Simptomi na zrnu su vidljivi u periodu nakon žetve u vidu crne obojenosti zrna skoncentrisane oko klice (Slika 2.2). Smatra se da je to rezultat aktivnosti enzima peroksidaza koji utiču na formiranje obojenih fenolnih jedinjenja, a locirani su u aleuronskom omotaču zrna (Lehmensiek i sar., 2004). U kasnijoj fazi zaraze, crna pegavost se širi zahvatajući celu površinu zrna. *Helminthosporium* spp. i *Fusarium* spp. prodire unutar semena, uzrokovajući šturost zrna, dok se *Alternaria* spp. zadržava samo na perikarpu (Prescott i sar., 1986). Simptomi se javljaju na svim strnim žitima, iako su pšenica i ječam najčešće inficirani. Durum pšenica se smatra naročito osetljivom. Crna obojenost zrna registrovana je i na ovsu (HGCA Cereal Disease Encyclopedia, www.hgca.com; lok. cit. Vučković, 2012).



Slika 2.2 – Simptomi infekcije *Alternaria* spp. na zrnu (www.cropit.north.local-host.info)

Na listovima strnih žita pojedine vrste roda *Alternaria* mogu prouzrokovati oboljenja u vidu mrke pegavosti. Najčešći prouzročivač ovog oboljenja je *Alternaria triticina*, koji se najčešće javlja u toplim klimatskim područjima južne i istočne Azije (Mercado Vergnes i sar., 2006). Domaćini *A. triticina* su pre svega hlebna i durum pšenica, dok na ječmu i ovsu nije determinisana (<http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org>). Kako navode Mercado Vergnes i sar. (2006), simptomi *A. triticina* se javljaju na lišću u vidu malih, ovalnih, žučkastih hlorotičnih pega nepravilnog oblika. Simptomi se najpre javljaju na donjem lišću, dok razvojem oboljenja, hlorotične pege postaju tamnobraon do sive boje sa žutim marginama (Slika 2.3). U kasnijim stadijumima oštećenja zahvataju veće površine lista, prilikom čega jače zaraženi listovi nekrotiraju i suše se, ponekad uzrokujući uvenuće biljaka. *A. triticina* se može naći i na zrnima strnih žita (Slika 2.3) koja dobijaju crnu boju i postaju smežurana (Murray i sar., 2009, lok. cit. Vučković, 2012; www.bspp.org.uk).



Slika 2.3 – Simptomi infekcije *A. triticina* na listovima, plevi i zrnu pšenice (Perellò i Sisterna 2006; www.bspp.org.uk)

2.3.4. *Alternaria* toksini

Dok su relativno obimne informacije dostupne o mikotoksinima čije su maksimalno dozvoljene količine u hrani i hrani za životinje regulisane propisima, potreba za potpunijim informacijama o važnosti kontaminacije useva toksinima kao što su *Alternaria* toksini, u poslednje vreme su postali aktuelni.

Pod povoljnim uslovima, pojedine vrste roda *Alternaria* proizvode više od 70 sekundarnih metabolita, ali samo nekoliko od njih je hemijski okarakterisano kao mikotoksin sa negativnim efektom na zdravlje ljudi i životinja, kao što su: alternariol (AOH), alternariol monometil etar (AME), tenuazonska kiselina (TeA), tentoksin (TEN), alvertoksini, *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toksini, stemfilitoksin III i altenuen (ALT) (Battilani i sar., 2009; EFSA, 2011).

Prvi izolovani *Alternaria* toksini su okarakterisani i potvrđeni u periodu 1953-1986. godine. Optimalni uslovi za biosintezu *Alternaria* toksina zavisi od uslova spoljašnje sredine, pre svega interakcije temperature i vlažnosti, od vrste roda *Alternaria* i od supstrata (domaćina) (Fernández-Cruz i sar., 2010). *Alternaria* toksini se translociraju u okolne delove biljnog tkiva, tako da se mogu naći i u svim vrstama prerađevina biljnog porekla (Logrieco i sar., 2009).

Kako navodi Hasan (1995) optimalne temperature za produkciju pojedinih *Alternaria* toksina su 28 °C za AOH i AME, 14°C za TeA i 21 °C za alvertoksine (ATX-I i ATX-II). Magan i sar. (1984) detektovali su *Alternaria* toksine u skoro svim kombinacijama a_w vrednosti od 0,90 do 0,98 i temperaturi od 5 °C do 30 °C. Nezavisno od a_w vrednosti najveća koncentracija AOH, AME i ALT je detektovano na 25 °C. U istraživanjima Pose i sar. (2010) optimalni uslovi, odnosno, najveća produkcija AOH, AME i TeA od strane *A. alternata* u podlozi od paradajza nakon 28 dana inkubacije je zabeležena pri a_w 0,954 i temperaturi od 21 °C za AOH, pri a_w 0,954 i temperaturi od 35 °C AME i pri a_w 0,982 i temperaturi od 21 °C za TeA. Na temperaturi od 6 °C nijedan od navedenih toksina nije registrovan, te se smatra da skladištenje na temperaturi ispod 6 °C je nepovoljno za produkciju navedenih *Alternaria* toksina. Činjenica da se toksini mogu sintetizovati i u uslovima povišene temperature i vlage izvan optimalnih granica je izuzetno značajana, jer se u neadekvatnim skladišnim uslovima povećava sadržaj mikotoksina, što utiče na narušavanje kvaliteta žita (Oviedo i sar., 2009).

Alternaria toksini mogu biti delom metabolisani i u biljkama, uz mogućnost formiranja konjugovanih metabolita, odnosno "maskiranih" toksina (Berthiller i sar., 2005). Ovi modifikovani ili "maskirani" mikotoksini, u kojima je toksin obično vezan za polarnije supstance kao što su glukoza, aminokiseline i sulfati su problematični, jer najverovatnije njihovi nativni prekursori mogu se osloboditi posle enzimske hidrolize u digestivnom traktu organizama. Oni se pominju kao maskirani mikotoksini, jer postoji mogućnost da ne budu detektovani pri analizi zbog razlika u polaritetu između nativnih prekursora i njihovih metabolita. Istraživanja su uglavnom usmerena na matični mikotoksin, dok su o pojavi metabolita mikotoksina u hrani i hrani za životinje dostupni vrlo ograničeni podaci.

Vrsta *Alternaria alternata* se navodi kao najvažniji proizvođač *Alternaria* toksina. *Alternaria* toksini, AOH, AME, TeA i TEN registrovani su u velikom broju prehrambenih proizvoda kao što su žita i proizvodi na bazi žita, paradajz i proizvodi od paradajza, suncokret i suncokretovo ulje, voće i razne prerađevine na bazi voća, uključujući sokove, vino i pivo (Scott i Kanhere, 2001; Scott i sar., 2006; Ostry, 2008; Fernández-Cruz i sar., 2010; Noser i sar., 2011; Scott i sar., 2012; Van de Perre i sar., 2014; Walravens i sar., 2014).

Nazivi *Alternaria* toksina i vrsta roda *Alternaria* koje ih produkuju dati su u **Tabeli 2.3**, dok pregled literaturnih podataka o pojavi *Alternaria* toksina u žitima i hrani za životinje dati su u **Tabeli 2.5**.

Tabela 2.3 - *Alternaria* toksini i vrste roda *Alternaria* koje ih produkuju (Battilani i sar., 2009)

<i>Alternaria</i> toksin	Akronim	Vrsta koja ga produkuje
Alternariol	AOH	<i>Alternaria alternata</i>
Alternariol monometil etar	AME	<i>A. alternata</i> ; <i>A. solani</i>
Tentoksin	TEN	<i>A. alternata</i>
Tenuazonska kiselina	TeA	<i>A. alternata</i> ; <i>A. tenuissima</i>
Altertoksini	ATX	<i>A. alternata</i>
<i>A.alternata</i> f.sp. <i>lycopersici</i> toksini	AAL-toksini	<i>A. alternata</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Stemfiltoksin III	Stemphytoxin III	<i>A. alternata</i>
Alteuen	ALT	<i>A. alternata</i>

U uzorcima spelte sa naših prostora Vučković i sar. (2013) su detektovali i kvantifikovali alternariol (AOH) i alternariol monometil etar (AME) u plevičastom omotaču i na oljuštenom zrnju spelte posle inokulacije biljaka sa jednim izolatom *A. alternata* i sa dva različita izolata *A. tenuissima* koristeći tečnu hromatografiju visoke efikasnosti (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) sa DAD (eng. *dioda array detector*) detektorom. Detektovani nivoi AOH i AME su četiri puta bili veći u plevičastom omotaču nego na oljuštenom zrnju spelte tretiranih inokulatima. AOH je registrovan u opsegu koncentracija od 227 do 331 µg/kg u oljuštenom zrnju spelte i od 433 do 1647 µg/kg u plevičastom omotaču. AME je bio dominantan toksin detektovan i kvantifikovan u rasponu od 277 do 398 µg/kg u oljuštenom zrnju i od 1844 do 2183 µg/kg u plevičastom omotaču. Dobijeni rezultati ukazuju na značajno veće koncentracije *Alternaria* toksina u plevičastom omotaču nego u oljuštenom zrnju spelte koja implicira moguće zaštitni efekat plevičastog omotača na zrnju spelte.

Janić Hajnal i sar., (2015) objavili su saopštenje o prirodnoj kontaminaciji pšenice *Alternaria* toksinima (AOH, AME i TeA) u trogodišnjem periodu sa teritorije AP Vojvodine. Navedeni *Alternaria* toksini su detektovani i kvantifikovani primenom validovane LC-MS/MS metode (metodi ispitivanje prisustva *Alternaria* toksina-podpoglavlje 4.2.3.). Rezultati ovog istraživanja deo su ove doktorske disertacije (podpoglavlje 5.1.1.-5.1.5.).

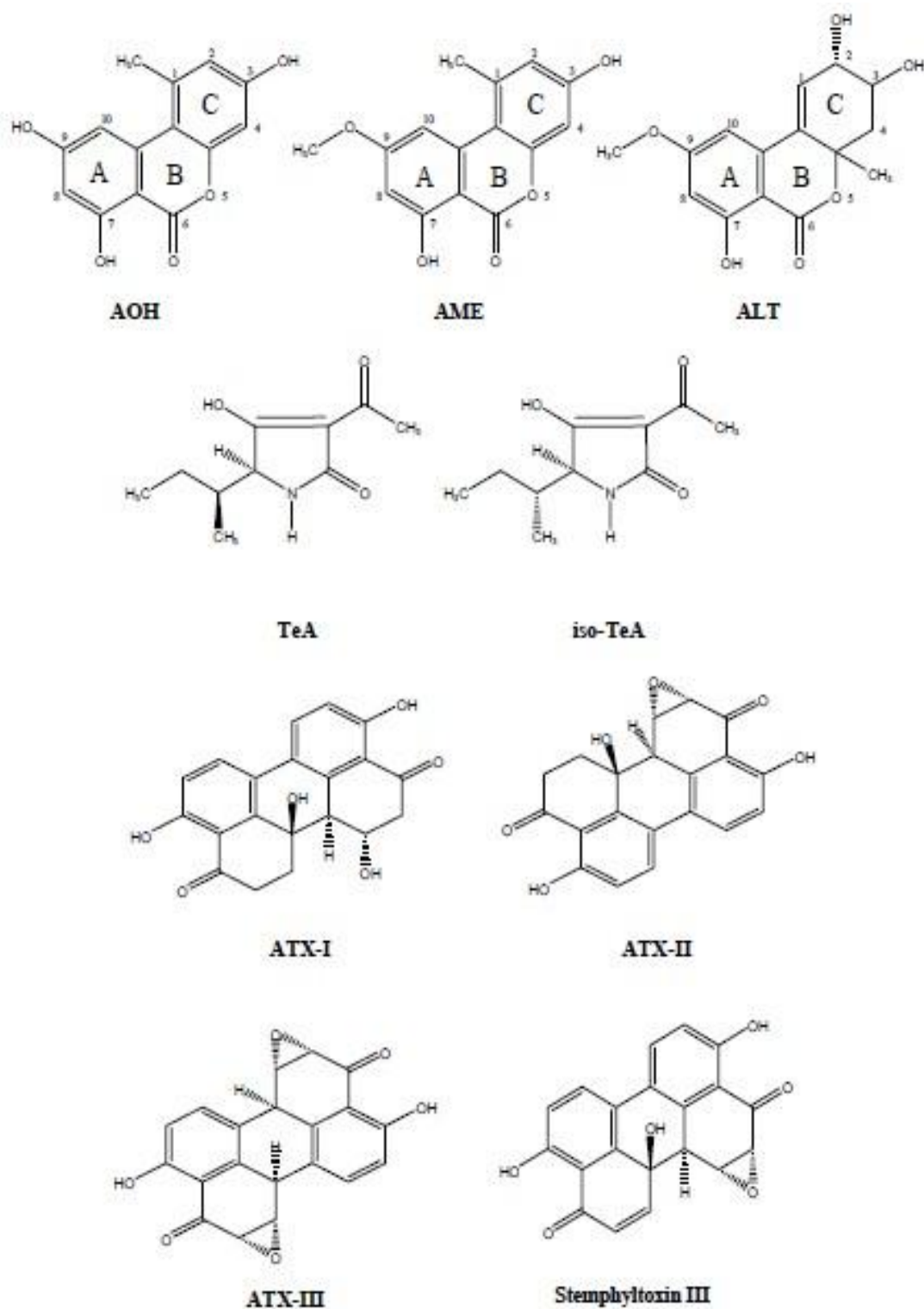
2.3.5. Fizičko hemijske osobine *Alternaria* toksina

Najznačajniji *Alternaria* toksini prema izveštaju nadležnog organa Evropske agencije za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority*, EFSA) mogu se svrstati u sledeće strukturne grupe:

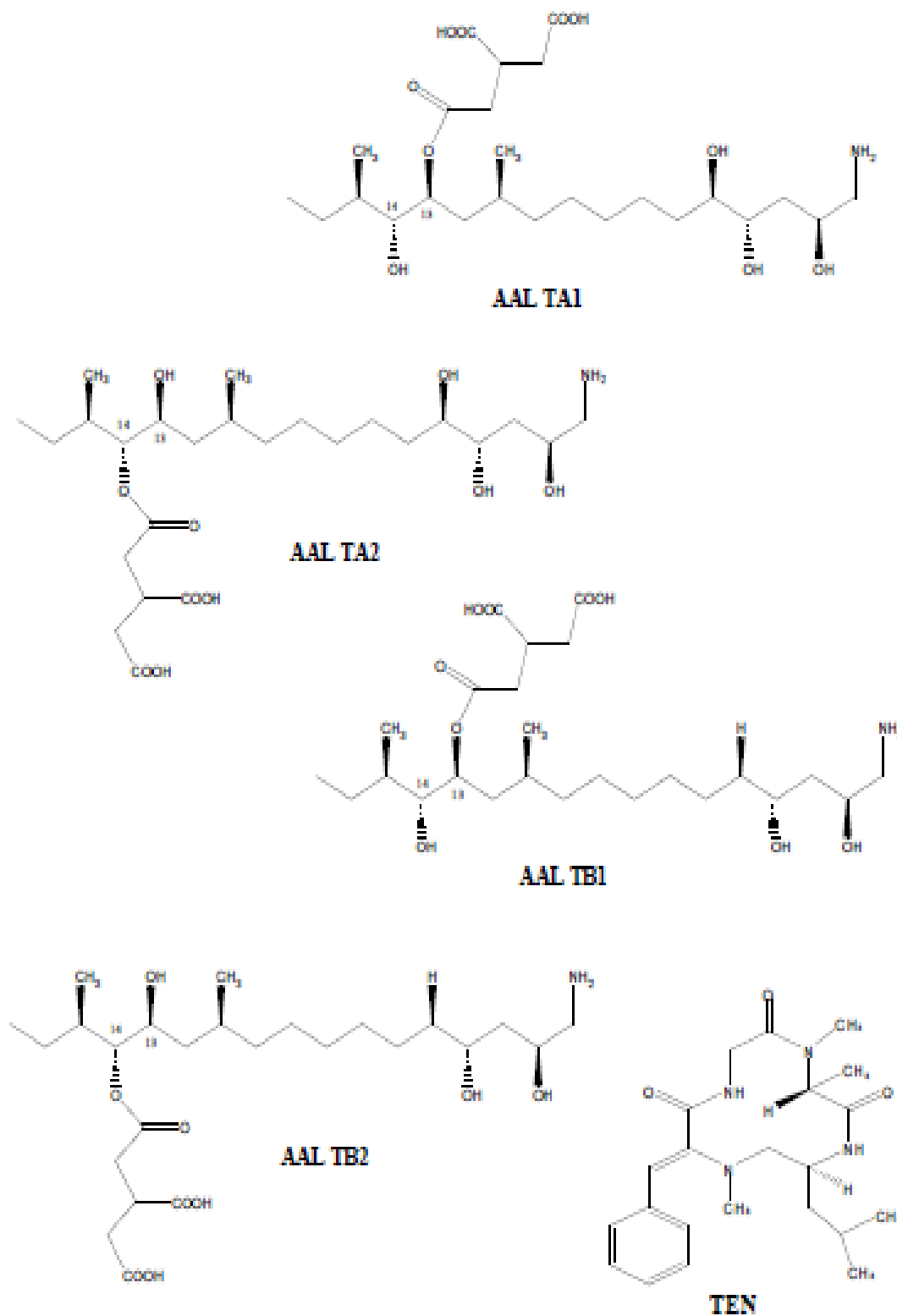
- derivati dibenzo- α -pirona: alternariol (AOH), alternariol monometil etar (AME), altenuen (ALT) i altenuisol (ASL);
- derivati tetraminske kiseline: tenuazonska kiselina (TeA) i izo-tenuazonska kiselina (iso-TeA);
- derivati perilena: altertoksini I, II i III (ATX-I, ATX-II i ATX -III) i stemfiltoksin III;
- AAL-toksini (*A.alternata* f.sp. *lycopersici* toksini): AAL-TA i AAL-TB;
- toksini mešovite strukture kao što je tentoksin (TEN) (ciklični tetrapeptid) (EFSA, 2011).

Hemijska struktura i nazivi najznačajnijih *Alternaria* toksina prikazani su na Slikama 2.4 i 2.5 i u **Tabeli 2.4**.

U literaturi su samo za neke od *Alternaria* toksina objavljene fizičko-hemijske karakteristike. Konkretno, TeA je bezbojno, viskozno ulje i jednobazna kiselina sa pKa 3,5. Rastvorljiva je u metanolu i hloroformu. Pri odležavanju, zagrevanju ili tretiranju bazom, optička aktivnost se gubi i može doći do kristalizacije kao posledica formiranja iso-TeA. Gradi komplekse sa jonima kalcijuma, magnezijuma, bakra, gvožđa i nikla.



Slika 2.4 - Hemijska struktura najznačajnijih toksičnih metabolita roda *Alternaria* (EFSA, 2011)



Slika 2.5 - Hemijska struktura AAL toksina (EFSA, 2011)

Tabela 2.4 - Hemijski nazivi, CAS No., molekulske mase i hemijske formule *Alternaria* toksina

Toksin/zajednički naziv	Hemijski naziv	CAS No	MW (Da)	Hemijska formula
AOH/ Alternariol	3,7,9-trihidroksi-1-metil-6 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,d</i>]piran-6-jedan	641-38-3	258	C ₁₄ H ₁₀ O ₅
AME/ Alternariol monometil etar	3,7-dihidroksi-9-metoksi-1-metil-6 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,d</i>]piran-6-jedan	23452-05-3	272	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
ALT/ Altenuen	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>aR</i>)-rel-2,3,4,4a-tetrahidro-2,3,7-trihidroksi-9-metoksi-4a-metil-6 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,d</i>]piran-6-jedan	29752-43-0	292	C ₁₅ H ₁₆ O ₆
ATX-I/ Alvertoksin-I	(1 <i>S</i> ,12 <i>aR</i> ,12 <i>bS</i>)-1,2,11,12,12a,12b-heksahidro-1,4,9,12atetrahidroksi-3,10-perilendion	56258-32-3	352	C ₂₀ H ₁₆ O ₆
ATX-II/ Alvertoksin-II	(7 <i>aR</i> ,8 <i>aR</i> ,8 <i>bS</i> ,8 <i>cR</i>)-7 <i>a</i> ,8 <i>a</i> ,8 <i>b</i> ,8 <i>c</i> ,9,10-heksahidro-1,6,8c-trihidroksiperilo[1,2- <i>b</i>]oksiren-7,11-dion	56257-59-1	350	C ₂₀ H ₁₄ O ₆
ATX-III/ Alvertoksin-III	(1 <i>aR</i> ,1 <i>bS</i> ,5 <i>aR</i> ,6 <i>aR</i> ,6 <i>bS</i> ,10 <i>aR</i>)-1 <i>a</i> ,1 <i>b</i> ,5 <i>a</i> ,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,10 <i>a</i> -heksahidro-4,9-dihidroksi-perilo[1,2- <i>b</i> :7,8- <i>b'</i>]bisoksiren-5,10-dion	105579-74-6	348	C ₂₀ H ₁₂ O ₆
TeA/ Tenuazonska kiselina	(5 <i>S</i>)-3-acetil-1,5-dihidro-4-hidroks-5-[(1 <i>S</i>)-1-metilpropil] 2 <i>H</i> pirrol-2-jedan	610-88-8	197	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ N
TEN/ Tentoksin	Ciklo[<i>N</i> -metil-L-alanil-L-leucil-(α Z)- α , β -didehidro- <i>N</i> metilfenilalanilglicil]	28540-82-1	414	C ₂₂ H ₃₀ O ₄ N ₄
Stemfilitoksin III	(7 <i>aR</i> ,8 <i>aR</i> ,8 <i>bS</i> ,8 <i>cR</i>)-7 <i>a</i> ,8 <i>a</i> ,8 <i>b</i> ,8 <i>c</i> -tetrahidro-1,6,8c-trihidroksiperileno[1,2- <i>b</i>]oksirene-7,11-dion	102694-32-6	348	C ₂₀ H ₁₂ O ₆
AAL-TA1/ A. alternata f. sp. lycopersici toksini – TA1	(2 <i>R</i>)-1,2,3-propanetrikarboksil acid, 1-[(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>S</i>)-13-amino-9,10,12-trihidroksi-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-hidroksi-2-metilbutil]-3-metiltridecil] ester	79367-52-5	521	C ₂₅ H ₄₇ O ₁₀ N
AAL-TA2/ A. alternata f. sp. lycopersici toksini – TA2	(2 <i>R</i>)-1,2,3-propanetrikarboksili acid, 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,13 <i>S</i>)-14-amino-2,10,11,13-tetrahidroksi-4-metil-1-[(1 <i>R</i>)-1-metilpropil]tetradecil] ester	79367-51-4	521	C ₂₅ H ₄₇ O ₁₀ N
AAL-TB1/ A. alternata f. sp. lycopersici toksini – TB1	(2 <i>R</i>)-1,2,3-propanetrikarboksil acid, 1-[(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,12 <i>S</i>)-13-amino-10,12-dihidroksi-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-hidroksi-2-metilbutil]-3-metiltridecil] ester	176590-32-2	505	C ₂₅ H ₄₇ O ₉ N
AAL-TB2/ A. alternata f. sp. lycopersici toksini – TB2	(2 <i>R</i>)-1,2,3-propanetrikarboksil acid, 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,11 <i>R</i> ,13 <i>S</i>)-14-amino-2,11,13-trihidroksi-4-metil-1-[(1 <i>R</i>)-1-metilpropil]tetradecil] ester	176705-51-4	505	C ₂₅ H ₄₇ O ₉ N

CAS No: Chemical Abstracts Services Registry Number; MW:molekulska masa; Da: Dalton

AOH i AME kristališu iz etanola kao bezbojne iglice, a tačke topljenja praćenog raspadom su im 350 °C, odnosno 267 °C. Oni su rastvorljivi u većini organskih rastvarača i daju ljubičastu boju pri reakciji sa etanolnim gvožđe - hloridom.

ALT kristališe u obliku bezbojnih prizmi, sa tačkom topljenja na 190-191 °C.

Ljubičastoplava fluorescencija je karakteristična za AOH, AME i ALT (Betina, 1993).

ATX-I je amorfnu čvrsta supstanca sa tačkom topljenja na 180 °C, koja pokazuje karakterističnu jarko žutu fluorescenciju pod ultraljubičastom (UV) svetlosti. Žuto-narandžasta fluorescencija je karakteristična za ATX (Betina, 1993).

2.3.6. Toksičnost *Alternaria* toksina

2.3.6.1. *Alternariol*

Alternariol (AOH) je derivat dibenzo- α -pirona koji je prvi put opisan 1953. godine, a ispoljava citotoksično, fetotoksično i teratogeno dejstvo. Letalna doza je 200 mg/kg AOH telesne mase (TM) za miševu (Weidenbörner, 2001). Dibenzo- α -pirona ima u izobilju, a sastoji se do 10% suve materije micelijuma. Izolovan je iz prirodno zaraženog zrna sirka (Sauer i sar., 1978) i iz brazilskog oraha (Schroeder i Cole, 1977).

Prema saopštenju Weidenbörner (2001), AOH se prirodno pojavljuje u jabukama, ječmu, mandarini, ovsu, brazilskom orahu, biberu, raži, sirku, semenkama suncokreta, paradajzu, tritikaleu i pšenici.

Lehman i sar. (2006) su ukazali na estrogenu potencijal AOH, inhibitorni efekat na proliferaciju ćelija sisara.

Skorašnja istraživanja Fehr i sar. (2010) dokazuju genotoksični način delovanja AOH, pokazujući da AOH može delovati kao inhibitor DNK topoizomeraze I i II. Mali je broj dostupnih podataka u vezi apsorpcije AOH u digestivnom traktu (Burkhardt i sar., 2009), dok za AME je utvrđeno da se slabo apsorbuje kako *in vitro* tako i *in vivo* (Pollock i sar., 1982; Burkhardt i sar., 2009). Nakon apsorpcije zabeležen je brz metabolizam za AOH (Pollock, 1982). Karakterizacija metabolita je sprovedena i za AOH i za AME. Oba toksina su pokazala oksidativni metabolički put, pri čemu dolazi do formiranja katehola ili hidrohina, kao i do mogućeg formiranja njihovih konjugovanih metabolita sa glukozom i sulfatima (Pfeiffer i sar., 2007a, 2009; Burkhardt i sar., 2009).

Neki od *Alternaria* toksina kao i ekstrakti kultura *Alternaria alternata* pri testiranju mutagenih i klastogenih osobina pokazali su pozitivne rezultate genotoksičnosti kako u ćelijama bakterija, tako i u ćelijskim sistemima sisara. Među *Alternaria* toksinima AOH (CAS No. 641-38-3) i AME (CAS No. 23452-05-3) ispoljavaju mutageno dejstvo kako u bakterijskim sistemima (Kada i sar., 1984; An i sar., 1989; Zhen i sar., 1990; Schrader i sar., 2006), tako i u ćelijskim sistemima sisara (Dong i sar., 1993; Brugger i sar., 2006), kao i klastrogenu oštećenje u nizu ćelijskih kultura sisara (Liu i sar., 1992; Lehmann i sar., 2006; Pfeiffer i sar., 2007b).

Schuchardt i sar. (2014) su objavili rezultate istraživanja na portalu EFSA o kombinovanoj toksikokinetičkoj i *in vivo* genotoksičnoj studiji o AOH. Istraživanje su

sprovodili na eksperimentalnim belim miševima. U *in vivo* toksikokinetičkom ispitivanju pri oralnoj aplikaciji radioaktivnog AOH (200-1000 mg/kg) 90% inicijalne količine radioaktivnog AOH je registrovan u fekalijama, a 9% u urinu miševa. U krvi nakon 24 h svega 0,06% AOH je detektovano. Formiranje metabolita ispitano je takođe i pri oralnoj aplikaciji AOH. Četiri metabolita AOH (8-hidroksi-AOH, 4-hidroksi-AOH, 10-hidroksi-AOH, 2-hidroksi-AOH) su detektovana i potvrđena nuklearno-magnetno-rezonantnom spektroskopijom (NMR). Rezultati ovog istraživanja nisu potvrdili genotoksični efekat AOH.

2.3.6.2. *Alternariol monometil etar*

Alternariol monometil etar (AME) je derivat dibenzo- α -pirona i ispoljava nekrotični, fetotoksični, teratogeni i mutageni efekat. Letalna doza je 400 mg/kg AME telesne mase za miševu (Weidenbörner, 2001).

AME se prirodno pojavljuje u jabukama, ječmu, mandarini, dinji, ovsu, maslinama, brazilskom orahu, biberu, raži, sirku, semenkama suncokreta, paradajzu, tritikaleu i pšenici (Weidenbörner, 2001).

2.3.6.3. *Tenuazonska kiselina*

Tenuazonska kiselina (TeA) je jedan od najvažnijih *Alternaria* toksina koji je pronađen u prirodi. Tenuazonska kiselina (TeA) je 3-acetil-5-sec-butiltetraminska kiselina ([5S-[5R (R)]-3-acetyl-5-(1-methylpropyl)-2,4-pyrrolidinedione). Prvi put je izolovana 1957. godine iz filtrata kulture *A. tenuis* (Rosett i sar., 1957; Schobert i sar., 2004, loc. cit. Battilani i sar., 2009), a najverovatnije ispoljava najtoksičniji efekat od svih *Alternaria* toksina. Letalna doza (LD₅₀) za miševu iznosi 81/168 mg/kg TM ženke/mužjaka (Weidenbörner, 2001).

TeA je fitotoksin proizveden od strane nekoliko gljiva, uključujući *A. alternata*, *A. longipes* i *A. tenuissima* (Chelkowski i Visconti, 1992; Da Motta i Soares, 2000a).

Ova kiselina je otkrivena u povrću, voću i nekim žitima u različitim zemljama (Visconti i Sibila, 1994, loc. cit. Battilani i sar., 2009).

TeA je detektovana u maslinama, paprici (Chelkowski i Visconti, 1992), paradajzu (Stack i sar., 1985, loc. cit. Battilani i sar., 2009; Da Motta i Soares, 2001) i paradajz pireu (Weidenbörner, 2001).

Od voća, TeA je detektovana u mandarinama, dinjama (Chelkowski i Visconti, 1992; Logrieco i sar., 1988, loc. cit. Battilani i sar., 2009) i jabukama (Weidenbörner, 2001).

U žitima, TeA je detektovana u sirku, pirinču (Chelkowski i Visconti, 1992) i pšenici (Weidenbörner, 2001). U Argentini, je TeA detektovana u visokim koncentracijama u suncokretu (Torres i sar., 1993, Chulze i sar., 1995), zatim u sačmi uljane repice i u uvezenoj suncokretovoj sačmi u Velikoj Britaniji (Nawaz i sar., 1997, loc. cit. Battilani i sar., 2009), u pšenici oštećenoj vremenskim prilikama, u sirku u Australiji (Webley i sar., 1997) i u pšenici oštećenoj vremenskim prilikama u Kini (Li i Yoshizawa, 2000).

TeA pokazuje značajnu fitotoksičnu aktivnost pri testiranju na monokotiledonskim i dikotiledonskim biljkama. Toksin izaziva hloroze i nekroze na listovima *Datura innoxia*, *D.*

stramonium, *D. metel*, stočnog graška, pšenice, raži, kupusa, karfiola i kukuruza pri 200 µg/ml i dovodi do uvenuća sadnica *D. innoxia* pri koncentraciji od 100 µg/ml. Ona takođe izaziva kompletnu inhibiciju rasta korena i dovodi do izduživanja izdanka na klicama semena *D. innoxia*, pšenice, raži, zelene salate pri koncentraciji od 100 µg/ml. To je nespecifični fitotoksin i čini se da igra značajnu ulogu tokom patogeneze. Tenuazonska kiselina nije izazvala značajne promene u disanju ili u količini šećera, ugljenih hidrata, ukupnog fenola i azota u listovima *D. innoxia*, ali je tretman sa TeA biljke domaćina doveo do 64% smanjenja sadržaja hlorofila u listovima posle 72 sati i do 40% smanjenja sadržaja proteina posle 24 sata tretmana (Janardhanan i Husain, 2008).

Smatra se da je glavni način delovanja TeA inhibicija sinteze proteina, suzbijanjem oslobađanja novoformiranog proteina iz ribozoma u supernatantnu tečnost (Lawley, 2009).

Tenuazonska kiselina ima značajnu antitumornu aktivnost kada se primenjuje na ljudski adenokarcinom-1 (Had-1) u gajenim embrijima jaja (Sinha i Bhatnagar, 1998, loc. cit. Battilani i sar., 2009).

Zhou i Qiang (2008) su ispitivali citotoksičnost tenuazonske kiseline u 3 ćelijske linije sisara. Ustanovili su da TeA inhibira proliferaciju i smanjenje sadržaja ukupnih proteina u fibroblastu 3T3 miša, u ćelijama pluća kineskog hrčka (CHL ćelija) i u ljudskom hepatocitima (L-O2 ćelija), pri koncentracijama od 12,5 - 400 µg/ml. Od tri ćelijske linije, 3T3 ćelije najviše su osetljive na toksine ($EC_{50} = 34,75$ µg/ml), zatim CHL ćelije ($EC_{50} = 63,44$ µg/ml) i na kraju LO2 ćelije ($EC_{50} = 117,77$ µg/ml).

Asam i sar. (2013) sproveli su toksikokinetičko istraživanje sa TeA. Volonteri su konzumirali hranu na bazi žita i paradajza sa koncentracijom TeA od 30 µg/kg. Nakon 6 h od konzumiranja hrane u urinu je detektovano od 54-81% TeA, dok nakon 24 h od 87-93%. Posledica zadržavanja 10% TeA u organizmu su problem koje je neophodno rešiti u bliskoj budućnosti.

2.3.6.4. Alvertoksini -I, -II i -III

Alvertoksin-I (ATX-I, CAS No. 56258-32-3), -II (ATX-II, CAS No. 56257-59-1) i -III (ATX-III, CAS No. 105579-74-6) su mutageni (Stack i Prival, 1986), pri čemu ATX-I i ATX-III indukuju i ćelijsku transformaciju u fibroblastima miševa, kao i u imortalizovanoj ljudskoj ćelijskoj liniji (Osborne i sar., 1988). Kako navodi Fleck (2012), ATX-II pokazuje jače mutageno dejstvo od AOH i AME.

Tabela 2.5 - Podaci iz objavljene naučne literatute o pojavi *Alternaria* toksina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ili $\mu\text{g}/\text{l}$) u žitu i hrani za životinje (EFSA, 2011)

Region/Država	<i>Alternaria</i> toksin	Proizvod	Broj uzoraka	n>LOQ	LOD ^(a) /LOQ ^(b) CC α ^(e) /CC β ^(d)	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Metoda	Referenca
Belgija	AOH	kukuruzno zrno	14	1	12/23	-	n.d.	17	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
		pšenično zrno	1	0	12/23	n.d.	n.d.	n.d.		
	AME	kukuruzno zrno	14	1	18/39	-	n.d.	19		
		pšenično zrno	1	0	18/39	n.d.	n.d.	n.d.		
Češka Republika	AOH	kukuruzno zrno	8	2	12/23	-	19	25	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
		pšenično zrno	8	0	12/23	n.d.	n.d.	n.d.		
	AME	kukuruzno zrno	8	0	18/39	n.d.	n.d.	n.d.		
		pšenično zrno	8	0	18/39	n.d.	n.d.	n.d.		
Češka Republika	AOH	pšenično zrno	129	60	2 ^(a) /5 ^(b)	7,7	6,3	44,4	HPTLC	Skarkova i sar. (2005)
	AME	pšenično zrno	129	0	2/5	n.d.	n.d.	n.d.		
	ALT	pšenično zrno	129	118	2/5	18,7	6,3	41		
	TeA	pšenično zrno	129	0	10/25	n.d.	n.d.	n.d.		
Danska	AOH	pšenično zrno	14	0	12 ^(c) /23 ^(d)	n.d.	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	pšenično zrno	14	0	18/39	n.d.	n.d.	n.d.		
Danska	AOH	kukuruzna silaža	10	1	10 ^(a)	24	n.d.	24	LC-MS/MS	Rasmussen i sar. (2010)
		kukuruzna silaža (sa vidljivim rastom gljive)	10	1	10	236	n.d.	236		
	AME	kukuruzna silaža	10	0	6	n.d.	n.d.	n.d.		
		kukuruzna silaža (sa vidljivim rastom gljive)	10	1	6	51	n.d.	51		
Estonija	AOH	ovsano zrno	2	0	100 ^(b)	n.d.	n.d.	n.d.	HPLC-DAD	Kütt i sar.

Tabela 2.5 - nastavak

Region/Država	<i>Alternaria</i> toksin	Proizvod	Broj uzoraka	n>LOQ	LOD ^(a) /LOQ ^(b) CC α ^(c) /CC β ^(d)	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Metoda	Referenca
		pšenično zрно	4	3	100	-	210	340		(2010)
		ječmeno zрно	4	1	100	-	n.d.	130		
Nemačka	AOH	ovsano brašno	6	5	0,5 ^(a) /1,5 ^(b)	-	13	250	LC-MS/MS	Asam i sar. (2011)
	AME	ovsano brašno	6	6	0,1/0,3	-	3	100		
Mađarska	AOH	pšenično zрно	7	0	12 ^(c) /23 ^(d)	n.d.	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	pšenično zрно	7	0	18/39	n.d.	n.d.	n.d.		
Portugalija	AOH	kukuruzno zрно	12	0	12 ^(c) /23 ^(d)	n.d.	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	kukuruzno zрно	12	0	18/39	n.d.	n.d.	n.d.		
Španija	AOH	kukuruzno zрно	14	0	12/23	n.d.	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	kukuruzno zрно	14	0	18/39	n.d.	n.d.	n.d.		
Švedska	AOH	ječam, pšenica, ovas, slama	18	16	35 ^(a) /45 ^(b)	-	n.d.	335	HPLC-UV	Häggbloom i sar. (2007)
	AME	ječam, pšenica, ovas, slama	18	7	35/45	-	n.d.	184		
	TeA	ječam, pšenica, ovas, slama	18	18	100/135	-	980	4310		
Pensilvanija (severna Amerika)	AAL-TA	kukuruzna silaža	120	28	20 ^(a)	170	200	2000	HPLC-MS	Mansfield i sar. (2007)
	AAL-TB	kukuruzna silaža	120	17	20	50	30	900		
Viskonsin (Severna Amerika)	AAL-TA	brašno od kukuruzne klice, kukuruzna silaža druga mešovita hrana za životinje	38	36	50	-	90	1470	direct competitive ELISA	Yu i sar. (1999)
Argentina	AOH	pšenično zрно	64	4	50 ^(a)	1054	645	1388	HPLC-UV	Azcarate i sar. (2008)
	AME	pšenično zрно	64	15	50	2118	566	7451		
	TeA	pšenično zрно	64	12	80	2313	1001	8814		

Tabela 2.5 - nastavak

Region/Država	<i>Alternaria</i> toksin	Proizvod	Broj uzoraka	n>LOQ	LOD ^(a) /LOQ ^(b) CC α ^(c) /CC β ^(d)	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Metoda	Referenca
Egipat	AOH	kukuruzno zrno	15	0	50 ^(a)	n.d.	n.d.	n.d.	HPLC-UV	El-Aal (1997)
		pšenično zrno	15	4	50	-	n.d.	2320		
		ječmeno zrno	10	0	50	n.d.	n.d.	n.d.		
		zrno sirka	10	0	50	n.d.	n.d.	n.d.		
		pšenične mekinje	10	2	50	-	n.d.	310		
		pirinač	7	0	50	n.d.	n.d.	n.d.		
	AME	kukuruzno zrno	15	0	300	n.d.	n.d.	n.d.		
		pšenično zrno	15	2	300	-	n.d.	1890		
		ječmeno zrno	10	4	300	-	n.d.	300		
		zrno sirka	10	0	300	n.d.	n.d.	n.d.		
		pšenične mekinje	10	1	300	-	n.d.	460		
		pirinač	7	0	300	n.d.	n.d.	n.d.		
Egipat	ALT	kukuruzno zrno	15	3	100	-	n.d.	370		
		pšenično zrno	15	2	100	-	n.d.	1480		
		ječmeno zrno	10	1	100	-	n.d.	700		
		zrno sirka	10	0	100	n.d.	n.d.	n.d.		
		pšenične mekinje	10	0	100	n.d.	n.d.	n.d.		
		pirinač	7	2	100	-	n.d.	100		
	ATX-I	kukuruzno zrno	15	0	200	n.d.	n.d.	n.d.		
		pšenično zrno	15	2	200	-	n.d.	1678		
		ječmeno zrno	10	0	200	n.d.	n.d.	n.d.		
		zrno sirka	10	2	200	-	n.d.	185		
		pšenične mekinje	10	0	200	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabela 2.5 -nastavak

Region/Država	<i>Alternaria</i> toksin	Proizvod	Broj uzoraka	n>LOQ	LOD ^(a) /LOQ ^(b) CC α ^(c) /CC β ^(d)	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Metoda	Referenca
	TeA	pirinač	7	0	200	n.d.	n.d.	n.d.	HPLC-UV	El-Aal (1997)
		kukuruzno zrno	15	4	100	-	n.d.	253,6		
		pšenično zrno	15	5	100	-	n.d.	658		
		ječmeno zrno	10	0	100	n.d.	n.d.	n.d.		
		zrno sirka	10	3	100	-	n.d.	125		
		pšenične mekinje	10	4	100	-	n.d.	200,5		
		pirinač	7	2	100	-	n.d.	172,8		
Južna Afrika	AME	mešovito hranivo na bazi sirka za svinje	4	4	10 ^(a)	1837	1200	2250	HPLC-FLD	Sydenham i sar. (1988)
Rusija	AOH	pšenično zrno	28	4	20 ^(b)	98	76	192	ELISA	Burkin i Kononenko (2011)
		ječmeno zrno	76	22	20	47	20	126		
		kukuruzno zrno	52	5	20	88	38	169		
		pšenične mekinje	10	4	20	34	20	63		
		kukuruzni proteini	20	16	20	56	20	190		
		kombinovana hrana za životinje	21	59	20	49	20	334		
		seno	1	1	20	-	-	560		
		silaza	1	1	20	-	-	760		
Kina	AOH	pšenično zrno (oštećeno od vremenskih prilika)	22	20	50 ^(a)	335	116	731	HPLC-FLD	Li i Yoshizawa (2000)
	AME	pšenično zrno (oštećeno od vremenskih prilika)	22	21	50	443	52	1426		
	ALT	pšenično zrno (oštećeno od vremenskih prilika)	22	0	100	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabela 2.5 - nastavak

Region/Država	<i>Alternaria</i> toksin	Proizvod	Broj uzoraka	n>LOQ	LOD ^(a) /LOQ ^(b) CC α ^(c) /CC β ^(d)	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Metoda	Referenca
	ATX-I	pšenično zрно (oštećeno od vremenskih prilika)	22	0	200	n.d.	n.d.	n.d.	HPLC-UV	Li i Yoshizawa (2000)
	TeA	pšenično zрно (oštećeno od vremenskih prilika)	22	22	100	2419	260	6432		
Australija	AOH	pšenično zрно (vidno napadnuto <i>Alternaria</i> vrstom)	33	-	10 ^(b)	-	n.d.	1050	HPLC-UV	Webley i sar. (1997)
		pšenično zрно	5	0	10	n.d.	n.d.	n.d.		
		sirak	12	0	10	n.d.	n.d.	n.d.		
	AME	pšenično zрно (vidno napadnuto <i>Alternaria</i> vrstom)	33	-	10	-	n.d.	46		
		pšenično zрно	5	0	10	n.d.	n.d.	n.d.		
		sirak	12	0	10	n.d.	n.d.	n.d.		
	TeA	pšenično zрно (vidno napadnuto <i>Alternaria</i> vrstom)	33	-	10	-	n.d.	220		
		pšenično zрно	5	1	10	-	n.d.	15		
		sirak	12	12	10	-	-	115		

LOD: granica detekcije; LOQ: granica kvantifikacije; CC α : granica odluke; CC β : mogućnost detekcije; (a): LOD; (b): LOQ; (c): CC α ; (d): CC β ; (e): broj uzoraka > LOD; AOH: alternariol; AME: alternariol monomethyl eter; ALT: altenuene; TeA: tenuazonna kiselina; ATX: albertoksin; AAL-toksini: *A. alternata* f. sp. *Lycopersici* toksini; n.d.: nije detektovan; -: nije objavljeno; LC-MS/MS: tečna hromatografija-masena spektrometrija; HPTLC: hromatografija na tankom sloju visoke efikasnosti; HPLC: visoko efikasna tečna hromatografija; UV: ultravioletna detekcija; FLD: fluorescentna detekcija; DAD: detektor sa nizom dioda; MS: masena spektrometrija; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; TLC: hromatografija na tankom sloju; EC: Evropska zajednica.

2.4. Mogućnost redukcije sadržaja *Alternaria* toksina u procesima prerade pšenice

Veoma malo podataka je dostupno o stabilnosti *Alternaria* toksina tokom skladištenja i prerade hrane i hrane za životinje. Jedan od retkih radova objavljenih na ovu temu (Siegel i sar., 2010a, Siegel, 2011) prikazuje ispitivanje hemijske stabilnosti AOH, AME i ALT pri različitim temperaturnim tretmanima. Ispitivanja su vršena na integralnom pšeničnom brašnu kom je dodata poznata koncentracija spomenutih toksina sa i bez dodatka vode. Pri realnim i najčešće korišćenim uslovima pečenja pšeničnog hleba (vlažno pečenje 45-60 minuta na 200 °C ili 30-45 minuta na 230 °C) nije konstatovana degradacija navedenih *Alternaria* toksina. Nasuprot tome, značajna degradacija od oko 90% za ALT, 70% za AOH i oko 50% za AME je utvrđena nakon suvog pečenja u trajanju od 60 minuta na 230 °C. Neophodno je istaći da se dobijeni rezultati degradacije *Alternaria* toksina suvim pečenjem ne odnose na realno pšenično testo za proizvodnju hleba, te je zaključak autora da uslovi pri kojima dolazi do značajne degradacije navedenih *Alternaria* toksina ne mogu da posluže kao postupak predtretmana brašna za dekontaminaciju, jer pri primenjenim uslovima dolazi do značajne promene boje i mirisa brašna (Siegel, 2011). Stabilnost *Alternaria* toksina smanjuje se sledećim redosledom: AME>AOH> ALT.

Hemijsku stabilnost AOH, AME i ALT navedeni autori su proučavali koristeći refleksiju toksina u vodenim rastvorima različitih pH vrednosti tokom 5 sati. Sve tri komponente su bile stabilne u 0,15 mol/l fosfatnom puferu pH 5, ali su u 0,1 mol/l KOH bile razgrađene do nedefinisanih proizvoda smeđe boje. ALT je bio stabilan u 0,18 mol/l fosfatno/citratnom puferu pH 7, ali su se AOH i AME razgradili do *6-metilbifenil-2,3', 4,5'-tetrol*, odnosno do *5'-metoksi-6-metilbifenil-2,3',4-triol* (Siegel i sar., 2010a). Smatra se da mehanizam razgradnje uključuje hidrolizu lakton grupe praćenu dekarboksilacijom. Ova istraživanja ukazuju, uprkos tome što su korišćeni vodeni sistemi različiti od pšeničnog testa, da bi variranje pH testa u toku prerade brašna u realnom procesu svakako moglo biti jedan od mogućih načina za redukciju sadržaja prisutnih *Alternaria* toksina.

Za razliku od malobrojnih istraživanja *Alternaria* toksina, u naučnoj literaturi postoji veliki broj objavljenih istraživanja o mogućnostima redukcije sadržaja mikotoksina primenom različitih tehnoloških postupaka, čije su maksimalno dozvoljene koncentracije u žitima regulisane propisima. Tako je tokom čišćenja kukuruza koncentracija fumonizina u kukuruzu smanjena za 26-69% (Sydenham i sar., 1994), dok pri mlinskom čišćenju uklanjanje zrna pšenice i ječma zaraženim gljivama dovodi do redukcije sadržaja deoksinivalenola za 5,5-19% (Abbas i sar., 1985). S druge strane, prema rezultatima Scudamore i sar. (2003) pri čišćenju ječma ustanovljena je redukcija ohratoksina A od samo 2-3%. Tokom suvog postupka mlevenja pšenice, ječma i ostalih žita deoksinivalenol, zearalenon, aflatoksini, ohratoksin i trihoteceni su koncentrovani u klici i mekinjastim frakcijama (Alldrick, 1996; Katta i sar., 1997; Chelkowski i sar., 1980; Scott i sar., 1984; Scott, 1984; Abbas i sar., 1985; Park, 2002; Scudamore i sar., 2003; Brera i sar., 2004; Lancova i sar., 2008). U procesu vlažnog

mlevenja kukuruza mikotoksini (aflatoksini, zearalenon i fumunizini) se mogu naći u vodi za natapanje, proteinima, vlaknima i klici, dok škrob ne pokazuje tendenciju ka kontaminaciji mikotoksinima (Bennett i sar., 1996; Lauren i Ringrose, 1997; Park, 2002; Ryu i sar., 2002). Generalno, tokom mehaničkih tehnoloških postupaka ne dolazi do razgradnje prisutnih mikotoksina. Tehnološki postupci koji uključuju primenu visokih temperatura kao što su obično kuvanje, prženje, pečenje i konzervisanje imaju različitu efikasnost redukcije prisutnih mikotoksina, pri čemu literaturni podaci ukazuju da što su primenjene temperature više dolazi do značajnije redukcije sadržaja mikotoksina, ali ne i do njihove potpune eliminacije (Boudra i sar., 1995; Jackson i sar., 1996a, 1996b; Pineda-Valdes i Bullerman, 2000; Ryu i sar., 2003). Pri primeni hidrotermičkog postupka ekstruzije, stepen smanjenja koncentracije mikotoksina u gotovom proizvodu zavisi od nekoliko faktora, pri čemu tip ekstrudera, temperatura, brzina obrtaja puža, protok materijala, sadržaj vode materijala, kao i vreme zadržavanja u ekstruderu imaju najveći uticaj. Najveća redukcija sadržaja mikotoksina u ekstrudiranim proizvodima javlja se na temperaturama od 160 °C i višim i pri dužem vremenu zadržavanja materijala u ekstruderu. Rezultati istraživanja mnogih autora koji su proučavali uticaj procesa ekstrudiranja variranjem procesnih parametara, potvrda su mogućnosti redukcije sadržaja aflatoksina, zearalenona, deoksinivalenola, fumunizina ohratokina A (Castelo i sar., 1998, 2001; Katta i sar. 1999; Ryu i sar., 1999; Cazzaniga i sar., 2001; Scudamore i sar., 2004; Scudamore, 2008).

2.5. Određivanje *Alternaria* toksina

Nekoliko preglednih radova je objavljeno o metodama za analizu *Alternaria* toksina u hrani i hrani za životinje (Scott, 2001; Ostry, 2008; Shephard i sar., 2009, 2010, 2011, 2012, 2013; Köppen i sar., 2010; Berthiller i sar., 2014).

2.5.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje za zvaničnu kontrolu nivoa mikotoksina je definisano u Regulativi Evropske unije (Commission Regulation, EC/401/2006). Međutim, Uredba se odnosi samo na aflatoksin B1, na ukupne aflatoksine, na ohratoksin A i na *Fusarium* toksine u žitima i proizvodima na bazi žita. Procedura uzorkovanja za praćenje (monitoring) *Alternaria* toksina u prehrambenim proizvodima nije opisana u zakonodavstvu Evropske unije, stoga uzorkovanje predstavlja temu koja bi trebala da bude razmatrana u bliskoj budućnosti (EFSA, 2011).

2.5.2. Metode pripreme uzoraka

Za ekstrakciju *Alternaria* toksina iz prehrambenih proizvoda bilo tečno - tečno ekstrakcijom (eng. *liquid/liquid extraction*, LLE) ili čvrsto-faznom ekstrakcijom (eng. *solid phase extraction*, SPE) korišćene tehnike se uglavnom zasnivaju na primeni C₁₈, aminopropil i hidrofilno-lipofilno balansnim (eng. *hydrophilic-lipophilic balance*, HLB) kolonama. LLE se primenjuje za paradajz i proizvode od paradajza (Scott i Kanhere, 1980, loc. cit. Battilani i sar., 2009; Stack i sar, 1985, loc. cit. Battilani i sar., 2009; Da Motta i Soares, 2000a, 2000b; Andersen i Frisvad, 2004), voćne sokove i pića (Lau i sar., 2003), sačmu uljane repice i sačmu suncokreta (Nawaz i sar., 1997, loc. cit. Battilani i sar., 2009), uzorke žita (Webley i sar., 1997; Li i Yoshizawa, 2000; Azcarate i sar., 2008; Kütt i sar., 2010, Siegel i sar., 2009; Müller i Korn, 2013; Vučković i sar., 2013), piva (Siegel i sar 2010b), sena, silaže i mešavine hrane za životinje (Yu i sar., 1999), pšenicu i kukuruz (Herebian i sar., 2009).

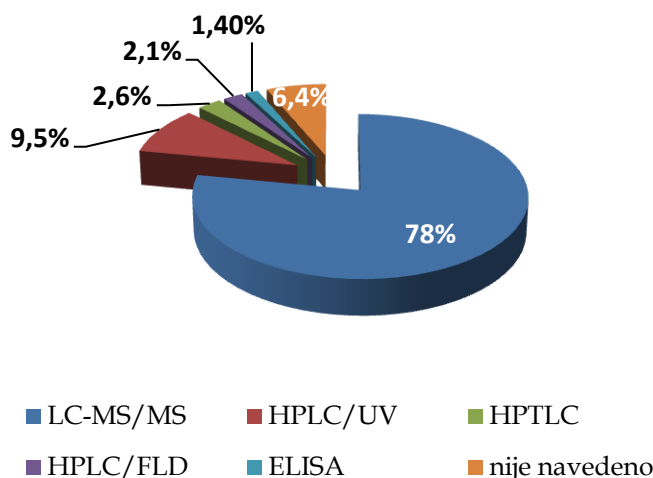
Za ekstrakciju *Alternaria* toksina iz uzoraka hrane najčešće se koriste organski rastvarači (metanol, etil acetat, dihlorometan i hloroform) ili mešavine organskih rastvarača sa (puferisanom) vodom.

Nakon odgovarajućeg razblaženja uzoraka, SPE koristi se za prečišćavanje uzoraka pića (Asam i sar., 2009), soka od jabuke (Delgado i sar., 1996; Scott i sar., 1997), paradajza (Fente i sar., 1998), voćnih sokova i napitaka (Lau i sar, 2003) i mandarina (Magnani i sar., 2007).

Kombinacija LLE sa SPE primenjuje se za šargarepu (Solfrizzo i sar., 2004), za dodatke ishrani (Diana Di Mavungu i sar., 2009), slatku papriku (Monbaliu i sar., 2009), žita, za proizvode od voća i povrća (Asam i sar., 2011), mandarinu (Magnani i sar., 2007) za paradajz (Da Motta i Soares, 2000a, 2000b, 2001; Terminiello i sar., 2006; Lohrey i sar. 2012), soju (Oviedo i sar., 2011), kukuruznu silažu (Mansfield i sar., 2007; Rasmussen i sar., 2010), hranu za životinje na bazi žita (Monbaliu i sar., 2010), proizvode na bazi žita (Scott i sar., 2012). Nawaz i sar. (1997, loc. cit. Battilani i sar., 2009) za otkrivanje *Alternaria* toksina u sačmi uljane repice i u sačmi suncokreta koristili su kombinaciju LLE sa gel hromatografijom (eng. *gel permeation chromatography*, GPC).

2.5.3. Analitičke metode

Analitičke tehnike koje se često koriste za kvantifikaciju AOH, AME ili TEN je obrnuto-fazna tečna hromatografija visoke efikasnosti (eng. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC) sa UV ili DAD (eng. *dioda array detector*) detektorom. U poslednjoj deceniji, predložene su metode sa masenom spektrometrijom kao i nekoliko metodologija zasnovanih na biosenzorima. Slika 2.6 prikazuje udeo analitičkih tehnika korišćenih pri analizi *Alternaria* toksina do 2010. godine (EFSA, 2011).



Slika 2.6 - Korišćene analitičke tehnike za određivanje *Alternaria* toksina do 2010. godine (EFSA, 2011)

Prema izveštaju EFSA (2011), najčešće primenjivani metodi u poslednjoj deceniji upravo se baziraju na primeni LC-MS/MS (Slika 2.6), dok učešće ostalih analitičkih tehnika pri analizi *Alternaria* toksina je ispod 10%.

Razvijene su brojne metode za određivanje *Alternaria* toksina primenom tečne hromatografske visoke efikasnosti (HPLC), metode sa fluorescentnim detektorom (FLD) (Stack i sar., 1985, loc. cit. Battilani i sar., 2009; Nawaz i sar., 1997, loc. cit. Battilani i sar., 2009, Fente i sar., 1998; Andersen i Frisvad, 2004), UV detektorom (Scott i Kanhere, 1980, Stack i sar. 1985, Nawaz i sar., 1997 loc. cit. Battilani i sar., 2009; Oviedo i sar., 2011) i DAD detektorom (Delgado i sar., 1996; Da Motta i Soares, 2000a, 2000b; Andersen i Frisvad, 2004; Solfrizzo i sar., 2004) u hrani i hrani za životinje. Granica detekcije (LOD) se kretala od 0,7 µg/kg za AME u soku od jabuke (Delgado i sar., 1996) do 350 µg/kg za TeA u suncokretovoj sačmi (Nawaz i sar., 1997, loc. cit. Battilani i sar., 2009). Da Motta i Soares, (2000a, 2000b) su objavili rezultate vezane za granicu kvantifikacije (LOQ) od 2 µg/kg za AME i 5 µg/kg za AOH u proizvodima od paradajza.

Upotreba gasne hromatografije (GC) za analizu *Alternaria* toksina u hrani i hrani za životinje zahteva predkolonsku derivatizaciju. Derivatizacija sa heptafluorobutiratom (HFB, heptafluorobutyrate) i trimetilsilil derivatom je pogodna za odvajanje *Alternaria* toksina pomoću GC pre detekcije sa elektro impakt (eng. *electron impact*, EI) masenom spektrometrijom (Scott i sar., 1997). Za GC metodu granica detekcije (LOD) iznosi 1 µg/kg za AOH i AME u soku od jabuke (Scott i sar., 1997). S obzirom na to da je derivatizacija obično problematična i dugotrajna, danas se za identifikaciju najčešće koriste LC - MS/MS tehnike.

Elektroaktivne karakteristike *Alternaria* toksina dozvoljavaju upotrebu elektrohemijskih tehnika za njihovu detekciju. Molina i sar. (2002) su pokazali elektrooksidaciju AOH i AME u elektrodi od staklastog ugljenika i platine. Međutim,

potrebni visoki potencijali kompromitovali su specifičnost testa. U cilju rešavanja ovog problema, Moressi i sar. (2004) iskoristili su afinitet tirozinaze od pečuraka za ova dva mikotoksina. Ovaj enzim dozvoljava rad u medijumu mešoviti organski rastvarač-voda, što je od velikog značaja kada analiti niske rastvorljivosti u vodi moraju da budu detektovani. Međutim, granica detekcije za AOH je bila $7,5 \cdot 10^{-6}$ M, što je više nego kod direktnog postupka sa detektorom sa zahvatom elektrona (eng. *electron-capture detector*, ECD).

Zajednički problem ova dva pristupa je u zaprljanosti površine elektrode usled akumulacije proizvoda oksidacije. Ovaj nedostatak je prevaziđen korišćenjem zlatne elektrode obložene monoslojem dodekanetiola (SAM), koji ne samo da smanjuje pasivnost elektroda, već ima i visoki potencijal. Ovaj pristup je omogućio dostizanje LOD za AME od $9,1 \cdot 10^{-8}$ M, koji je oko tri puta manji nego u direktnom ECD postupku na golim elektrodama i oko 50 puta manji nego u enzimatskom pristupu. Iako se ovaj pristup čini obećavajućim, problem selektivnosti ne dozvoljava primenu metode za rutinske analize.

Objavljeno je nekoliko metoda koje koriste tankoslojnu hromatografiju (eng. *thin-layer chromatography*, TLC) (Matysik i Giryn, 1996; Skarkova i sar, 2005). Fluorescentna detekcija korišćena je za AOH, AME i ALT, dok je za određivanje TeA najpre primenjeno prskanje rastvora gvožđe (III)-hloridom u etanolu, a zatim je usledila UV detekcija na 254 nm. Granica kvantifikacije (LOQ) za AOH, AME i ALT iznosila je 5 µg/kg, a za TeA 25 µg/kg u uzorcima semena repice i pšenice.

Tankoslojna hromatografija (TLC) je takođe bila korišćena za analizu *Alternaria* toksina u istraživanjima Fàbrega i sar. (2002). Razdvajanje je postignuto korišćenjem silika gel ploče i eluiranje se baziralo na korišćenju smeše toluen: metanol: sirćetna kiselina u odnosu 92:6:2 v/v/v. Retencioni faktor (RF) iznosio je 0,11 za AOH, 0,23 za AME, 0,08 za ALT, 0,15 za ATX-I i 0,09 za tentoksin. Detekcija je izvršena pod UV lampom na 254 nm. Granice detekcije su iznosile 1,25 ng za AME, 2,5 ng za AOH, ALT i ATX-I i 50 ng za TEN.

AOH i AME u povrću i sokovima su obično detektovani primenom RP-HPLC uz korišćenje C₁₈ kolona i mobilne faze metanol-voda (Delgado i sar, 1996, Delgado i Gomez-Cordoves, 1998; Da Motta i Soares 2000a, 2000b, 2001; Scott i sar. 2006). Zbog kiselih osobina analita, oba rastvarača su obično zakiseljena mravljom ili sirćetnom kiselinom. UV detekcija najčešće se obavlja na 254 nm. Za čistoću pika i potvrđivanje, DAD (eng. *diode array detector*) se koristi za skeniranje u opsegu 200 - 300 nm. Za TEN, koju karakteriše jače kiselo ponašanje, hromatografsko razdvajanje je izvršeno na C₁₈ koloni uz primenu ZnSO₄ kao modifikatora eluenta (Da Motta i Soares, 2000a).

Webley i sar. (1997) su koristili RP-HPLC metodu sa UV detektorom za određivanje *Alternaria* toksina (TeA, AOH, AME, ATX-1 i ALT) u oštećenoj pšenici usled vremenskih prilika u Australiji tokom proizvodne 1995/96. godine. U primenjenoj metodi srednje vrednosti za prinos iznosile su 61% za AOH, 90% za AME, 74% za ATX-1, 70% za ALT i 78% za TeA. LOD i LOQ kao i maksimalne vrednosti navedenih *Alternaria* toksina dati su u **Tabeli 2.5**.

Pri ispitivanju pojave *Alternaria* toksina (AOH, AME, ALT, ATX-I i TeA) u uzorcima kukuruza, pšenice, ječma, sirka, pšeničnih mekinja i pirinča El-Aal (1997) koristio je HPLC tehniku sa UV detektorom (**Tabela 2.5**).

Li i Yoshizawa (2000) su koristili RP-HPLC metodu sa UV detektorom za određivanje *Alternaria* toksina (AOH, AME, i ALT), a za ATX-I i TeA u oštećenoj pšenici usled vremenskih prilika u Kini u proizvodnoj 1997/98. godini koristili su FLD detektor. U **Tabeli 2.5** dat je broj ispitivanih uzoraka, broj kontaminiranih uzoraka, LOD i LOQ kao i srednja vrednost, minimalne i maksimalne utvrđene koncentracije navedenih *Alternaria* toksina.

Hägglom i sar. (2007, loc. cit. EFSA, 2011) ispitivali su pojavu *Alternaria* toksina (AOH, AME i TeA) u 18 uzoraka pšenice, ječma, ovsa i slame koristeći HPLC sa UV detektorom, pri čemu je TeA detektovana u svim ispitivanim uzorcima žita, AOH u 16 uzoraka, dok je AME detektovan u 7 uzoraka. LOD i LOQ kao i minimalne, odnosno maksimalne koncentracije ispitivanih *Alternaria* toksina prikazane su u **Tabeli 2.5**.

Pri ispitivanju sadržaja AOH, AME i TeA u uzorcima pšenice (64 uzoraka) poreklom iz Argentine, Azcarate i sar. (2008) primenili su HPLC metodu sa UV detektorom. Mobilna faza metanol i voda (80:20) sa 300 mg/l $ZnSO_4 \times H_2O$ je korišćena za detekciju AME i AOH, a za detekciju TeA mobilna faza je bila metanol i voda (85:15) sa 300 mg/l $ZnSO_4 \times H_2O$. AOH je detektovan u 4 uzorka pšenice (6%) sa opsegom koncentracija od 645 do 1388 $\mu g/kg$ (srednja vrednost iznosila je 1054 $\mu g/kg$); AOH u 15 uzoraka pšenice (23%) sa opsegom koncentracija od 566 do 7451 $\mu g/kg$ (srednja vrednost iznosila je 2118 $\mu g/kg$); i TeA u 12 uzoraka pšenice (19%) sa opsegom koncentracije od 1001 do 8814 $\mu g/kg$ (srednja vrednost iznosila je 2313 $\mu g/kg$). Dominantni *Alternaria* toksin bio je AME, ali je TeA kvantifikovana sa većom koncentracijom.

Kütt i sar. (2010) su za detekciju AOH iz uzoraka žita (pšenica, ječam i ovas) poreklom iz Estonije primenili HPLC sa DAD detektorom. Od 10 ispitivanih uzoraka žita AOH je detektovan u 4 uzorka. LOD i LOQ, kao i minimalne, odnosno maksimalne koncentracije ispitivanog *Alternaria* toksina (AOH) prikazane su u **Tabeli 2.5**.

Kako AOH i AME prirodno fluoresciraju, razvijeno je nekoliko HPLC metoda zasnovanih na fluorescenciji kao detekciji. Fluorescentna detekcija (eng. *fluorescence detector*, FLD) se najčešće izvodi na $\lambda_{ex} = 230$ nm i 333 nm i na $\lambda_{em} = 450$ nm (Andersen i Frisvad, 2004; Fente i sar., 1998).

Sydenham i sar. (1988) za određivanje AME u uzorcima mešovito g hraniva na bazi sirka za ishranu svinja koristili su RP-HPLC sa FLD detektorom, pri $\lambda_{ex}=320$ nm i $\lambda_{em}=445$ nm. Broj ispitivanih uzoraka, broj kontaminiranih uzoraka, LOD i LOQ, kao i srednja vrednost, minimalne i maksimalne utvrđene koncentracije za AME dati su u **Tabeli 2.5**.

Mansfield i sar. (2007) imali su za cilj da detektuju i kvantifikuju fumonizin B1 i B2 i *Alternaria* toksine AAL-TA i AAL-TB i da utvrde kako utiče primenjena poljoprivredna praksa, klimatski uslovi i uslovi skladištenja na nastanak i nivo navedenih mikotoksina u kukuruznoj silaži (Pensilvanija). Ukupno je analizirano 120 uzoraka, prikupljenih nakon žetve i nakon skladištenja tokom 2001. i 2002. godine. Za detekciju i kvantifikaciju koristili su

HPLC sa fluorescentnom detekcijom (fumonisin B1 i B2) i HPLC-MS (AAL-TA i AAL-TB). U **Tabeli 2.5** dati su podaci vezani za LOD i LOQ kao i minimalne, odnosno maksimalne koncentracije ispitivanih *Alternaria* toksina (AAL-TA, AAL-TB). Temperatura tokom razvoja kukuruza bila je u negativnoj korelaciji sa koncentracijom AAL-TA, dok je vlažnost bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom AAL-TA. Za fumonisin B1 i B2 utvrđene korelacije su u suprotnosti.

Müller i Korn (2013) objavili su rezultate svojih istraživanja u vezi sa pojavom *Alternaria* toksina u pšenici u periodu od 2001. do 2010. godine u Nemačkoj, pri čemu je koncentracija AOH, AME i ALT detektovana pomoću FLD na $\lambda_{ex}=253$ nm i $\lambda_{em}=415$ nm, dok TeA je detektovana pomoću DAD detektora na 280 nm. DAD detektor je korišćen za kontrolu identiteta analita.

Detektor raspršenja svetlosti na uparenom uzorku (eng. *evaporative light-scattering detector*, ELSD) zajedno sa HPLC korišćen je za detekciju i kvantifikaciju *A. alternata* f.sp. *lycopersici* toksina (Xu i Du, 2006). *Alternaria* toksini u toksigenim kulturama sojeva *Alternaria* su takođe analizirani primenom raznih (polu) preparativnih tehnika. Ove tehnike su primenjene za analizu ATX-I korišćenjem brze kontra-strujne hromatografije (Hu i sar. 2008) i metabolita nastalih od roda *Alternaria* TLC tehnikom (Fàbrega i sar., 2002).

U poslednjoj deceniji, predloženo je nekoliko metoda zasnovanih na masenoj spektrometriji, ne samo za identifikaciju i potvrdu, već i za kvantifikaciju mikotoksina. Konkretno, LC-MS/MS analiza obično se vrši pomoću interfejsa elektrosprej jonizacije (ESI) u negativnom režimu rada. Za kvantifikaciju obično je odabiran MRM (eng. *multiple reaction monitoring mode*) i konkretno za AOH je m/z 257 \rightarrow m/z 215 i m/z 257 \rightarrow m/z 213 (energija sudara: 25 eV), za AME je m/z 271 \rightarrow m/z 256 i m/z 271 \rightarrow m/z 228 (energija sudara: 30 eV). Pri kvantifikaciji AOH i AME u tkivu mandarina putem LC-MS/MS dozvoljena granica kvantifikacije iznosila je 0,5 μ g/kg za AOH i AME (Magnani i sar., 2007).

Predložena je i upotreba interfejsa hemijske jonizacije pod atmosferskim pritiskom (eng. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) u negativnom jonskom režimu (Lau i sar., 2003), omogućavajući poređenje osetljivosti sa onom koja se koristi za elektrosprej jonizaciju (eng. *electrospray ionizati*, ESI). Tenuazonska kiselina je slabo jonizujuća, tako da se najčešće detektuje primenom UV detektora. Međutim, nedavno je predložena njegoja kvantifikacija pomoću HPLC-ESI-MS hvatača jona, nakon derivatizacije sa 2,4 - dinitrofenilhidrazinom (DNPH) (Siegel i sar., 2009). DNPH se obično koristi kao LC-MS derivitizacioni agens za slabo jonizujuća ugljentetrahloridna jedinjenja u analizi životne sredine. Ovaj metod omogućava granicu kvantifikacije od 50 μ g/kg. APCI-MS tehnika deluje veoma efikasno za određivanje tentoksina i njemu sličnih jedinjenja, isotentoksina i dihidrotentoksina iz *Alternaria porri*. APCI-MS, kako izgleda, efikasna je za određivanja, ne samo na $[M + H]^+$, nego i na $[M + H-Gly-(N-Me-Ala)]^+$ za tri analita, uz dobru osetljivost (Horiuchi i sar., 2003, 2004).

Monbaliu i sar. (2010) su ispitivali pojavu i nivo kontaminacije mikotoksinima (ukupno 23 mikotoksina među kojima i AOH i AME) u ukupno 67 uzoraka hrane za svinje kao i uzorcima sirovina za hranu za životinje (pšenica, kukuruz) prikupljenih iz zemalja Evropske

unije (po 8 uzoraka pšenice i kukuruza iz Češke Republike; 14 uzoraka kukuruza iz Španije; 12 uzoraka kukuruza iz Portugala; 14 uzoraka pšenice iz Danske; 7 uzoraka pšenice iz Mađarske) primenom LC-MS/MS metode za simultano određivanje mikotoksina koju su validovali u skladu sa dokumentom Commission Decision 2002/657/EC. U **Tabeli 2.5** dati su podaci o rezultatima ispitivanja, a vezani za pojavu i nivo kontaminacije *Alternaria* toksinima (AOH i AME) kao i za LOD i LOQ za tražene analite.

Rasmussen i sar. (2010) za detekciju i kvantifikaciju mikotoksina među kojima i *Alternaria* toksina u uzorcima kukuruzne silaže iz Danske (20 uzoraka od kojih 10 uzoraka su bili vidno zaraženi gljivama) izabrali su visokoefikasnu tečnu hromatografiju u sprezi sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). AOH je detektovan u uzorcima kukuruzne silaže sa prosečnom koncentracijom od 24 µg/kg, a u uzorcima koji su sa vidljivim rastom gljiva prosečna koncentracija AOH je iznosila 236 µg/kg. AME nije detektovan u uzorcima kukuruzne silaže normalnog izgleda, dok u uzorcima sa vidljivom infekcijom gljivama prosečna koncentracija AME iznosio je 51 µg/kg. Za razvijenu LC-MS/MS metodu LOD i LOQ vrednosti za AOH i AME navedene su u **Tabeli 2.5**.

Scott i sar. (2012) objavili su rad o ispitivanjima *Alternaria* toksina u uzorcima žita i proizvodima na bazi žita sa kanadskog tržišta. U ovom istraživanju, 83 uzorka proizvoda na bazi žita, uključujući brašno, mekinje, žita za doručak, hleb i hranu za odojčad, analizirani su radi utvrđivanja pojave i nivoa AOH i AME korišćenjem HPLC-MS/MS tehnike. Granice detekcije (LOD) iznosile su 0,34 ng/g za AOH i 0,13 ng/g za AME, dok su granice kvantifikacije (LOQ) bile 1,1 i 0,43 ng/g. Od 83 uzoraka, 70 je bilo pozitivno na AOH (do 63 ng/g, u mekim pšeničnim mekinjama) i 64 uzorka je sadržalo AME (do 12 ng/g žita za doručka). Naročito je bilo alarmantno prisustvo AOH i/ili AME u 27 od 30 uzoraka hrane za odojčad na bazi mešavine žita (do 4,4 ng/g i 9,0 ng/g).

Liu i Rychlik (2013) razvili su LC-MS/MS metodu za određivanje tentoksina (TEN), dihidrotentoksina (DHTEN) i izo-tentoksina (iso-TEN) primenom pristupa SIDA (eng. *stable isotope dilution assay*, SIDA) tj., probom rastvora stabilnih izotopa. Trokomponentni interni standard označen deuterijumom dobili su primenom totalne sinteze. Uzorci su ekstrahovani sa smešom acetonitril-voda (84:16, v/v) i prečišćeni su preko C₁₈ fenil SPE kolone. Granica detekcije za TEN, DHTEN i iso-TEN kretala se od 0,10 do 0,99 µg/kg, a prinos (recovery) od 98 do 115% pri čemu je preciznost metode bila ispod 9%. Ispitivanjem 103 uzorka hrane, 85% bilo je kontaminirano sa TEN (maksimalna koncentracija od 52 µg/kg), 55% ispitivanih uzoraka hrane bilo je kontaminirano sa DHTEN na nivou do 32 µg/kg, dok izo-TEN nije bilo moguće kvantifikovati.

Poređenje performansi dva LC-MS/MS metoda za određivanje TeA i njenih analoga izvršeno je na uzorcima dečije hrane na bazi sirka (Asam i sar., 2013). Jedan od metoda je uključivao derivatizaciju TeA sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom, a drugi metod nije. Postignuto je dobro hromatografsko razdvajanje između TeA i njena četiri analoga. Vrednosti granice detekcije kretale su se u opsegu od 1-3 µg/kg (metod sa derivatizacijom) i između 50-80 µg/kg (metod bez derivatizacije). Analozii derivata TeA sa valinom (ValTeA) i leucinom (LeuTeA) su detektovani samo u jako kontaminiranoj dečijoj hrani sa TeA na bazi sirka.

Imunoafinitetni (eng. *enzyme-linked immunosorbent assays*, ELISA) testovi korišćeni su za analizu AAL-TA u senu, silaži i mešavinama hrane za životinje sa LOQ od 50 µg/kg (Tabela 2.5) (Yu i sar., 1999). Nedavno je primenjen ELISA test uz korišćenje poliklonskih antitela zeca za AOH u kontaminiranom kukuruzu i hrani za životinje sa LOQ od 20 µg/kg (Tabela 2.5) (Burkin i Kononenko, 2011). Do danas nisu razvijeni imunoafinitetni metodi za AME, ALT, ATX-I i TeA u hrani (Ostry, 2008).

Međutim, Gross i sar. (2011) su objavili rezultate o proizvodnji poliklonskih antitela za TeA i njihovoj primeni za imunoafinitetno određivanje (ELISA) TeA u proizvodima na bazi jabuke i paradajza. Ostvarena je granica detekcije od 25 µg/kg za proizvode od jabuke, 50 µg/kg za proizvode od paradajza i 150 µg/kg za pire od paradajza. Prinos TeA u soku od jabuke i paradajza kretao se u opsegu od 60 do 130% i od 40 do 150% za ostale proizvode od paradajza. Vrednosti relativne standardne devijacije (RSD) za „spajkovane“, uzorke u opsegu koncentracija od 50 do 2000 µg/kg kretale su se od 16,7 do 54,8%. Primenom ove metode 50 realnih uzoraka sa nemačkog tržišta utvrđeno je da je 12% pozitivnih uzoraka bilo kontaminirano TeA u opsegu koncentracija od 55 do 227 µg/kg.

2.5.4. Referentni materijali, validacija metoda i testovi osposobljenosti

Komercijalno su dostupni čvrsti standardi za AOH, AME, ALT, ATX-I, TEN i bakarne soli TeA, međutim, ovi standardi nisu zvanično sertifikovani. Nasuprot tome, na tržištu su dostupni sertifikovani standardni rastvori AOH, AME i TEN, ali ne postoje sertifikovani referentni materijali za *Alternaria* toksine.

Većina analitičkih metoda objavljenih u literaturi su do izvesne mere interno validovani (u kući) (Delgrado i sar., 1996; Da Motta i Soares, 2000a, 2000b; Diana di Mavungu i sar., 2009; Asam i sar., 2009, 2010).

Nijedan od navedenih metoda, uključujući i LC-metode, nije validovan (potvrđen) međulaboratorijskim ispitivanjima, i ne postoji standardni metod za određivanje *Alternaria* toksina niti su na raspolaganju mogućnosti sprovođenja testova osposobljenosti (PT šema). U bliskoj budućnosti, svakako, potrebne su proverene analitičke metode za kvantifikaciju *Alternaria* toksina u hrani i hrani za životinje u Evropi. U tom svetlu u okviru mandata M/520 (CEN, 2013), Evropski komitet za standardizaciju (eng. *European Committee for Standardization*, CEN), raspisao je poziv za tender za razvoj standardizovane metode za određivanje *Alternaria* toksina u hrani.

Ukratko, nekoliko tehnika na bazi hromatografije su pogodne za kvantifikaciju *Alternaria* toksina u hrani i hrani za životinje. LC u sprezi sa MS je postala metoda izbora zbog njene osetljivosti, selektivnosti i specifičnosti. Ograničavajući faktori su ponekad loša efikasnost prečišćavanje uzoraka, dostupnost dovoljnih količina standarda i nedostatak referentnih materijala.

2.6. Procena rizika od pojave *Alternaria* toksina na zdravlje ljudi i životinja

U svetu trenutno ne postoje propisi vezani za granične vrednosti koncentracije *Alternaria* toksina, s obzirom na to da su istraživanja pokazala da je pojava u hrani još uvek na niskom nivou i da je mala mogućnost narušavanja ljudskog zdravlja. U 2003. godini Nemački savezni institut za procenu rizika (eng. *German Federal Institute of Risk Assessment*) je pokrenuo inicijativu o prikupljanju više informacija o štetnosti *Alternaria* toksina, u cilju procene rizika koji ovi metaboliti predstavljaju za zdravlje ljudi (BfR, 2003). Značaj istraživanja o genotoksičnosti i kancerogenosti *Alternaria* toksina istakao je i Češki naučni odbor za hranu (eng. *Czech Scientific Committee on Food, CSCF*) (CSCF, 2008), dok Francuska agencija za bezbednost hrane (fr. *Agence française de sécurité sanitaire des aliments, AFSSA*) smatra da ovi mikotoksini nemaju prioritet u pogledu narušavanja zdravstvenog stanja ljudi i životinja (AFSSA, 2009). Sve navedene procene rizika po zdravlje ljudi i životinja bile su regionalnog karaktera. Na zahtev Evropske komisije objavljeno je naučno mišljenje nadležnog organa Evropske agencije za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority, EFSA*) o rizicima i uticaju *Alternaria* toksina na zdravlje ljudi i životinja u vidu sledećih zaključaka:

- Utvrđen je genotoksični efekat AOH i AME kod bakterija i u ćelijama sisara *in vitro*. ATX su mutageni kod bakterija i indukuju transformaciju ćelija dok TEN i TeA nemaju mutagena svojstva;
- Genotoksičnost i kancerogenost *Alternaria* toksina nije utvrđena *in vivo*. Indikacije egzofagalne promene su registrovane kod miševa;
- Komisija za kontaminante u lancu ishrane (eng. *Panel on Contaminants, CONTAM Panel*) je za neke od *Alternaria* toksina utvrdila prag toksikološkog značaja (eng. *threshold toxicological concern approach, TTC*) da bi ocenio relativni stepen zabrinutosti na zdravlje ljudi usled izloženosti ovim mikotoksinima preko hrane;
- Procenjena hronična izloženost AOH i AME prilikom ishrane premašuje relevantne TTC vrednosti što ukazuje na potrebu za dodatnim podacima o toksičnosti specifičnih metabolita;
- Procenjena hronična izloženost TeA i TEN prilikom ishrane je ispod relevantnih TTC vrednosti i stoga se smatra da ovi metaboliti ne predstavljaju rizik za zdravlje ljudi i životinja;
- Ne postoje relevantne informacije o apsorpciji, distribuciji i izlučivanju bilo kog *Alternaria* toksina kod životinja i ljudi neophodne za procenu rizika za zdravlje ljudi i životinja.

Za pouzdaniju procenu rizika o uticaju prisutnih *Alternaria* toksina u hrani na zdravlje ljudi i životinja nadležni organ Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) dao je sledeće preporuke:

- Postoji potreba za sertifikovanim referentnim materijalima i definisanim kriterijumima performansi metoda za analizu *Alternaria* toksina u hrani i hrani za životinje;
- Reprezentativna baza podataka o pojavi *Alternaria* toksina u hrani i hrani za životinje širom Evrope obavezno mora da precizira procenu izloženosti ovim toksinima;
- Neophodna su istraživanja o uticaju prerade hrane i hrane za životinje na *Alternaria* toksine;
- Potrebno je više informacija za većinu toksikološki relevantnih *Alternaria* toksina o kinetici toksina, uključujući i metabolizam;
- Potrebni su podaci o toksičnosti AOH i AME, kako bi se omogućila njihova procena rizika za zdravlje ljudi i životinja;
- Obavezni su dodatni podaci o genotoksičnosti za većinu *Alternaria* toksina;
- Potrebne su informacije o osetljivosti životinja na *Alternaria* toksine pri intenzivnom uzgoju.

Komisija za kontaminante u lancu ishrane (CONTAM Panel) na osnovu dostupnih podataka izvršila je procenu izloženosti ljudi od 18 do 65 godina starosti uticaju *Alternaria* toksina unetih preko hrane. Procenjena dnevna izloženost (TDI) stanovništva kreće se u opsezima od 1,9 do 39 ng/kg TM za AOH, od 0,8 do 4,7 ng/kg TM za AME, od 36 do 141 ng/kg TM za TeA i od 0,01 do 7 ng/kg TM za TEN. Najčešće vrste hrane preko kojih se unose navedeni *Alternaria* toksini u organizam čoveka su: žita i proizvodi na bazi žita, voće i proizvodi od voća, povrće i proizvodi od povrća (pre svega proizvodi od paradajza), uljarice (najčešće seme suncokreta), biljna ulja (uglavnom suncokretovo ulje) i alkoholna pića (pivo i vino) (EFSA, 2011).

3. Cilj rada

Osnovni cilj planiranih istraživanja je bio sagledavanje uticaja konvencionalno primenjenih mehaničkih (čišćenje i suvo mlevenje) i hidrotermičkih (ekstrudiranje) tehnoloških postupaka na redukciju prisutnih *Alternaria* toksina u pšenici.

Dodatni cilj je bio da se sagleda učestalost pojave *Alternaria* toksina, i stekne preliminarni uvid u pojavu i opseg koncentracije *Alternaria* toksina u pšenici sa teritorije Vojvodine kako bi se dobili preliminarni podaci o uticaju proizvodne godine, lokaliteta i najkarakterističnijih klimatskih uslova na pojavu *Alternaria* toksina u pšenici, i sagledao uticaj uslova introdukovane stimulacije i inhibicije kontaminacije pšenice sa *Alternaria* spp. na sadržaj *Alternaria* toksina u pšenici.

Krajnji cilj istraživanja je bio da se na osnovu dobijenih podataka o efikasnosti primenjenih tehnoloških postupaka u pogledu redukcije *Alternaria* toksina u pšenici i podataka o učestalosti i uzrocima pojave *Alternaria* toksina u pšenici da okvirna procena mogućnosti smanjenja rizika od pojave visokih udela *Alternaria* toksina u proizvodima od pšenice na tržištu.

4. Materijal i metodi

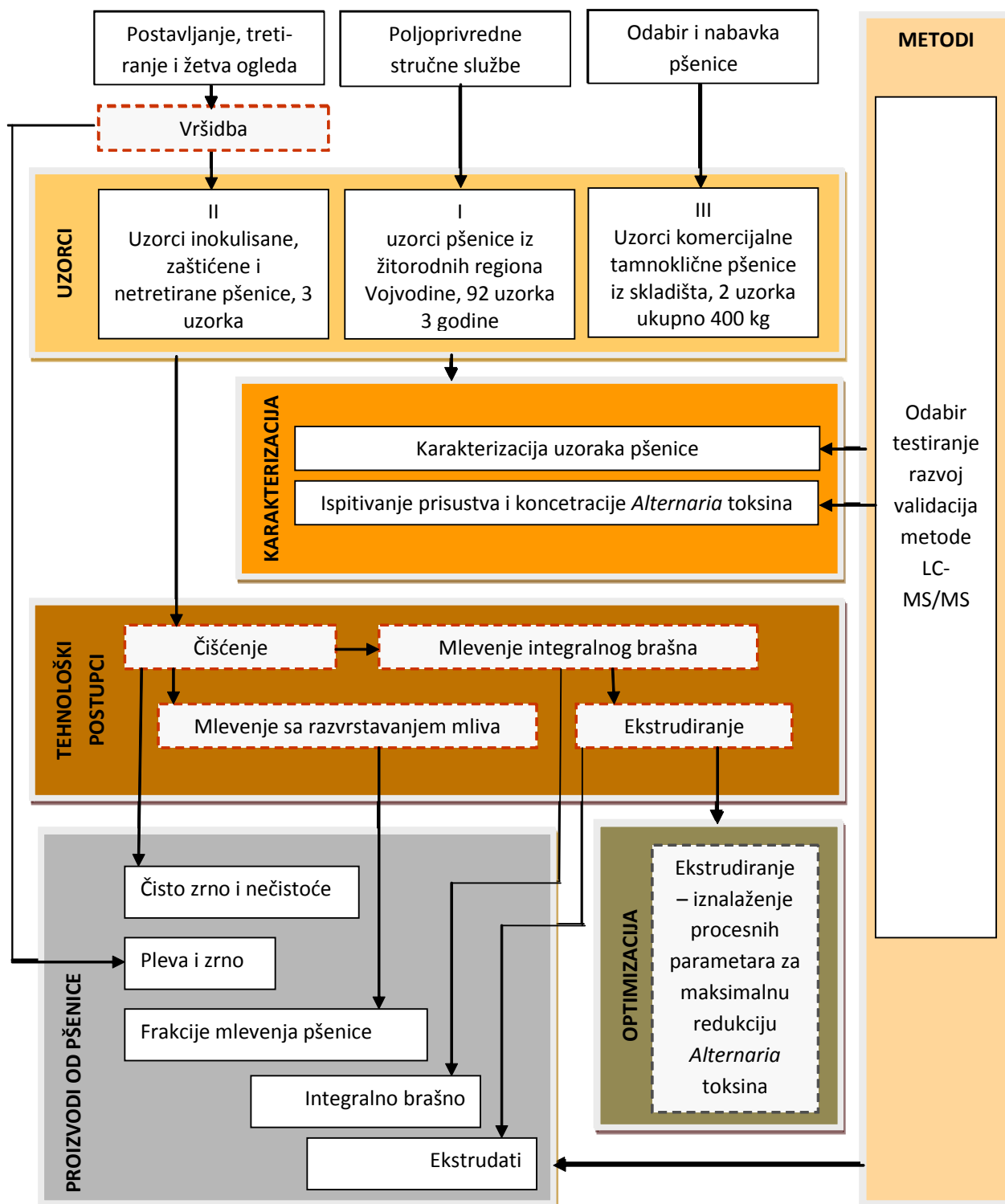
Eksperimentalna istraživanja u okviru ove doktorske disertacije realizovana su u laboratorijama Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, u laboratoriji Prirodno - matematičkog fakulteta, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine u Novom Sadu, u laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta, Departmana za fitomedycinu i zaštitu životne sredine u Novom Sadu i u laboratoriji Tehnološkog fakulteta, Katedre za tehnologije konzervisane hrane u Novom Sadu.

Istraživanja su sprovedena sistematično u pravcu ostvarenja zacrtanih ciljeva po fazama prikazanim na Slici 4.1.

Tokom prve faze istraživanja prikupljeni su uzorci potrebni za realizaciju planiranih istraživanja uključujući uzorke za procenu incidencije pojave mikotoksina u Vojvodini i uzorke prirodno i planski zaražene sa *Alternaria* spp. za potrebe ispitivanja mogućnosti primene planiranih tehnoloških postupaka za redukciju sadržaja *Alternaria* toksina.

U okviru druge faze izvršen je razvoj i optimizacija analitičke metode određivanja *Alternaria* toksina primenom LC-MS/MS tehnike uz iznalaženja optimalnog postupka ekstrakcije *Alternaria* toksina iz pšenice, kao i validacija metode određivanja *Alternaria* toksina u pšenici primenom LC-MS/MS tehnike.

Tokom treće faze ispitivana je pojava *Alternaria* toksina u uzorcima pšenice sa teritorije Vojvodine tokom višegodišnjeg perioda primenom validovane LC-MS/MS metode.



Slika 4.1 – Šematski prikaz sprovedenih istraživanja

Četvrta faza istraživanja obuhvatila je ispitivanje efikasnosti odabranih tehnoloških postupaka kao mogućih načina redukcije sadržaja *Alternaria* toksina:

- čišćenje pšenice primenom uobičajenih metoda separacije primesa na bazi fizičkih osobina zrnene mase;
- mlevenje pšenice na laboratorijskom mlinu uz ispitivanje preraspodele sadržaja *Alternaria* toksina u frakcijama mlevenja;
- ekstrudiranje uz primenu različitih uslova ekstrudiranja postavljenih uz primenu adekvatnog eksperimentalnog dizajna i ekstrudiranje brašna od celog zrna pšenice sa visokim udelom tamnokličnih zrna, kako bi se sagledala mogućnost redukcije sadržaja *Alternaria* toksina uz validaciju metode određivanja *Alternaria* toksina u ekstrudatima primenom LC-MS/MS tehnike.

4.1. Materijal

4.1.1. Uzorci pšenice

Za realizaciju ove doktorske disertacije korišćene su tri grupe uzoraka:

- I. Uzorci pšenice roda 2011, 2012. i 2013. godine prikupljeni sa različitih lokaliteta u Vojvodini kao što se vidi na Slici 4.2.

Prikupljeno je ukupno 92 uzorka pšenice iz različitih delova AP Vojvodine u periodu žetve u junu i julu tokom 2011 – 2013. godine. Uzorci pšenice su uzeti iz makro ogleda Savetodavnih poljoprivrednih službi u sledećim regionima: Severna Bačka, Južna Bačka, Zapadna Bačka, Severni Banat, Južni Banat i Srem (Slika 4.2). Postupak uzgoja pšenice obavljen je saglasno sa standardnim postupcima u poljoprivredi i dobrom proizvodnom praksom.

Uzorkovanje je obavljeno saglasno zahtevima Evropske komisije (Commission Regulation, EC/2006/401). Uzorak pšenice od oko 10 kg je homogenizovan i razdeljen četvrtanjem tako da se dobije laboratorijski uzorak od oko 500 g. Pre analize, uzorci su čuvani u zamrzivaču na -20 °C.



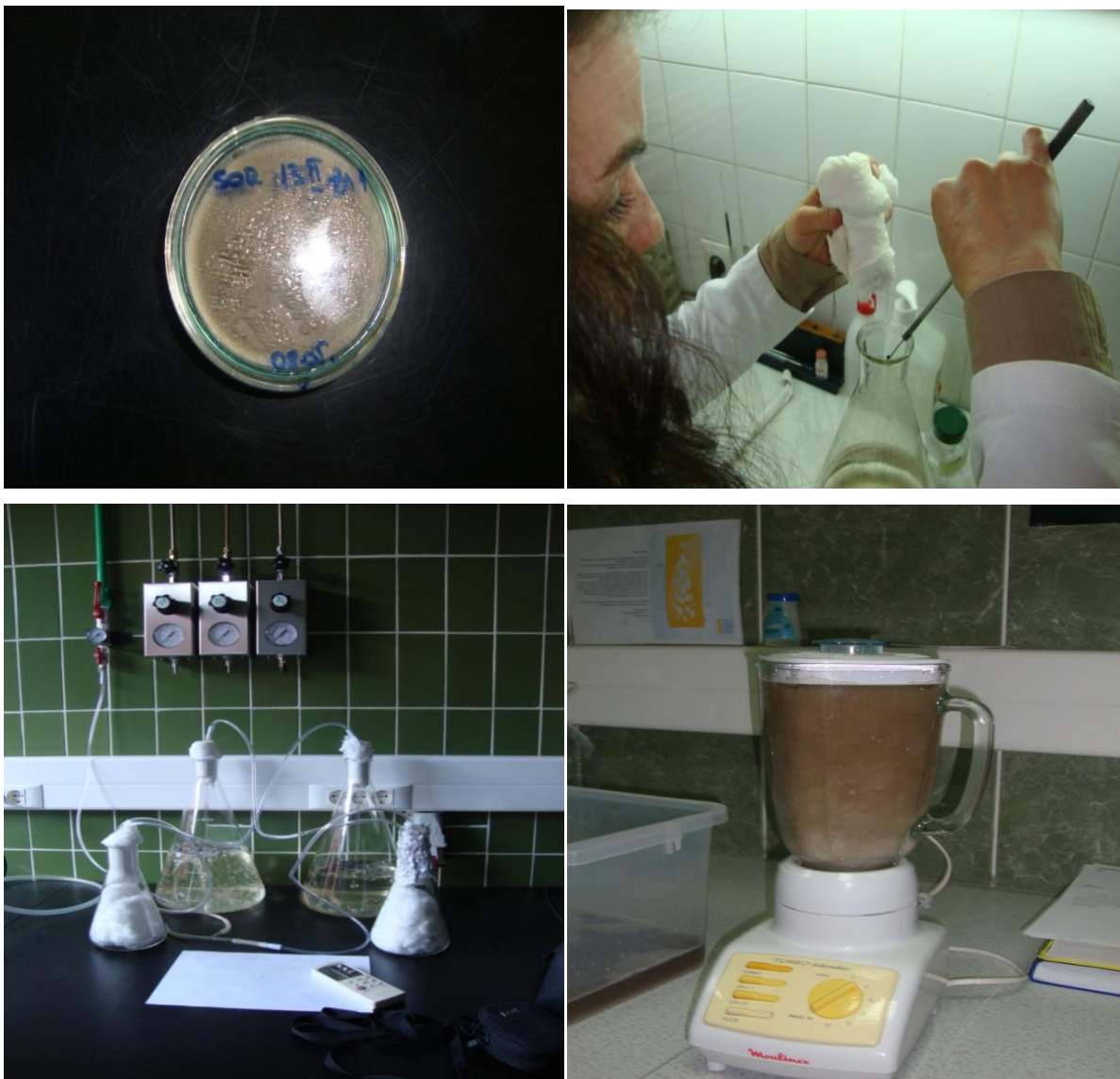
Slika 4.2 - Mapa Autonomne pokrajine Vojvodine sa regionima gde je izvršeno uzorkovanje pšenice za vreme žetve u periodu od 2011. do 2013. godine.

- II. Uzorak pšenice (*Triticum aestivum* cv. Sirtaki) roda 2013. godine inokulisan *Alternaria tenuissima* (SOR13IIZA1), na poljoprivrednom gazdinstvu u Kupusini, uzorak pšenice iste sorte i iz istog ogleada zaštićen fungicidom (Zamir), uzorak pšenice iste sorte i iz istog ogleada bez tretmana fungicidom, kao i uzorak pšenice (komercijalna pšenica 1) sa visokim udelom tamnokličnih zrna (6,4%) .

Izolat *Alternaria tenuissima* (SOR13IIZA1) je umnožen u 8 l podloge po Czapek-u bez agara na sobnoj temperaturi tokom 14 dana (Slika 4.3).

Pre prskanja, ejlemajer tikvice od po 5 l su snažno izmešane. Određivanje koncentracije inokuluma izvršena je brojanjem spora u 1 ml inokuluma u vidnom polju hemocitometra pomoću mikroskopa u deset ponavljanja. Srednja vrednost koncentracije inokuluma *Alternaria tenuissima* bila je $0,13025 \times 10^6$ infektivnih čestica/ml. U fazi punog cvetanja inokulacija je izvedena sa 8 l konidijalne suspenzije *Alternaria tenuissima*. Inokulirana površina pšenice je odmah pokrivena sa agrilom za zaštitu bilja (Stocker, Italija) tokom 48 h. Vremenski uslovi tokom maja 2013. godine bili su okarakterisani kao promenjivi sa toplijim i vlažnijim vremenskim uslovima u odnosu na višegodišnji proseka posebno sa viškom padavina (Σ padavina= 125 mm). U skladu sa Standardizovanim padavinskim indeksom

(SPI) (1,9), Z-indeks (4,8) i Palmerov indeks suše/vlage (PDSI) vrednosti (4,0), ovaj mesec je okarakterisan kao ekstremno vlažan.



Slika 4.3 - Umnožavanje inokuluma *Alternaria tenuissima*

U fazi pune zrelosti žetva pšenice je obavljena ručnim kidanjem klasova inokulisane pšenice (100 m²), pšenice bez tretmana (50 m²) i zaštićene pšenice fungicidom (50 m²). Nakon izvršene senzorske ocene klasova, gorenavedeni uzorci su propušteni preko laboratorijske vršilice radi oslobađanja zrna iz klasova. Uzorci ovršene pšenice su dalje služili za potrebe realizacije ove doktorske disertacije (Slika 4.4).



Slika 4.4 – Ogljed sa inokulacijom i zaštitom pšenice

- III. Uzorak komercijalne pšenice sa visokim udelom tamnokličnih zrna (10,2%) – komercijalna pšenica 2 iz skladišta potencijalno prirodno kontaminirana gljivama iz roda *Alternaria* od oko 400 kg. Pšenica je postepeno dvostepeno homogenizovana u dvoosovinskoj lopatastoj mešalici/kondicioneru (Model SLHSJ0.2A, Muyang, China) u trajanju od 1,5 minut (4×100 kg pšenice).

4.2. Metodi

4.2.1. Karakterizacija uzoraka pšenice

4.2.1.1. Određivanje intenziteta zaraze

Za određivanje intenziteta zaraze zrna pšenice korišćen je metod za ispitivanje zdravstvenog stanja zrna na vlažnom filter papiru (Pitt i Hocking, 2009). Od svakog uzorka uzeto je po 100 zrna pšenice, koja su površinski dezinfikovana sa po 100 ml 0,4% rastvora NaClO 2 minuta, a zatim je u istom trajanju vršeno ispiranje zrna destilovanom vodom. Po 25 zrna postavljano je u 4 ponavljanja u velike petri kutije na sterilnom filter papiru nakvašenom sa po 9 ml destilovane vode. Nakon 7 dana inkubacije u termostatu, pristupilo se oceni intenziteta zaraze gljivama. Ocena zaraženosti zrna pšenice gljivama je izvršena okularno. Na bazi izvršene ocene, izračunat je intenzitet zaraze (%) u svakom ponavljanju (I-IV), i ukupno za svaki uzorak.

4.2.1.2. Identifikacija gljiva sa zrna pšenice

Nakon određivanja intenziteta zaraze zrna pšenice gljivama u uzorcima inokulisane, prirodno kontaminirane i pšenice zaštićene fungicidom, kao i u pšenici sa visokim udelom tamnokličnih zrna, izvršeno je njihovo presejavanje na podloge za identifikaciju. Konidije i fragmenti hifa sa kolonija gljiva prenošeni su na podloga po Czapek-u (CYA) ili na krompir dekstrozni agar (PDA) i na sladni ekstrakt agar (MEA). Kolonije za koje se na osnovu makromorfoloških svojstava pretpostavilo da su predstavnici rodova *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium* i *Emericella* presejani su na CYA, a ostale na PDA i na MEA. Zasejane podloge su inkubirane 7 dana pri 25 °C.

Sve gljive koje su se javile na zrnima identifikovane su na nivou roda, okularnom metodom uz korišćenje mikroskopa. Identifikacija izolovanih vrsta gljiva izvedena je prema ključevima koji su opisani od strane Samson i sar. (2004), Samson i Frisvad (2004) i Pitt i Hocking (2009). Taksonomska klasifikacija utvrđena je na osnovu makromorfoloških i mikromorfoloških karakteristika izraslih kolonija. Od makromorfoloških osobina posmatrani su: veličina, oblik, boja, površina, struktura, naličje i eksudacija kolonija. Od mikromormofoloških osobina posmatrani su: veličina, oblik i boja konidiofora, konidiogenih ćelija i konidija.

Nakon razvoja gljiva na PDA i MEA podlogu u petri kutijama izvršeno je presejavanje gljiva na kosu PDA podlogu (u epruvetama) u svrhu formiranja kolekcije i identifikacije vrsta iz roda *Alternaria*.

4.2.1.3. Identifikacija vrsta iz roda *Alternaria*

Gljive iz roda *Alternaria* radi identifikacije do vrste presejane su na podlogu od krompir šargarepa agra (PCA_p), krompir saharozni agar (PSA) i podlogu od soka paradajza (V8). Nakon presejavanja gljive su držane 5 dana u termostatu na temperaturi od 25 °C, u mraku i 2 dana pod fluorescentnim osvetljenjem. Presejavanje gljiva roda *Alternaria* na PCA_p i PSA podlogu izvršeno je radi obrazovanja konidija povezanih u lance, koji se formiraju specifično za svaku pojedinu vrstu na osnovu čega je izvršena determinacija pomoću determinatora po Simmons-u (2007), a na podlogu V8 zbog opisa vazdušne i supstratne micelije.

4.2.1.4. Instrumentalno merenje površinske boje klasova i zrna pšenice

Boja svih uzoraka je izmerena pomoću Chroma Meter-a CR-400 (Konica Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan) korišćenjem različitih nastavaka; za merenje boje klasova pšenice korišćen je nastavak sa zaštitom za izvor svetlosti CR-A33f, dok je boja pšeničnih zrna izmerena nastavkom za granulirane materije CR-A50. Parametri boje CIE L* (svetloća), CIE a* (crveno-zeleno) i CIE b* (žuto-plavo) C* (hroma/zasićenost boje), h° (ugao boje/nijansa) i dominantna talasna dužina (DWL) su očitani korišćenjem izvora svetlosti D₆₅ i ugla posmatrača od 2°. Očitavanja tristimulusnih vrednosti CIE L*, a* i b* su kalibrisana naspram standardne bele ploče (Y=84,8; x=0,3199; y=0,3377). Svaki uzorak klasova pšenice je podeljen u četiri podgrupe, i stotinu klasova iz svake podgrupe (400 klasova iz jednog uzorka) je izmereno na 6-8 mesta, zavisno od veličine klasa. Svaki uzorak zrna pšenice je takođe podeljen u četiri podgrupe, i u deset ponavljanja je izmereno iz svake podgrupe (ukupno 40 ponavljanja po uzorku).

4.2.1.5. Određivanje udela tamnokličnih zrna

Određivanje sadržaja tamnokličnih zrna (Slika 4.5) urađeno je po ICC standardnoj metodi 102/1 (ICC, 1972).



Slika 4.5 – Izgled tamnokličnih zrna u odnosu na zdrava zrna pšenice
(<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/selectnewpest.small-grains.html>)

4.2.1.6. Klasifikacija klasova uz primenu vizuelne skale

Vizuelna skala (1-6) boje klasa pšenice je uspostavljena tako da 1 predstavlja najsvetliji uzorak, a 6 najtamniji (Slika 4.6).



Slika 4.6 – Izgled uzoraka na vizuelnoj skali

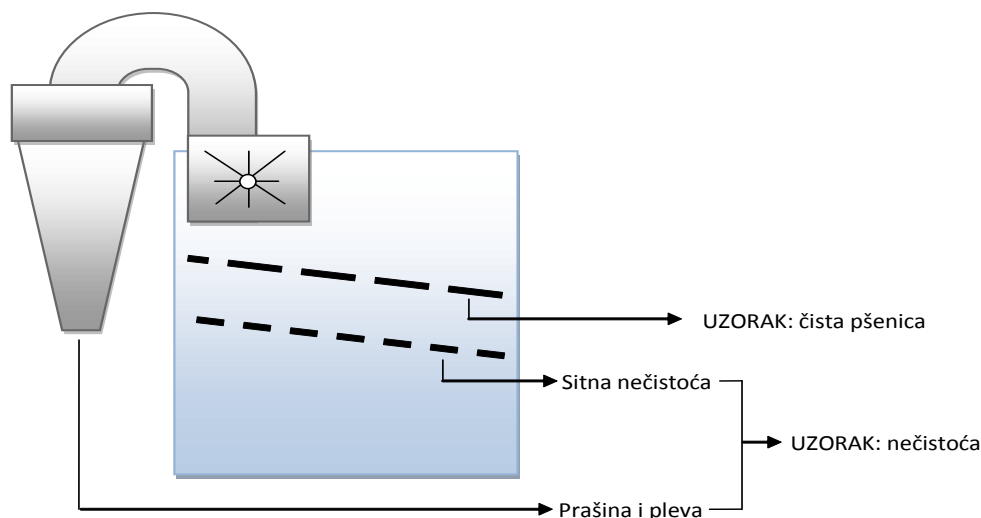
4.2.1.7. Određivanje sadržaja vode

Određivanje sadržaja vode urađeno je po standardnoj metodi ISO 712:2009.

4.2.2. Tehnološki postupci

4.2.2.1. Postupak čišćenja pšenice

Radi utvrđivanja nivoa redukcije sadržaja prisutnih *Alternaria* toksina tokom čišćenja zrnene mase pšenice uzorci pšenice su prečišćeni na laboratorijskom aspirateru (Pertin, Švedska) (Slika 4.7). Nakon čišćenja sakupljani su uzorci očišćene pšenice, uzorci nečistoća koja su propala kroz otvore rešeta aspiratera i uzorci pleve i prašine izdvojene strujom vazduha tokom čišćenja zrnene mase pšenice kroz laboratorijski aspirater.



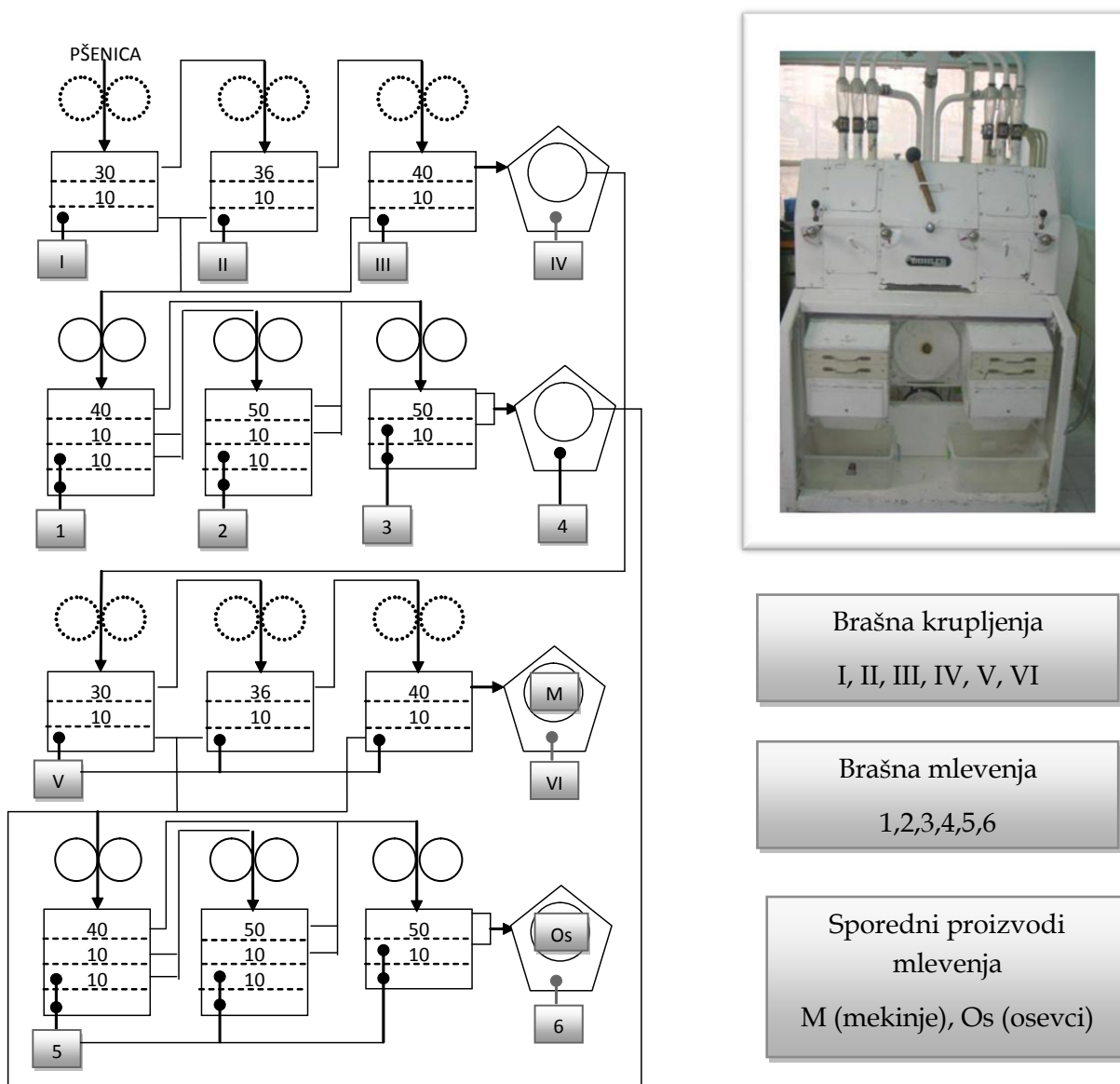
Slika 4.7 - Laboratorijski aspirater - shema

4.2.2.2. Postupak dobijanja brašna od celog zrna pšenice

Nakon homogenizacije pšenica (komercijalna pšenica 2) je samlevena na mlinu na kamen, a dobijeno brašno od celog zrna je homogenizovano na isti način kao i pšenica u dvoosovinskoj lopatastoj mešalici/kondicioneru (Model SLHSJ0.2A, Muyang, China). U granulometrijskom sastavu dobijenog brašna od celog zrna pšenice bilo je oko 60% sitnih čestica manjih od 100 μm i oko 12% krupnih čestica većih od 350 μm , dok je sadržaj vode (ISO 712:2009) u brašnu od celog zrna iznosio je 11,01 %.

4.2.2.3. Postupak mlevenja i separacije mlevnih frakcija

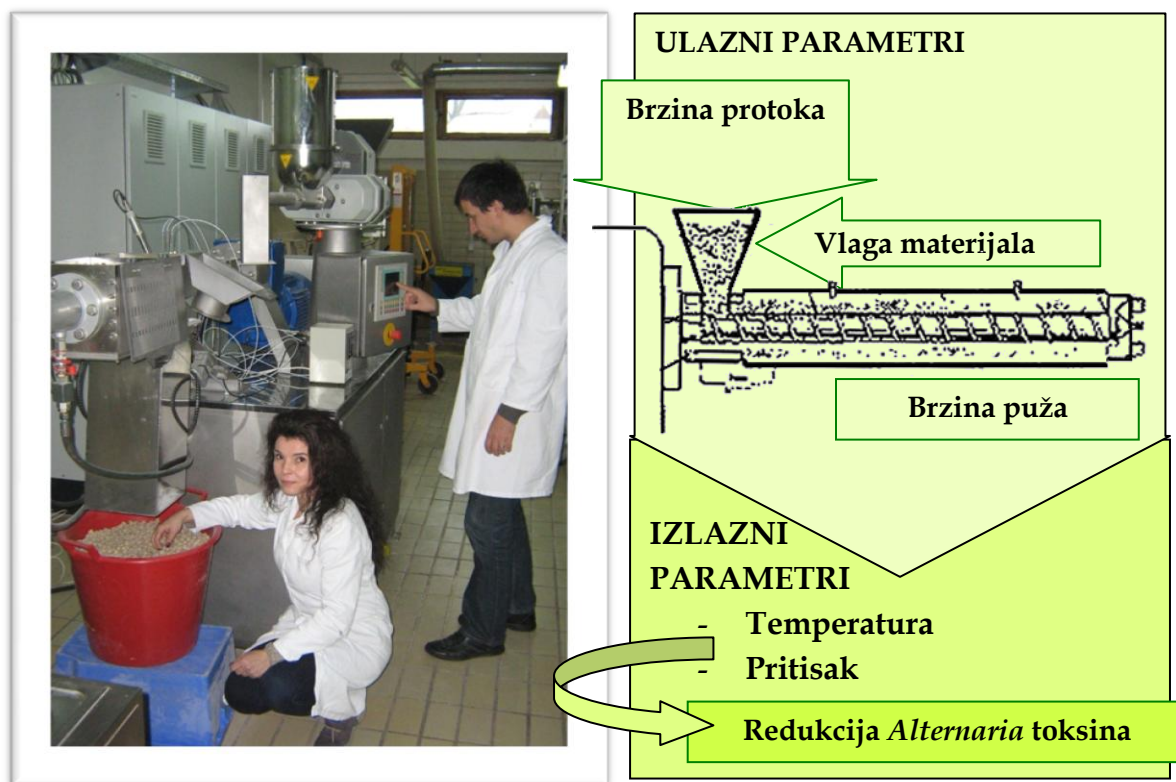
U cilju uvida u preraspodelu ispitanih *Alternaria* toksina po frakcijama mlevenja uzorci pšenice su samleveni na laboratorijskom mlevnom automatu (Bühler MLU 202, Nemačka), a dobijene frakcije mlevenja pšenice su sakupljane i čuvane na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do ispitivanja (Slika 4.8). Postupak mlevenja i separacije mlevnih frakcija ispitivanih uzoraka pšenice sastojao se od pripreme pšenice za mlevenje i samog postupka mlevenja i separacije mlevnih frakcija pšenice. Priprema pšenice za mlevenje podrazumeva vlaženje zrnene mase pšenice do 13,5% vlage i odležavanje u trajanju od 24 h. Nakon toga sledi drugo vlaženje do sadržaja vode u zrnenoj masi od 15% i dodatno odležavanje 30 minuta. Na ovaj način omotač zrna pšenice postaje žilaviji, endosperm rastresitiji, dok klica postaje plastična, što dovodi do lakšeg razdvajanja pojedinih anatomskih delova zrna pšenice na bazi nastalih razlika u strukturno mehaničkim svojstvima pojedinih anatomskih delova zrna. Mlevenje je sprovedeno po proširenoj šemi uz dobijanje šest brašna krupljenja, šest brašna mlevenja, krupnih i sitnih mekinja (osevaka). Dijagram mlevenja prikazan je na Slici 4.8.



Slika 4.8 – Laboratorijski mlevni automat Bühler MLU 220 sa dijagramom mlevenja

4.2.2.4. Postupak ekstrudiranja

Ekstrudiranje pšeničnog brašna od celog zrna obavljeno je na laboratorijskom ekstruderu sa jednim pužem (OEE 8, Amandus Kahl, Nemačka) (Slika 4.9). Pokazatelji koji su varirani prilikom ekstrudiranja su bili: vlaga brašna od celog zrna pšenice (w), brzina unosa materijala u bubanj ekstrudera (q) i brzina puža ekstrudera (v). Pojedini pokazatelji za vreme ekstrudiranja zadati su prema postavljenoj šemi ogleda. Za merenje temperature bubnja ekstrudera (T) upotrebljen je osetni element Pt 100, koji je unet u krajnju sekciju bubnja. Specifična potrošnja energije (E) određena je na osnovu očitavanja vrednosti za potrošnju energije sa ekrana ekstrudera. Ekstrudirani proizvod je ohlađen na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vibracionom hladnjaku (FB 500x200, Amandus Kahl, Nemačka) za 10 minuta. Nakon homogenizacije i svođenja uzoraka na veličinu od 500g, dobijeni ekstrudirani proizvodi su samleveni na laboratorijskom mlinu sa hlađenjem (KnifetecTM 1095, Foss, Hoganas, Švedska) i čuvani su do analize u zamrzivaču na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 4.9 – Postupak ekstrudiranja

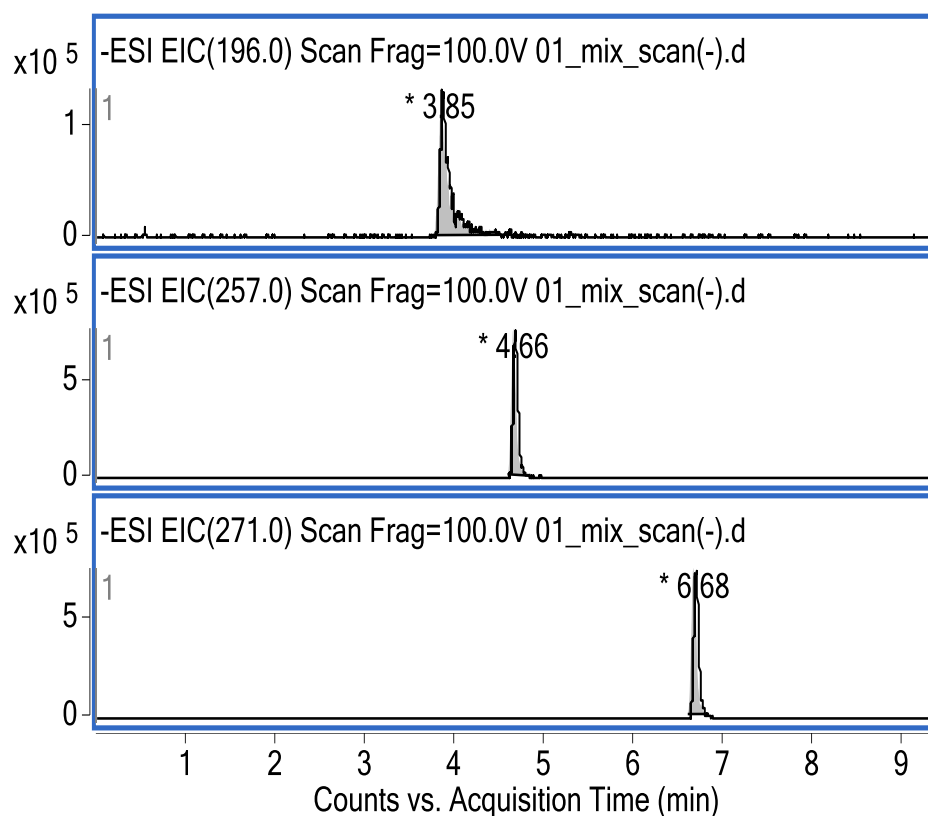
4.2.3. Metodi ispitivanja prisustva *Alternaria* toksina

4.2.3.1. Razvoj i validacija LC-MS/MS metode

Za detekciju i kvantitativno određivanje *Alternaria* toksina u uzorcima pšenice, frakcijama mlevenja pšenice, pšeničnom brašnu od celog zrna i ekstrudiranoj pšenici primenjena je tečna hromatografija visoke efikasnosti spregnuta sa masenim detektorom sa ESI jonizacijom (Tečni hromatograf Agilent 1200 sa masenim detektorom 6410A Triple Quad, Agilent Technologies, Santa Carla, SAD). Za kontrolu instrumenta i analizu podataka korišćen je MassHunter ver. B.03.01. software (Agilent Technologies Inc., USA). Za hromatografsko razdvajanje *Alternaria* toksina korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm×4,6 mm i.d., 1,8 μm) (Agilent Technologies, Santa Carla, SAD) pri temperaturi od 50 °C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0,05% vodenog rastvora mravlje kiseline (HCOOH) i metanola (MeOH) pri brzini protoka 1 ml/min. Odabrani *Alternaria* toksini su eulirani u gradijentnom režimu počevši sa 30% MeOH, uz linearno povećanje do 70% MeOH u 6. minutu, za kojim sledi linearno povećanje do 100% MeOH u 9. minutu. Od 9 -12 minuta udeo MeOH bio je 100%, a zatim se u toku 3 minuta kolona uravnotežava pri početnom sastavu mobilne faze.

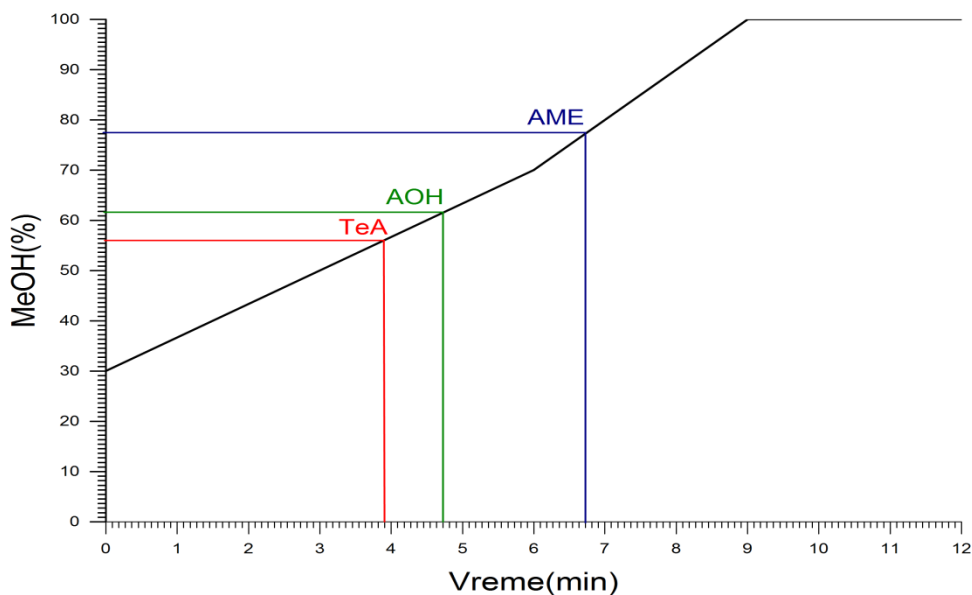
Za optimizaciju MS/MS parametara korišćen je standardni zbirni rastvor *Alternaria* toksina, koncentracije od po 3 µg/ml AOH, AME i TeA. U prvoj fazi optimizacije, standard je snimljen u scan modu, u m/z opsegu 120–600 Da, uz negativni polaritet, i pri naponu fragmentora od 100 V, temperaturi gasa za sušenje (N₂) od 350 °C, protoku gasa za sušenje 10 l/min, pritisku gasa za nebulizaciju od 45 psi i naponu kapilare od 4 kV. Jedinjenja od interesa registrovana su korišćenjem hromatograma po određenom jonu (EIC).

Na Slici 4.10 prikazani su hromatogrami po određenom jonu (EIC) za analite od interesa.



Slika 4.10 - Hromatogrami po određenom jonu (EIC) pri koncentraciji *Alternaria* toksina 3 µg/ml

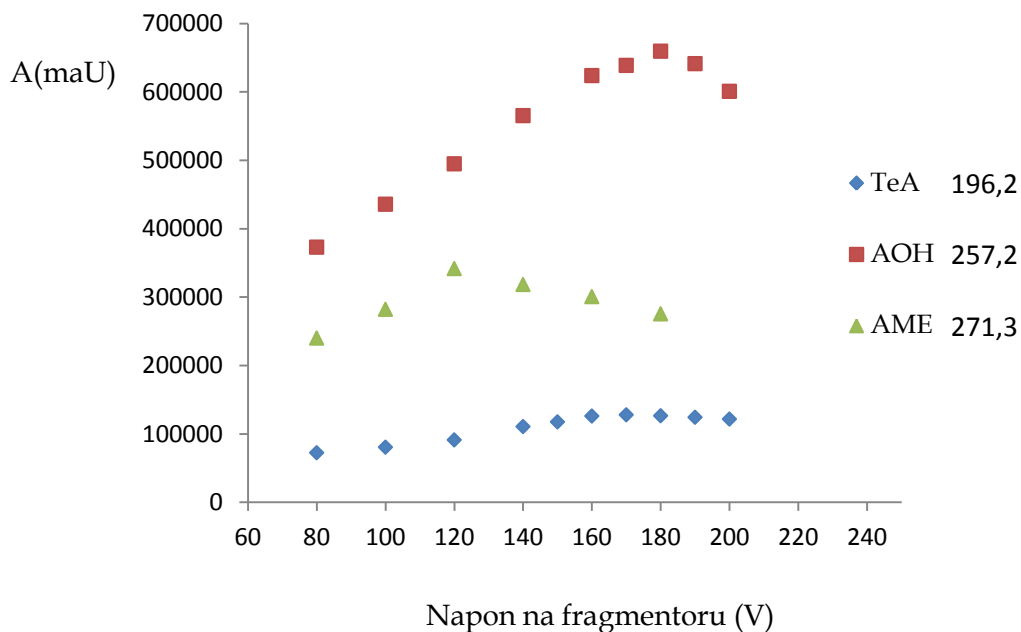
Na osnovu hromatograma po određenom jonu (EIC) i utvrđenog retencionog vremena euliranja posmatranih *Alternaria* toksina, a u cilju izbora uslova za optimizaciju MS/MS parametara, utvrđen je odnos mobilne faze pri kojoj ispitivani analiti euliraju (Slika 4.11).



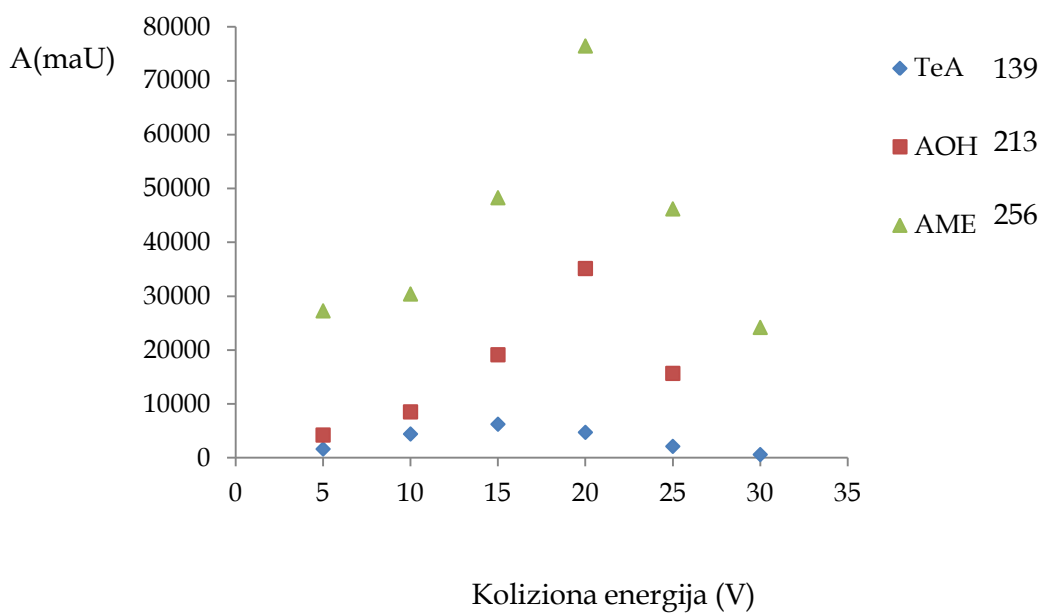
Slika 4.11- Odnos mobilne faze MeOH/H₂O u funkciji vremena

Optimizacija, koja je za cilj imala obezbeđenje maksimalne osetljivosti i pouzdanosti rezultata i što niže LOD i LOQ, zasnivala se na pronalaženju optimalnih tranzicija jona određivanih *Alternaria* toksina, kao i njihovih akvizicionih parametara u MRM režimu rada, korišćenjem *flow-injection* tehnike pri utvrđenom odnosu mobilne faze za svaki analizirani *Alternaria* toksin (61% MeOH za AOH, 77% za AME i 56% za TeA). Optimizacija napona na fragmentoru i kolizione energije izvršena je postupnim promenama navedenih parametara, i praćenjem uticaja na intenzitet signala. Da bi se obezbedio najjači signal prekursor jona prvobitno je optimizovan napon na fragmentor. Analizirani su naponi fragmentora od 80 do 200 V. Na Slici 4.12 prikazane su zavisnosti površine pika jona prekursora za svaki ispitivani *Alternaria* toksin od napona na fragmentoru.

Po šest vrednosti kolizionih energija od 5 do 30 V sa koracima od po 5 V ispitane su za svaki od odabranih produkt jona pri utvrđenom optimalnom naponu fragmentora za svaki od *Alternaria* toksina (Slika 4.13). Najveće površine pikova ukazale su na najbolje kombinacije napona na fragmentoru i kolizionih energija za svaki ispitivani jon.



Slika 4.12 - Zavisnost intenziteta signala (I) od napona na fragmentoru za jone prekursore *Alternaria* toksina.



Slika 4.13 - Zavisnost intenziteta signala (I) od kolizijske energije za target jon za svaki *Alternaria* toksin

U **Tabeli 4.1** prikazani su optimizovani LC-MS/MS parametri.

Tabela 4.1 - Molekulska masa, retenciono vreme (tr), odgovarajući m/z prekursor jona (Q1), m/z praćenih produkt jona (Q3), naponi fragmentora (FV) i kolizione energije (CE) za ispitivane *Alternaria* toksine

<i>Alternaria</i> toksin	Molekulska masa (g/mol)	Srednja vrednost tr (min)	Q1	Q3	FV (V)	CE (V)
AOH	258,2	5,03	257,2	213*	180	20
				215	180	25
AME	272,3	7,01	271,3	256*	130	20
				228	160	30
TeA	197,2	4,14	196,2	139*	170	15
				112	170	20

* Tranzicije korišćene za kvantifikaciju

4.2.3.2. Odabir optimalnog postupka ekstrakcije *Alternaria* toksina

Najpogodniji metod pripreme za određivanje *Alternaria* toksina odabran je tako da uz prihvatljiv nivo prinosa analita u koraku ekstrakcije (R%) obezbedi minimalni uticaj matriksa (ME%) na signal analita iz uzoraka pšenice. Postojeći metodi su adaptirani tako da uz jednu ekstrakciju omoguće istovremenu analizu i kvantifikaciju sva tri *Alternaria* toksina (AOH, AME i TeA) iz istog uzorka pšenice.

Da bi se prevazišla nehomogena distribucija mikotoksina, uzorkovanje je obavljeno saglasno zahtevima Regulative (Commission Regulation, EC/401/2006). Prosečan uzorak pšenice od oko 10 kg je homogenizovan i razdeljen četveranjem kako bi se dobio laboratorijski uzorak od oko 500 g. Uzorak je samleven u prekrupu sa česticama veličine 1 mm, korišćenjem laboratorijskog mlina sa hlađenjem (Knifetec™ 1095 mill, Foss, Hoganas, Švedska).

U cilju odabira optimalnog postupka ekstrakcije *Alternaria* toksina testirani su metodi pripreme uzoraka opisani od strane Streit i sar. (2013) (dva metoda), Reinhold i Bartels (2010) (Agilent postupak), Rasmussen i sar. (2010) i Siegel i sar. (2010a). Za sve testirane metode određeni su prinos ekstrakcije (R%) i mogući uticaji matriksa (ME), koji su ocenjeni u odnosu na smernice definisane u Commission Decision 2002/657/EC.

Primenom modifikovane metode koju su opisali Siegel i sar. (2010a) ostvarene su prihvatljive granice potrebnih kriterijuma efikasnosti (EC/401/2006) srednjeg prinosa za AOH, AME i TeA. Prosečni odzivi za AOH, AME i TeA bili su 81%, odnosno 75% i 86%, dok za ostale testirane metode nije dobijen zadovoljavajući prinos (efikasnost ekstrakcije).

Usvojeni modifikovani metod opisan od strane Siegel i sar. (2010a) pokazuje značajan uticaj matriksa na signal ispitivanih *Alternaria* toksina, te je neophodno da se primeni kalibracija pripremljena u matriksu (eng. *matrix-matched calibration curve*, MMC), kako bi se ovi problemi prevazišli (Janić Hajnal i sar., 2014a).

Prema odabranom metodu, uzorci su pripremljeni na sledeći način: u svaku ejlenmajer tikvicu tačno je odmereno oko 1 g homogenizovanog uzorka i pomešano sa 7 ml vode. Potom je dodato 2 ml 0,2 mol/l vodenog rastvora hloridne kiseline (HCl) i 5 ml etil acetata (EtOAc). Tako dobijen ternarni sistem mućkan je 45 min, podvrgnut delovanju ultrazvuka u trajanju od 10 min (ATM40-3LCD, Madrid, Španija) i zatim ponovo mućkan 45 min. Potom su ekstrakti prebačeni u staklene kivete i centrifugisani 15 min. na 5000 o/min, kako bi se ostvarilo potpuno razdvajanje faza. Zatim je 2 ml gornjeg EtOAc sloja preneto u drugu staklenu kivetu i upareno u struji azota (N₂) (Reacti-Therm I #18821, Thermo Scientific, SAD) do suva. Suvi ostatak je rastvoren u 1 ml MeOH LC/MS čistoće, prenet u HPLC vijalu preko Econofilter PTFE (13 mm, 0,2 µm) filtra (Agilent Technologies, Kina) i čuvan na -20 °C.

4.2.3.3. Ispitivanje uticaja matriksa

Povećanje ili smanjenje intenziteta signala analita, kao posledica uticaja matriksa, predstavlja glavni problem u tečnoj hromatografiji u sprezi sa masenom spektrometrijom. Iako tačan mehanizam povećanja/smanjenja signala pod uticajem matriksa nije poznat, pretpostavlja se da komponente matriksa utiču na efektivnost jonizacionog procesa, uzrokujući pozitivne ili negativne efekte na količinu formiranih jona analita. Tačnost ispitivanja analita iz uzorka se meri prinosom (*R*) *Alternaria* toksina. Ukoliko se dobiju manje *R* vrednosti korišćenjem kalibracione krive konstruisane upotrebom standarda rastvorenih u čistom rastvaraču ili mobilnoj fazi (eng. *solvent calibration curve*, SC), komponente matriksa su uticale na smanjenje signala, dok obrnut slučaj označava povećanje signala pod uticajem matriksa. Drugi način provere uticaja matriksa koji je korišćen i u ovoj doktorskoj disertaciji jeste upoređivanje nagiba SC i MMC krivih, čiji odnos (SSE) ukazuje na postojanje povećanja/smanjenja signala pod uticajem matriksa. Za sada ne postoji zvanična regulative koja propisuje dozvoljen uticaj matriksa na analitički signal. Za ispitivanje uticaja matriksa pri određivanju *Alternaria* toksina u pšenici primenom LC-MS/MS metode bilo je potrebno ispitati odnos između kalibracionih krivih čistih standarda u rastvaraču (SC) i standarda koji su dodati u pripremljene uzorke nakon uparavanja (MMC). S obzirom na to da su LC-MS/MS metodom analizirani uzorci pšenice i uzorci ekstrudiranog pšeničnog brašna od celog zrna pšenice, bilo je potrebno analizirati MMC standarde za oba matriksa nakon pripreme. Karakteristike formiranih MMC krivih i izračunati matriks efekti prikazani su u **Tabeli 4.2.**

Tabela 4.2 - Uticaj matriksa na analitički signal *Alternaria* toksina

Analit	SC			MMC		
	Linearni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linearna jednačina	r^2	Linearna jednačina	r^2	SSE (%)
Pšenica						
AOH	2,5-10	$y = 6,880x - 6$	0,9968	$y = 6,8525x - 5,976$	0,9968	99,6
	2,5-100	$y = 18,814x + 2,7101$	0,9981	$y = 18,834x - 11,752$	0,9972	100,1
AME	2,5-10	$y = 86040x - 15,5$	0,9924	$y = 79,759x - 14,369$	0,9924	92,7
	2,5-100	$y = 118,417x + 128,02$	0,9980	$y = 11,3244x + 155,97$	0,9978	95,6
TeA	7,5-100	$y = 13,658x + 9,943$	0,9967	$y = 17,109x + 76,028$	0,9936	125,3
Ekstrudirano pšenično brašno						
AOH	2,5-10	$y = 8,14x - 9,75$	0,9964	$y = 7,10x - 4,5$	0,9988	107,9
AME	2,5-10	$y = 10,2519x - 13,671$	0,9969	$y = 9,6121x + 25,637$	0,9995	93,8
TeA	25-100	$y = 11,319x - 123,75$	0,9989	$y = 15,392x - 160,69$	0,9997	136,0

Iz **Tabele 4.2** vidi se da u slučaju AME u uzorku pšenice (92,7-95,6%), kao i u uzorku ekstrudiranog pšeničnog brašna od celog zrna pšenice (93,8%) dolazi do izvesnog smanjenja signala usled uticaja matriksa. U uzorku pšenice (125,3%), kao i u uzorku ekstrudirane pšenice (136,0%) TeA pokazuje pojačanje signala usled uticaja matriksa, dok AOH u slučaju ekstrudiranog pšeničnog brašna od celog zrna pšenice pokazuje blago povećanje signala, a u uzorku pšenice skoro nema uticaj matriksa na odziv signala. Linearnost je okarakterisana vrednostima koeficijentata korelacije (r^2) iznad 0,9924. Zbog uticaja matriksa na analitički signal analita od interesa koncentracija *Alternaria* toksina u svim uzorcima u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije su određivani u odnosu na MMC.

4.2.3.4. Validacija metode

Razvijena metoda je validovana primenom interne procedure u skladu sa smernicama datim u Commission Decision 2002/657/EC. Validacija metode je obavljena u pogledu linearnosti, tačnosti, preciznosti (ponovljivosti), granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ). Za sva jedinjenja u čistom rastvaraču i u matriksu konstruisane su kalibracione krive zavisnosti površina pikova u odnosu na koncentraciju odgovarajućih kalibracionih standarda na deset, odnosno sedam kalibracionih nivoa za pšenicu, odnosno brašno od celog zrna pšenice i ekstrudate respektivno, u rasponima prikazanim u **Tabeli 4.2**.

Linearnost kalibracionih krivih je izražena preko koeficijenta korelacije (r^2). Za kalibracione krive u matriksu (eng. *matrix-matched calibration curve*, MMC), uzorci pšenice i uzorci ekstrudata bez analita od interesa su obogaćeni sa radnim standardnim rastvorima u završnom koraku rekonstitucije. Za ukupan prinos metode uzorci ispitivanih matriksa bez analita od interesa su "spajkovani" sa radnim standardnim rastvorima pre pripreme uzoraka za analizu, tj. pre ekstrakcije analita od interesa obezbeđujući linearnost u istom rasponu za tri analizirana *Alternaria* toksina u tri ponavljanja (**Tabela 4.3**). "Spajkovani" uzorci su pre pripreme uzoraka za analizu ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi da se omogući isparavanje rastvarača i uspostavljanje ravnoteže između analita i matriksa. U cilju diferencijacije između efikasnosti ekstrakcije i slabljenja/pojačavanja signala izazvanog uticajem matriksa, izračunati su odnosi nagiba linearnih funkcija kalibracije koji rezultiraju očiglednim prinosom (R_A), odnosno prinosom celokupne metode i slabljenjem/pojačanjem signala (eng. *signal suppression/enhancement*, SSE) izazvanih uticajem matriksa. Prinos koraka ekstrakcije (R_E), odnosno prinos analiziranih *Alternaria* toksina nakon pripreme uzorka je izračunat deljenjem celokupnog prinosa (R_A) sa efektima matriksa (SSE), kao što je prikazano u nastavku (modifikovano po Matuszewski i sar., 2003):

$$R_A(\%) = 100 \times \text{nagib}_{\text{spajkovani uzorci}} / \text{nagib}_{SC}$$

$$SSE(\%) = 100 \times \text{nagib}_{MMC} / \text{nagib}_{SC}$$

$$R_E(\%) = 100 \times R_A / SSE$$

Tačnost metode procenjena je na osnovu ispitivanja prinosa *Alternaria* toksina. U **Tabeli 4.3** date su vrednosti za ukupan prinos metode i prinosi pripreme uzorka za AOH, AME i TeA. Može se videti da su ukupni prinosi metode i prinosi pripreme uzoraka za sve analite od interesa bili iznad 70%. Stoga je dobijeni sadržaj analiziranih *Alternaria* toksina u ispitivanim uzorcima u ovoj doktorskoj disertaciji korigovan za interni prinos pripreme uzoraka (R_E).

Preciznost metode je iskazana u odnosu na ponovljivost, tj. kao relativna standardna devijacija (%RSD), od 6 ponavljanja na tri nivoa koncentracije (25,0 µg/kg, 50,0 µg/kg i 100,0 µg/kg za TeA i 2,5 µg/kg, 5 µg/kg i 10 µg/kg za AOH i AME) uz korišćenje "spajkovanih" uzoraka pšenice i ekstrudiranog brašna od celog zrna pšenice bez analita od interesa pre analize uz korišćenje MMC krive. Preciznost u uslovima unutar laboratorijske reproduktivnosti (ULR), tj. kao relativna standardna devijacija (%RSD) je određena analizom "spajkovanih" uzoraka pšenice i ekstrudiranog brašna od celog zrna pšenice uz korišćenje MMC krive na istim koncentracijskim nivoima, kao i za ispitivanje ponovljivosti, tokom 3 dana na istom uređaju od strane istog operatera. Za pšenicu i ekstrudirano pšenično brašno preciznost, iskazana kao ponovljivost i unutar laboratorijska reproduktivnost (ULR) dale su

RSD vrednosti prikazanih u **Tabeli 4.4**, ispunjavajući kriterijume za $RSD \leq 20\%$ i ukazujući na dobru preciznost razvijene metode.

Tabela 4.3 – Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) na osnovu MMC i prinos *Alternaria* toksina na osnovu SC (R_A) i MMC (R_E)

Analit	LOD/ LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nivo spajkovanja ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linearna jednačina spajkovanih uzoraka	r^2	R_A (%)	R_E (%)
Pšenica						
AOH		2,5-10	$y = 12,940x + 6,0$	0,9927	71,4	71,7
	0,75/2,5	2,5-100	$y = 13,252x - 0,6751$	0,9984	70,4	70,4
AME	0,1/0,3	2,5-10	$y = 91,600x - 52,5$	0,9940	70,7	76,2
	2,5/7,5	2,5-100	$y = 86,945x + 66,977$	0,9918	73,4	76,8
TeA	2,5/7,5	7,5-100	$y = 11,970x + 318,59$	0,9967	87,6	70,0
Ekstrudirano pšenično brašno						
AOH	0,5/2,0	2,5-10	$y = 6,9668x - 6,835$	0,9980	89,1	82,6
AME	0,1/0,3	2,5-10	$y = 72,390x + 26,367$	0,9919	70,6	75,3
TeA	1,0/5,0	25-100	$y = 12,955x - 192,83$	0,9979	114,4	84,2

Tabela 4.4 - Parametri validacije metode određivanja *Alternaria* toksina u pšenici i ekstrudiranom proizvodu

	TeA		AOH		AME	
	Ponovljivost	ULR	Ponovljivost	ULR	Ponovljivost	ULR
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
Pšenica						
1*	10,7	13,6	16,0	18,1	12,7	14,4
2*	8,3	9,2	11,5	14,0	11,1	15,0
3*	7,8	8,9	9,2	9,3	11,9	11,7
Ekstudirano pšenično brašno						
1*	13,9	15,4	13,5	16,6	9,0	12,7
2*	8,6	10,0	11,5	14,4	8,3	8,3
3*	8,1	9,4	10,6	11,1	5,5	8,0

1*- nivo koncentracije spajkovanog uzorka od 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za TeA i 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za AOH i AME;
 2*- nivo koncentracije spajkovanog uzorka od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za TeA i 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za AOH u AME;
 3*- nivo koncentracije spajkovanog uzorka od 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za TeA i 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za AOH i AME.

Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) su određeni injektovanjem opadajućih koncentracija MMC rastvora i određivanjem koncentracije pri kojoj je odnos S/N ≥ 3 i ≥ 10 za LOD i LOQ, respektivno. Granica detekcije koja je dala EFSA (za sve prehrambene proizvode) variraju od 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za AOH i AME i od 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za TeA, sa medianom granice detekcije za svaki analit od 6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respektivno. Takođe, LOQ (za sve prehrambene proizvode) variraju od 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za AOH, 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za AME i 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za TeA, sa medianom LOQ od 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respektivno (EFSA 2011). Dobijene vrednosti LOD i LOQ su u navedenim rasponima (**Tabela 4.3**).

Na bazi dobijenih parametara validacije, razvijeni metod je uspešno validovan prema kriterijumima specificiranim u Commission Regulation 2002/657/EC za kvantitativnu konfirmaciju metoda (European Commission, 2002) za pšenicu i ekstrudate.

4.2.4. Metodi eksperimentalnog dizajna i statistički metodi

Eksperimentalni plan koji je korišćen pri eksperimentu ekstrudiranja brašna od celog zrna pšenice bio je Box i Behnkenov frakcioni faktorijelni plan sa 2 nivoa i 3 parametra, u 1 bloku, a realizovan je korišćenjem metode odzivne funkcije (eng. *response surface method*, RSM) (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri336.htm>). Glavna prednost korišćenja RSM je smanjivanje broja eksperimenata koji obezbeđuju dovoljno informacija za statistički validne rezultate. Jednačine RSM opisuju uticaje koje procesne promenljive imaju na posmatrane odzivne promenljive, utvrđuje međuzavisnosti procesnih promenljivih i prikazuje kombinovane uticaje procesnih veličina na posmatrane odzive sistema.

Sledeća jednačina u obliku polinoma drugog reda (eng. *second order polynomial*, SOP) je korišćena za fitovanje eksperimentalnih podataka i formiranje matematičkog modela. Razvijeno je 6 ovakvih jednačina, za predikciju 6 odziva (Y), na osnovu 3 procesne promenljive (X), za svaku mešavinu:

$$Y_k^l = \beta_{k0}^l + \sum_{i=1}^2 \beta_{ki}^l \cdot X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii}^l \cdot X_i^2 + \beta_{k12}^l \cdot X_1 \cdot X_2, \quad k=1-6, l=1-p$$

pri čemu su: $\beta_{k0}^l, \beta_{ki}^l, \beta_{kii}^l, \beta_{k12}^l$ konstantni regresioni koeficijenti, a Y_k^l , ili: TeA, AOH, AME, kao i: pritisak (p), temperatura (T) i specifična potrošnja energije (E); dok su: X_1 - w; X_2 - q; X_3 - v.

Da bi se kompleksnije sagledao kvalitet posmatranih uzoraka, vršeno je izračunavanje SS, odnosno analiza standardne ocene (eng. *standard score*, SS), na osnovu hemometrijskog prilaza eksperimentalno merenih vrednosti za TeA, AOH i AME korišćena je metoda min-max normalizacije, koja je u širokoj upotrebi za poređenje različitih karakteristika kompleksnih uzoraka, koji se ispituju različitim eksperimentalnim metodama.

Pošto su jedinice i rasponi vrednosti različitih posmatranih fizičkih i hemijskih osobina različite, potrebno je da se podaci svake grupe podataka svedu na tzv. normalizovane standardne ocene, koje su bezdimenzionalne jedinice, dobijene oduzimanjem minimalne vrednosti od srednje vrednosti, podeljene sa razlikom maksimalne i minimalne vrednosti, prema sledećoj jednačini:

$$\bar{x}_i = \frac{\max_i x_i - x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i, \text{ gde } x_i \text{ predstavlja izmerenu vrednost.}$$

Srednja vrednost zbira normalizovanih koeficijenata za svako merenje koje je izvedeno za svaki uzorak, daje jedinstveni bezdimenzioni broj, koji se naziva standardna ocena (eng. *standard score analysis*, SS), koji predstavlja specifičnu kombinovanu ocenu uzorka za sva izvršena merenja i nema nikakvo ograničenje koje bi se odnosilo na fizičke jedinice ili raspone vrednosti koje ima. Ovakav pristup takođe olakšava buduća istraživanja sa novim uzorcima koji nisu uključeni u ovoj studiji i poređenja sa posmatranim uzorcima.

Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analyses*, PCA) omogućava da se značajno smanji broj promenljivih koje učestvuju u analizi, a omogućava i detektovanje i analizu inherentne, skrivene, strukture između merenih veličina i odzivnih promenljivih koje se ispituju. Celokupna matrica merenih podataka je podvrgnuta PCA analizi. PCA analiza je primenjena uspešno za grupisanje i razdvajanje različitih uzoraka u faktorskoj ravni, na osnovu razlika u merenjima.

Korišćenjem deskriptivne statistike, rezultati eksperimentalnih merenja prikazani su srednjim vrednostima, standardnim devijacijama (SD), minimumima, maksimumima i varijansama, za svaki posmatrani tretman. Eksperimentalno dobijeni podaci su podvrgnuti ANOVA analizi, kako bi se ispitaio uticaj procesnih promenljivih na odzivne promenljive. PCA analiza je uspešno primenjena da se klasifikuju i odvoje različite mešavine u faktorskoj ravni (na osnovu merenih vrednosti). Primenjena je tehnika prepoznavanja sličnosti na osnovu eksperimentalnih vrednosti da bi se izvršilo odvajanje uzoraka.

U ovom istraživanju, primenjena je klusterska analiza (eng. *cluster analysis*, CA) da bi se razdvojili uzorci po grupama, na osnovu razlika u redukciji TeA, AOH i AME tokom ekstrudiranja. Eksperimentalni podaci za svaki od uzoraka su poslužili kao koordinatne vrednosti za svaki od 15 uzoraka u 6-dimenzionalnom prostoru, a na osnovu njihovog položaja nacrtana su dva dendograma (za promenljive p, T, E, TeA, AOH i AME) i za uzorke (15 tačaka u 6-dimenzionalnom prostoru). U ovim istraživanjima računata su ukupne povezanosti tačaka (eng. *complete linkage*), a rastojanja su merena korišćenjem City-block (Manhattan) algoritma.

Izračunavanje RSM, ANOVA, PCA i CA analiza izvršeno je korišćenjem softverskog paketa Statistica version 12 (StatSoft Inc. 2013, SAD)®.

5. Rezultati i diskusija

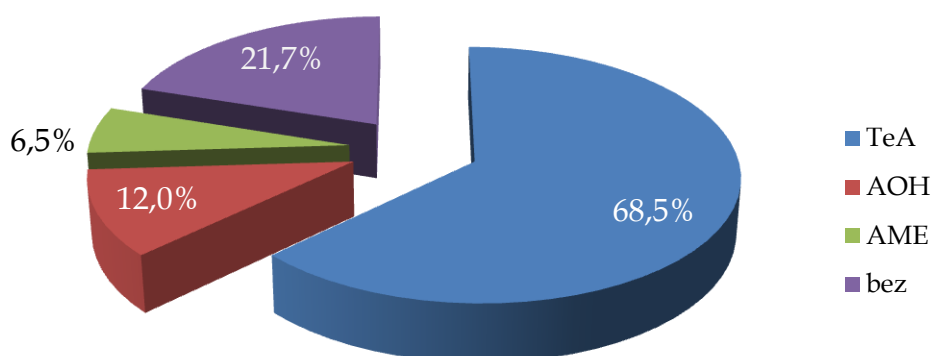
Rezultati istraživanja usmerenih na sagledavanje mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria* toksina u pšenici primenom odabranih tehnoloških postupaka obuhvatili su:

- I. Ispitivanja usmerena na sagledavnje učestalosti pojave i uticaj proizvodnih uslova na pojavu najčešćih *Alternaria* toksina
 - Ispitivanje učestalosti pojave *Alternaria* toksina u pšenici gajenoj u uslovima savremenih trendova klimatskih promena u Vojvodini kao značajnom žitorodnom regionu uključujući:
 - analizu zavisnosti pojave *Alternaria* toksina od mikroklimatskih uslova godine i regiona;
 - analizu istovremene pojave različitih *Alternaria* toksina i
 - analizu povezanosti prisustva *Alternaria* toksina i udela tamnokličnih zrna u pšenici.
 - Ispitivanja uticaja ciljane kontaminacije, odnosno zaštite pšenice na pojavu *Alternaria* toksina u pšenici.
- II. Ispitivanje efekata odabranih tehnoloških postupaka na redukciju sadržaja *Alternaria* toksina u ciljno odabranim uzorcima u kojima su najznačajniji *Alternaria* toksini bili zastupljeni sa sadržajima koji omogućuju analitičko praćenje efekata primenjenih tehnoloških postupaka i to:
 - Procesu žetve, odnosno vršidbe pšenice;
 - Uobičajenih postupaka prečišćavanja pšenice;
 - Standardnog postupka mlevenja i razvrstavanja mliva;
 - Postupka i procesnih parametara hidrotermičkog tretmana pšenice postupkom ekstrudiranja.
- III. Integraciju rezultata sa sagledavanjem efekata primene odabranih tehnoloških postupaka na redukciju sadržaja mikotoksina u svetlu procene smanjenja rizika po zdravstvenu bezbednost proizvoda prerade pšenice u kompletnom lancu od proizvodnje pšenice do finalnih proizvoda namenjenih krajnjem potrošaču.

5.1. Učestalost pojave i uticaj proizvodnih uslova na pojavu najčešćih *Alternaria* toksina

5.1.1. Učestalost pojave *Alternaria* toksina u pšenici

Analiza učestalosti pojave *Alternaria* toksina bazirana je na ukupno 92 analizirana uzorka pšenice iz 3 proizvodne godine (2011-2013) okarakterisane različitim klimatskim uslovima. Od ukupnog broja analiziranih uzoraka 63 (68,5%) bilo je prirodno kontaminirano sa TeA, 11 (12,0%) sa AOH i 6 (6,5%) sa AME, dok samo u 21,7% uzoraka pšenice nije detektovan ni jedan od ispitivanih *Alternaria* toksina kao što se vidi na Slici 5.1.



Slika 5.1 - Učestalost pojave analiziranih *Alternaria* toksina u Vojvodini u trogodišnjem periodu (2011-2013)

Prikazani rezultati ukazuju na evidentnu pojavu značajnog broja partija pšenice kontaminirane sa TeA, praćenu sporadičnom pojavom partija kontaminiranih sa AOH i AME na području Vojvodine, što dodatno potvrđuje praktični značaj istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije.

5.1.2. Zavisnost pojave *Alternaria* toksina u pšenici od proizvodne godine

Rezultati za pojavu *Alternaria* toksina u uzorcima pšenice po posmatranim proizvodnim godinama (2011-2013) prikazani su u **Tabeli 5.1**. Uzorci sa koncentracijama toksina u vrednostima od LOD posmatrani su kao pozitivni i njihove vrednosti su obuhvaćene statističkom analizom. Ako je sadržaj mikotoksina bio niži od LOD kod bilo kojeg od uzoraka, i za nega je navedeno da je "<LOD". Nadalje, u **Tabeli 5.1** prikazani su podaci za broj pozitivnih uzoraka pšenice, vrednosti aritmetičke sredine i medijane, kao i za minimalne i maksimalne koncentracije AOH, AME i TeA. Za poređenja sa podacima iz literature, korišćene su samo koncentracije *Alternaria* toksina u neobrađenim žitima ili u komercijalnim uzorcima žita.

Tabela 5.1 - Pojava alternariola (AOH), alternariol monometil etra (AME) i tenuazonske kiseline (TeA) po godinama u uzorcima ozime pšenice iz Vojvodine proizvedenim 2011, 2012. i 2013. godine

Godina	<i>Alternaria</i> toksini	Pozitivno od ukupno	Aritmetička sredina \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Medijana ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Granične vrednosti ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
2011.	AOH	1/40	1,3	1,3	1,3
	AME	0/40	-	-	-
	TeA	34/40	22,1 ^a \pm 16,8	17,5	LOD -62,2
2012.	AOH	3/39	25,2 \pm 14,6	22,5	12,2 - 41,0
	AME	2/39	62,1 \pm 11,4	62,1	54,1 - 70,2
	TeA	22/39	39,8 ^a \pm 31,7	29,5	LOD - 115
2013.	AOH	7/13	15,7 \pm 18,8	6,9	LOD - 48,9
	AME	4/13	27,5 \pm 26,0	23,6	0,49 - 62,3
	TeA	7/13	535,7 ^b \pm 943,0	19,2	7,5 - 2676
Sve godine	AOH	11/92	18,6 \pm 17,3	12,2	LOD - 48,9
	AME	6/92	39,0 \pm 27,4	41,5	0,49 - 70,2
	TeA	63/92	92,4 \pm 354,8	20,7	LOD - 2676

Različita slova (a, b) za svaki *Alternaria* toksin ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti (post-hoc Tukey-ev test za nejednaki broj uzoraka).

Aritmetička sredina \pm SD: prosečna vrednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm standardno odstupanje ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

U svim posmatranim proizvodnim godinama najčešće nalaženi *Alternaria* toksin bio je TeA. Maksimalni sadržaj TeA bio je 2676 µg/kg (2013). Maksimalne vrednosti za sadržaje AOH bile 48,9 µg/kg (2013), a za AME 70,2 µg/kg (2012). Nasuprot sumarno prikazanim rezultatima iz EFSA izveštaja (2011), ali u saglasnosti za rezultatima koje su objavili Müller i Korn (2013), naši rezultati su pokazali da se od *Alternaria* toksina TeA najčešće javlja u severnim delovima Srbije, ali uz znatna variranja po godinama. Naime udeo pozitivnih uzoraka 2011. godine bio je 85,0%, 2012. godine 56,4%, a 2013. godine 53,8%. Mada je udeo kontaminiranih uzoraka 2011. godine bio najveći, prosečni sadržaj TeA te godine je bio najmanji (22,1 µg/kg), dok je 2013. godine bio najveći (535,7 µg/kg), uz najmanju učestalost pozitivnih uzoraka. Može se videti da je prosečna koncentracija TeA 2013. godine bila signifikantno različita u odnosu na koncentracije u godinama 2011. i 2012. Mada je izmerena maksimalna koncentracija TeA u 2013. godini bila prilično visoka, prosečna vrednost svih pozitivnih uzoraka nije bila veća od 92,4 µg/kg. Prema izveštaju EFSA (2011), maksimalna koncentracija TeA u žitima bila je 651 µg/kg, a prosečna koncentracija iznosila je 49 µg/kg. Prema dobijenim rezultatima i maksimalna koncentracija i prosečna koncentracija bile su iznad ovih vrednosti (**Tabela 5.1**). Slične podatke izneli su i Müller i Korn (2013), koji su saopštili da je maksimalna koncentracija TeA u uzorcima pšenice iz Nemačke u periodu 2001 – 2010. bila 4224 µg/kg, što je skoro jednako sa maksimalnom vrednošću za TeA utvrđenom u ovsu za ishranu životinja (4310 µg/kg) (EFSA, 2011). Takođe, u pilot studiji fungálnih metabolita u uzorcima žita iz Norveške u proizvodnoj godini koja je pogodovala za infekcije gljivama Uhlig i sar. (2013) su utvrdili da je medijana za koncentracije TeA u uzorcima ječma, ovsu i pšenice bila ispod 100 µg/kg, dok je udeo pozitivnih uzoraka kod pšenice bio manji (21%) nego u našim istraživanjima (68,5%).

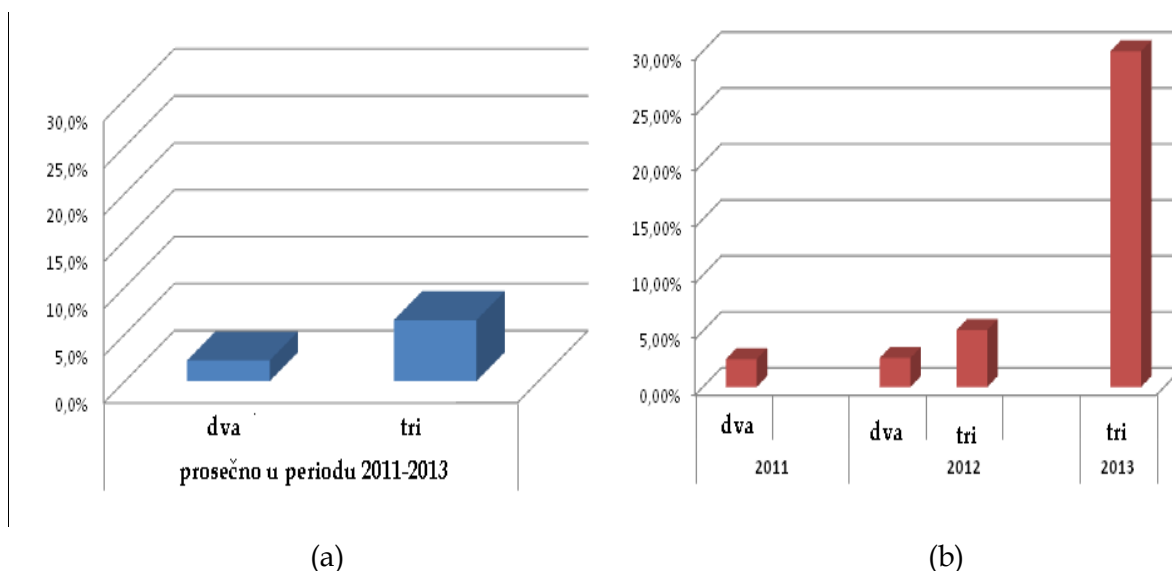
Kao što je već istaknuto, učestalost prirodne kontaminacije pšenice sa AOH i AME je u Vojvodini tokom posmatranih godina istraživanja bila skoro zanemarljiva. Samo 11,9% (11/92) uzoraka pšenice bilo je kontaminirano sa AOH, a 6,5% (6/92) sa AME. Međutim, ako se posmatraju nalazi tokom različitih godina dobija se drugačija slika. Za AOH, 2013. godine 53,8% od svih uzoraka bilo je pozitivno, 2012 – 7,7%, a 2011 – samo 2,5%. Što se tiče AME, 2013. godini 30,8% uzoraka, 2012. godini – 5,1% uzoraka bilo je pozitivno, dok u uzorcima iz 2011. godine je prisustvo AME konstatovano samo u jednom uzorku pšenice, uz sadržaj ispod vrednosti LOQ. Tokom čitavog perioda ispitivanja, prosečna vrednost za pozitivne uzorke nije prevazilazila 18,6 µg/kg za AOH, odnosno 39,0 µg/kg za AME. Slične rezultate dobili su Müller i Korn (2013) u 10-godišnjim istraživanjima pojave *Alternaria* toksina u pšenici iz severoistočnih delova Nemačke. Poslednjih godina ima malo više podataka u literaturi o pojavama AOH i/ili AME u proizvodima od žita (Siegel i sar. 2010a; Asam i sar. 2011; EFSA 2011, Müller i Korn 2013; Uhlig i sar. 2013). Uhlig i sar. (2013) su saopštili da su prosečne vrednosti kod pozitivnih uzoraka pšenice bile za AOH veće (116 µg/kg) nego u našim istraživanjima. Međutim, za AME su dobijene niže prosečne vrednosti (0,8 µg/kg). Nasuprot rezultatima iz naših istraživanja, procenat kontaminiranih uzoraka pšenice sa oba ova dibenzopirona (AOH i AME) bio je 100%, dok je kod uzoraka ječma i ovsu varirao između 80% i 100%.

5.1.3. Zavisnost pojave *Alternaria* toksina u pšenici od proizvodnog regiona

Distribucija kontaminiranih uzoraka po posmatranim oblastima u pokrajini Vojvodini, kao i koncentracije *Alternaria* toksina (AOH, AME i TeA) su prikazane u **Tabelama 5.2, 5.3 i 5.4**. Sadržaj AOH je bio daleko najveći u uzorcima iz Severne Bačke 2012. i 2013. godine. Kod najvećeg broja uzoraka iz drugih oblasti AOH nije ni detektovan (najizraženiji izuzetak bio je uzorak iz Južnog Banata iz 2013. godine). U većini uzoraka AME takođe nije ni detektovan, uz izuzetak uzoraka iz Severne Bačke iz 2012. i 2013. godine. Nasuprot tome, TeA je bila prisutna skoro univerzalno, mada su njene koncentracije od godine do godine u pojedinim regionima varirale, daleko najviši rezultati bili su kod uzoraka iz Severne Bačke u 2013. godini (i manje izrazito, u 2012. godini).

5.1.4. Učestalost istovremene pojave više *Alternaria* toksina u pšenici

Istovremena pojava tri *Alternaria* toksina u uzorcima pšenice detektovana je u 6 uzoraka, a kombinacija dva toksina utvrđena je u dva uzorka pšenice. U 2011. godini jedan od ukupno 40 uzoraka bio je kontaminiran sa dva *Alternaria* toksina (2,5%); 2012. godine bila su kontaminirana dva od ukupno 39 uzoraka sa sva tri *Alternaria* toksina (5,1%), a jedan uzorak sa dva *Alternaria* toksina (2,6%), dok su 2013. godine četiri od ukupno 13 uzoraka bila kontaminirana sa sva tri *Alternaria* toksina (30,8%) (Slika 5.2).



Slika 5.2 - Istovremena pojava dva i tri *Alternaria* toksina (a) prosečno u periodu 2011 - 2013. i (b) tokom 2011, 2012. i 2013. godine zasebno

Tabela 5.2 - Pojava alternariola (AOH) u uzorcima ozime pšenice po oblastima pokrajine Vojvodine 2011, 2012. i 2013. godine i zbirno

Godina	2011.			2012.			2013.			Sve godine		
	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)
Severna Bačka	1/8	1,3	1,3	3/11	25,2±14,6	12,2-41,0	3/3	33,0±16,0	16,9-48,9	7/22	25,2±16,8	1,3-48,9
Južna Bačka	0/6	–	–	0/6	–	–	0/0	–	–	0/12	–	–
Zapadna Bačka	0/7	–	–	0/6	–	–	1/3	0,82	0,82	1/16	0,82	0,82
Severni Banat	0/8	–	–	0/5	–	–	0/0	–	–	0/13	–	–
Južni Banat	0/5	–	–	0/5	–	–	1/4	6,9	6,9	1/14	6,9	6,9
Srem	0/6	–	–	0/6	–	–	2/3	1,8±0,15	1,7-1,9	2/15	1,8±0,15	1,7-1,9

*- nije detektovan,

Prosek ±SD: prosečna koncentracija (µg/kg) ± standardno odstupanje (µg/kg).

Tabela 5.3 - Pojava alternariol monometil etra (AME) u uzorcima ozime pšenice po oblastima pokrajine Vojvodine 2011, 2012. i 2013. godine i zbirno

Godina	2011.			2012.			2013.			Sve godine		
	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontami- nirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)
Severna Bačka	0/8	-*	-	2/11	62,1±11,4	54,1-70,2	3/3	36,5±22,9	18,3-62,3	5/22	46,8±22,2	18,3-70,2
Južna Bačka	0/6	-	-	0/6	-	-	0/0	-	-	0/12	-	-
Zapadna Bačka	0/7	-	-	0/6	-	-	1/3	0,49	0,49	1/16	0,49	0,49
Severni Banat	0/8	-	-	0/5	-	-	0/0	-	-	0/13	-	-
Južni Banat	0/5	-	-	0/5	-	-	0/4	-	-	0/14	-	-
Srem	0/6	-	-	0/6	-	-	0/3	-	-	0/15	-	-

*- nije detektovan,

Prosek ±SD: prosečna koncentracija (µg/kg) ± standardno odstupanje (µg/kg).

Tabela 5.4 - Pojava tenuazonske kiseline (TeA) u uzorcima ozime pšenice po oblastima pokrajine Vojvodine 2011, 2012. i 2013. godine i zbirno

Godina	2011.			2012.			2013.			Sve godine		
Region	Kontaminirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontaminirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontaminirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)	Kontaminirano/ ukupno	Prosek±SD (µg/kg)	Opseg (µg/kg)
Severna Bačka	5/8	12,4 ^a ±7,9	5,6-25,0	9/11	55,8 ^a ±42,5	17,4-115	3/3	1407 ^b ±1135	487-2676	17/22	279,8 ^a ±671,9	5,6-2676
Južna Bačka	6/6	26,9 ^a ±20,9	4,6-54,9	1/6	8,2 ^a	8,2	0/0	–	–	7/12	24,3 ^a ±20,4	4,6-54,9
Zapadna Bačka	7/7	13,5 ^a ±11,9	2,5-37,5	3/6	24,8 ^a ±14,3	8,5-34,7	3/3	12,4 ^a ±7,1	7,5-20,5	13/16	15,9 ^a ±11,8	2,5-37,5
Severni Banat	5/8	12,2 ^a ±7,3	4,6-22,6	2/5	11,4 ^a ±12,6	2,5-20,3	0/0	–	–	7/13	12,2 ^a ±7,3	4,6-22,6
Južni Banat	5/5	33,1 ^a ±12,5	22,8-52,8	2/5	77,4 ^a ±16,9	57,9-87,8	1/4	7,9 ^a	7,9	9/14	45,1 ^a ±28,3	7,9-87,8
Srem	6/6	37,5 ^a ±20,0	15,9-62,2	4/6	16,5 ^a ±7,7	11,2-27,9	0/3	–	–	10/15	27,3 ^a ±18,1	11,2-62,2

*- nije detektovan,

Različita slova (a, b) za TeA ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti (post-hoc Tukey-ev test za nejednaki broj uzoraka),

Prosek ±SD: prosečna koncentracija (µg/kg) ± standardno odstupanje (µg/kg).

Važno je istaći da su skoro svi uzorci sa po nekoliko *Alternaria* toksina bili iz Severne Bačke (uz izuzetak jednog uzorka pšenice iz Zapadne Bačke). Istovremena pojava AOH i AME nije zapažena, dok je u oba slučaja istovremene pojave dva *Alternaria* toksina zapaženo prisustvo TeA i AOH. Ovo je u saglasnosti sa nalazima koje su objavili Müller i Korn (2013). Istovremena pojava TeA i AOH, kao i AOH i AME, je evidentna na osnovu mnogih literaturnih podataka iz Evrope i iz drugih delova sveta (sumarno prikazano u izveštaju EFSA iz 2011. godine), ali, usled malog broja ispitanih uzoraka iz svih grupa namirnica nije bilo moguće izvesti zaključke o odnosima njihovih koncentracija.

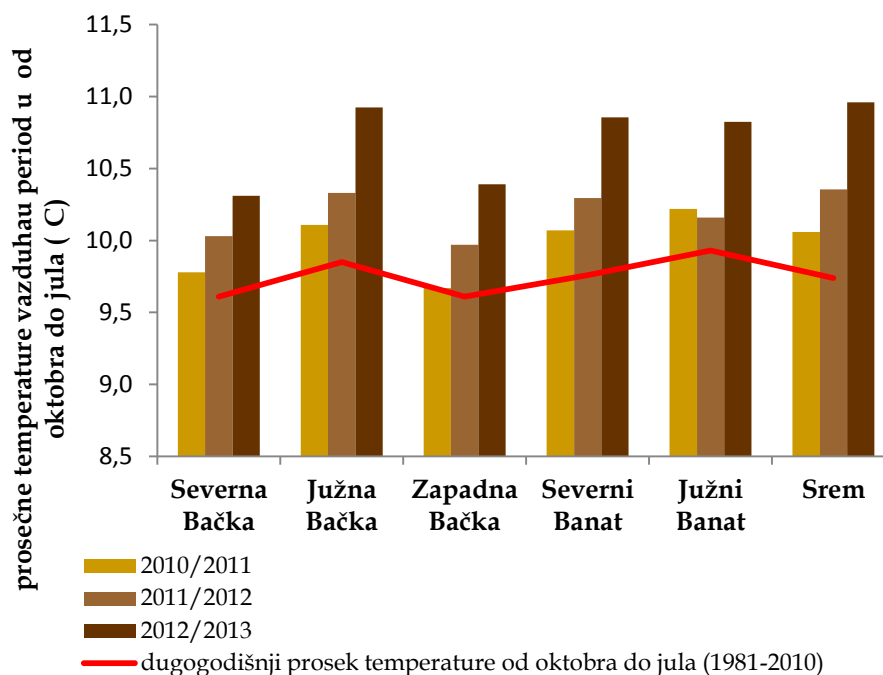
Sumarno, dobijeni rezultati su pokazali da je od 92 analizirana uzorka pšenice, 72 (78,3%) bilo kontaminirano sa nekim od ispitivanih *Alternaria* toksina.

5.1.5. Zavisnost pojave *Alternaria* toksina u pšenici od klimatskih faktora

Gljive *Alternaria* spp. su izolovane širom sveta iz uzoraka prikupljenih pod veoma različitim uslovima okoline. Fleksibilnost roda *Alternaria* da se prilagođava različitim klimatskim uslovima odgovorna je za prividne kontradikcije povezane sa pojavom gljiva iz roda *Alternaria*, koje se mogu razviti u uslovima visokih ili niskih temperatura, različitim nivoima vlage i u višestranim kombinacijama pojedinih faktora okoline. Tolerantnost ovoga roda gljiva demonstrirao je Rotem (1994), koji je prikazao da one mogu dugotrajno da prežive pod stresnim uslovima visokih i niskih temperatura i pod suvim uslovima. Sve to je povećalo zanimanje za vrste roda *Alternaria*.

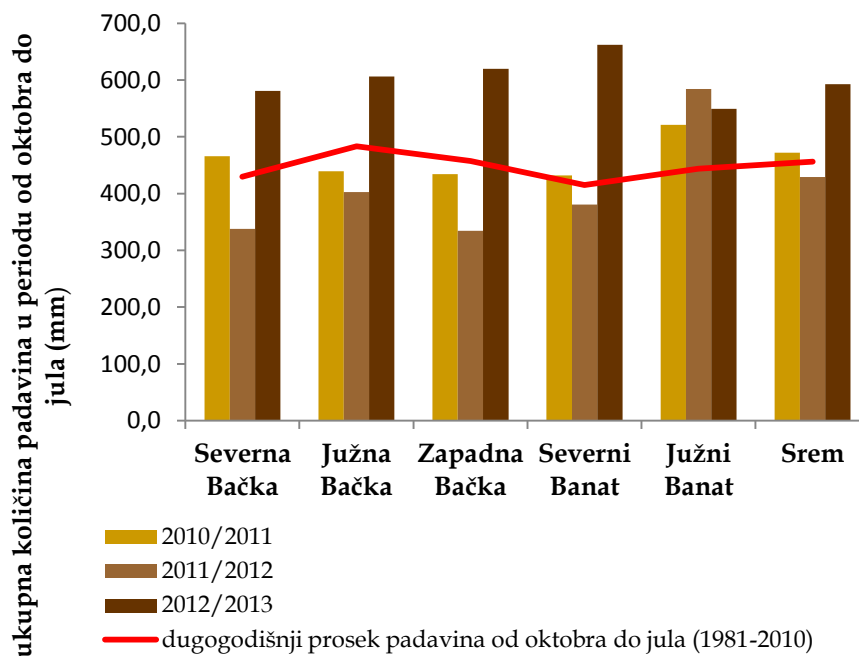
Na osnovu Slika 5.3 i 5.4 može se izvesti zaključak da se sve tri posmatrane proizvodne godine odlikuju višim prosečnim temperaturama u odnosu na višegodišnji prosek, ali da se one ne razlikuju međusobno, a ni među lokalitetima. U pogledu količina padavina se 2012/2013. proizvodna godina odlikuje većom sumom padavina i u odnosu na višegodišnji prosek, kao i u odnosu na druge dve posmatrane proizvodne godine. Istraživanja brojnih autora potvrđuju da se *Alternaria* spp. masovno javljaju kada za vreme cvetanja i formiranja zrna preovlađuje vlažno i toplo vreme, sa čestim kišama i visokom relativnom vlažnošću vazduha (iznad 75%), tako da smo posebno sagledavali klimatske uslove u periodu cvetanja i formiranja zrna do žetve pšenice (od maja do jula).

Veliki udeo ispitivanih uzoraka pšenice kontaminiranih sa TeA iz svih oblasti i u svim godinama istraživanja (Tabela 5.1 i 5.4) može se objasniti činjenicom da je prosečna temperatura u periodu od maja do jula bila optimalna za sintezu TeA. Sa Slike 5.5 se može uočiti da su prosečne temperature vazduha u godinama 2011, 2012. i 2013. bile 19,8-21,5 °C, 21,1-23,2 °C, i 19,2-20,8 °C, pri čemu su prosečne temperature vazduha u svih 6 oblasti bile iznad ili bliske normalnim temperaturama koje su zabeležene kao dugogodišnji proseci.



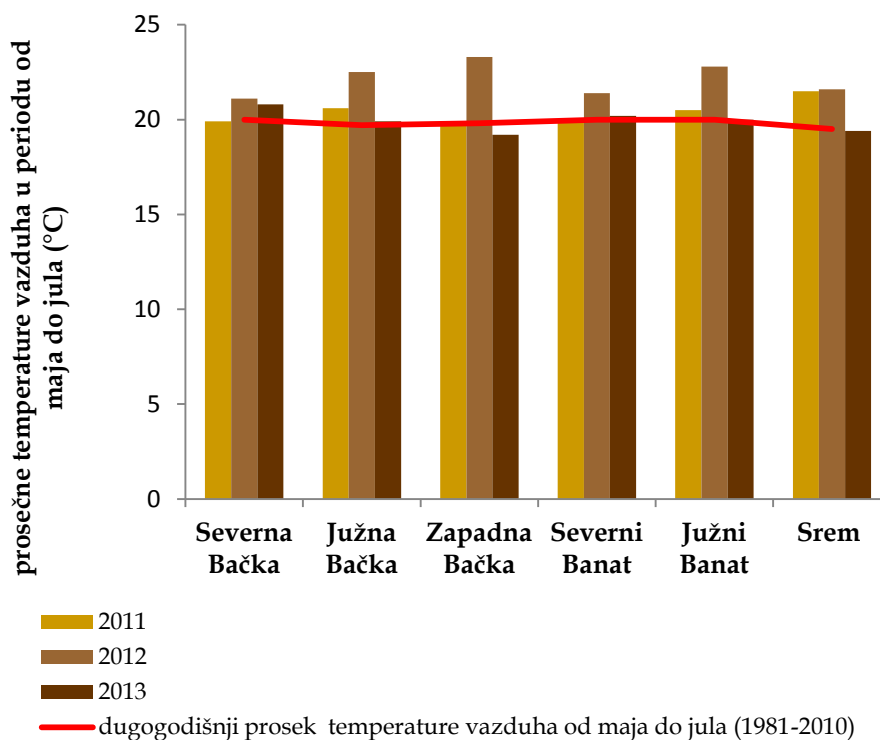
Slika 5.3 - Prosečne temperature vazduha u periodu od oktobra do jula 2011, 2012. i 2013. godine u poređenju sa vrednostima dugogodišnjih proseka (1981 - 2010)

(Podaci su interpolisani na osnovu merenja u 7 automatskih hidroloških stanica iz 6 najvažnijih oblasti uzgoja pšenice u Vojvodini, čijim radom rukovodi Republički hidrometeorološki zavod Srbije.)



Slika 5.4 - Ukupna količina padavina u periodu od oktobra do jula 2011, 2012. i 2013. godine u poređenju sa vrednostima dugogodišnjih proseka (1981 - 2010)

(Podaci su interpolisani na osnovu merenja u 7 automatskih hidroloških stanica iz 6 najvažnijih oblasti uzgoja pšenice u Vojvodini, čijim radom rukovodi Republički hidrometeorološki zavod Srbije.)

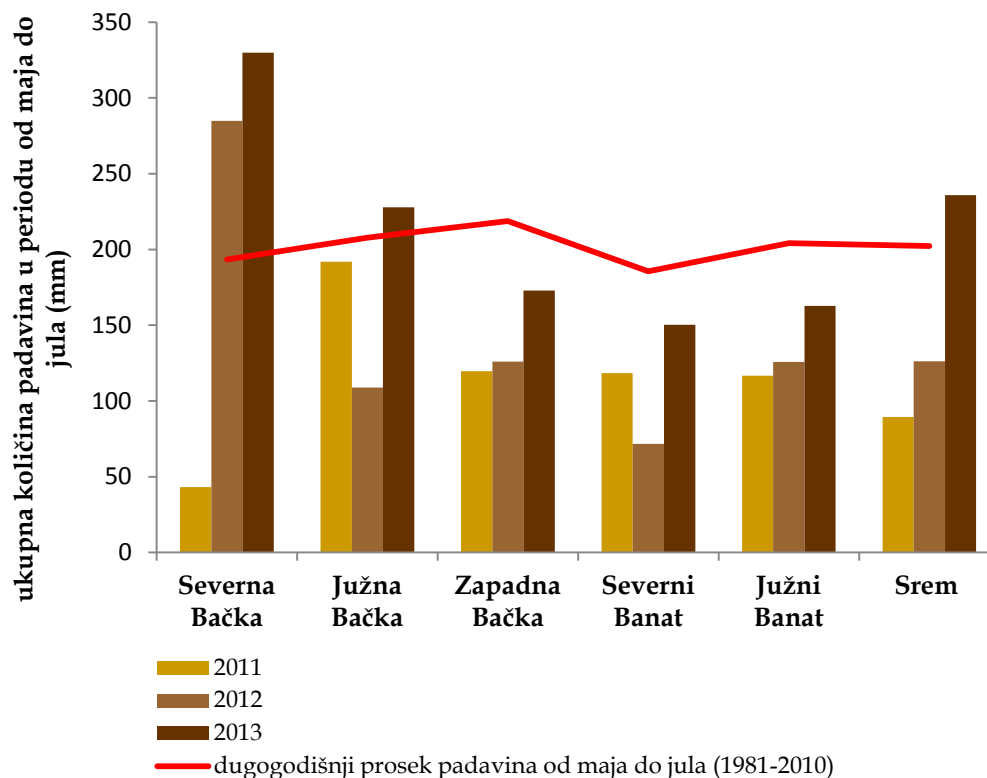


Slika 5.5 - Prosečne temperature vazduha u periodu od maja do jula 2011, 2012. i 2013. godine u poređenju sa vrednostima dugogodišnjih proseka (1981 – 2010)

(Podaci su interpolisani na osnovu merenja u 7 automatskih hidroloških stanica iz 6 najvažnijih oblasti uzgoja pšenice u Vojvodini, čijim radom rukovodi Republički hidrometeorološki zavod Srbije.)

Drugo značajno zapažanje jeste da se u 2011. godini sve oblasti mogu okarakterisati nedostatkom kišnih padavina (Slika 5.6). U 2012. godini u Severnoj Bačkoj i Južnom Banatu su, u odnosu na višegodišnji prosek, količine padavina bile povećane. Nadalje, u periodu od maja do jula 2013. godine u Severnoj Bačkoj i Sremu su količine padavina bile veće nego u ostalim oblastima, u kojima su količine padavina bile nedovoljne. Ukupne količine padavina u svim oblastima bile su najveće u 2013. godini, dok su prosečne temperature vazduha bile najviše u 2012. godini. Godina sa najvećom količinom padavina u Severnoj Bačkoj (ukupne padavine do 170% u odnosu na višegodišnji prosek) bila je 2013. i ovi uslovi mogli su dovesti do pojačanog razvoja mikrogljiva i biosinzete mikoroksina; u toj godini su zabeležene najviše vrednosti za TeA i AOH (2676 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 48,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Takođe, i pojava AME bila je učestalija i sa povećanim koncentracijama u ovoj oblasti, u odnosu na druge oblasti. U Severnoj Bačkoj je u 2012. godini nađena najveća koncentracija AME, dok u ostalim oblastima AME nije ni detektovan. Jedan od mogućih uzroka predstavlja razlika u mikro-klimatskim uslovima koji su bili preovlađujući u pojedinim oblastima. Naime, jedina oblast sa povećanom količinom padavina (147,3% u odnosu na višegodišnji prosek) bila je Severna Bačka, dok je u drugim oblastima nedostatak padavina bio preko 50% u poređenju sa podacima za višegodišnje proseke. Nadalje, godina 2012. je bila okarakterisana višim temperaturama vazduha u

poređenju sa višegodišnjim prosekom (1981 - 2010) za period od maja do jula. Viša temperatura vazduha i višak padavina u 2012. godini u Severnoj Bačkoj verovatno su pogodovale biosintezi AME u najvećim koncentracijama.



Slika 5.6 - Ukupna količina padavina u periodu od maja do jula 2011, 2012. i 2013. godine u poređenju sa vrednostima dugogodišnjih proseka (1981 - 2010)

(Podaci su interpolisani na osnovu merenja u 7 automatskih hidroloških stanica iz 6 najvažnijih oblasti uzgoja pšenice u Vojvodini, čijim radom rukovodi Republički hidrometeorološki zavod Srbije.)

5.1.6. Odnos prisustva *Alternaria* toksina i udela tamnokličnih zrna u pšenici

S obzirom na poznatu činjenicu da se infekcija pšenice sa *Alternaria* spp. manifestuje promenom boje pšeničnog zrna u predelu oko klice (tamnokličnost) analiziran je odnos prisustva i sadržaja *Alternaria* toksina i pokazatelja kvaliteta pšenice čija je upotreba uobičajena u praksi, prisustva tamnokličnih zrna.

Prvo važno zapažanje je da između udela tamnokličnih zrna u zrnoj masi pšenice i koncentracije ispitivanih *Alternaria* toksina ne postoji statistički značajna korelacija već samo veoma slaba negativna korelacija kao što se vidi u **Tabeli 5.5**.

Tabela 5.5 – Korelacija koncentracije *Alternaria* toksina i udela tamnokličnih zrna

	Koncentracija <i>Alternaria</i> toksina (µg/kg)		
	AOH	AME	TeA
Tamnoklična zrna (%)	-0,156782	-0,102712	-0,079871

Tragajući za dodatnim elementima povezanosti udela tamnokličnih zrna u masi pšenice i prisustva *Alternaria* toksina izvršena je analiza udela uzoraka u kojima je utvrđeno prisustvo *Alternaria* toksina po rasponima udela tamnokličnih zrna diferenciranim na uzorke bez tamnokličnih zrna, uzorke sa ispod i uzorke iznad 1% tamnokličnih zrna (**Tabela 5.6**). Dobijeni rezultati ukazuju da se ni po ovom aspektu ne može definisati povezanost prisustva ni jednog od ispitivanih *Alternaria* toksina sa udelom tamnokličnih zrna u uzorku pšenice, s obzirom na to da je čak i kod uzoraka u kojima vizuelno nisu uočena tamnoklična zrna registrovan značajan broj uzoraka u kojima su prisutni *Alternaria* toksini.

Tabela 5.6 - Procentualni udeo uzoraka u kojima je utvrđeno prisustvo *Alternaria* toksina po rasponima udela tamnokličnih zrna u uzorcima pšenice

Uzorci pšenice	Udeo uzoraka sa <i>Alternaria</i> toksinima (%)		
	AOH	AME	TeA
Bez tamnokličnih	14	14	71
Do 1% tamnokličnih	8	19	60
Preko 1 % tamnokličnih	2	2	83

Povezanost između udela tamnokličnih zrna u uzorku nije uočena ni u odnosu na prosečan sadržaj *Alternaria* toksina u pšenici (**Tabela 5.7**), štaviše u slučaju AME i AOH najviši prosečan sadržaj utvrđen je u uzorcima u kojima nije bilo vizuelno uočljivih

tamnokličnih zrna, dok je najviši prosečan sadržaj TeA bio u uzorcima sa ispod 1% tamnokličnih zrna.

Tabela 5.7 - Prosečan sadržaj *Alternaria* toksina po rasponima udela tamnokličnih zrna u uzorcima pšenice

Uzorci pšenice	Prosečan sadržaj <i>Alternaria</i> toksina (µg/kg)		
	AOH	AME	TeA
Bez tamnokličnih	7,72	5,86	35,88
Do 1% tamnokličnih	2,29	2,57	98,53
Preko 1% tamnokličnih	1,90	0,61	24,68

5.1.7. Uticaj stimulacije i inhibicije zaraženosti sa *Alternaria* spp. na sadržaj *Alternaria* toksina u pšenici

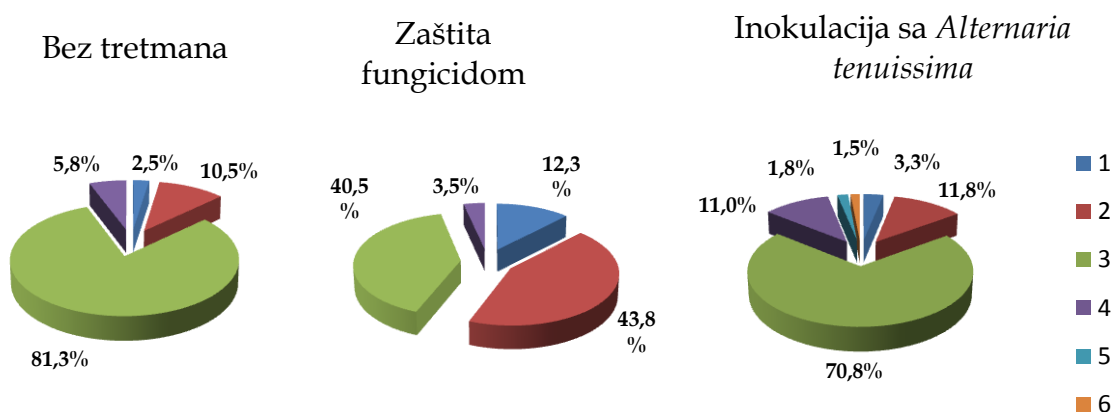
Istraživanja uticaja faktora koji rezultiraju stimulacijom (intenzivna kontaminacija) ili inhibicijom (zaštita fungicidima) zaraženosti pšenice sa *Alternaria* spp. na sadržaj *Alternaria* toksina bazirana su na eksperimentu koji je izveden na uzorcima pšenice tretirane fungicidom i na uzorcima pšenice inokulisane sa *Alternaria tenuissima*, dok je netretirana pšenica korišćena kao kontrola.

Rezultati identifikacije poljskih gljiva u svim ispitivanim uzorcima pšenice (**Tabela 5.8**) ukazuju na to da je od toksigenih gljiva rod *Rhizopus* dominantan, a zatim slede gljive iz roda *Alternaria*. Identifikacijom vrste gljiva iz roda *Alternaria* u svim ispitivanim uzorcima pšenice determinisana je vrsta *Alternaria tenuissima*.

Stepen infekcije (%) sa gljivama iz roda *Alternaria* bio je najveći u slučaju inokulisane pšenice saglasno očekivanjima. Istovremeno to je dovelo do diferencijacije ovog uzorka pšenice po svojoj tamnijoj boji kako pri vizuelnoj oceni boje klasa pomoću skale (Slika 5.7), tako i pri instrumentalnom merenju boje klasa (**Tabela 5.9**) shodno očekivanjima zbog činjenice da gljive iz roda *Alternaria* produkuju tamno obojeni pigment – melanin.

Tabela 5.8 - Zastupljenost pojedinih rodova gljiva u uzorcima pšenice

Rod gljiva (%)	Uzorak		
	Bez tretmana	Zaštita fungicidom (Zamir)	Inokulacija sa <i>Alternaria tenuissima</i>
<i>Fusarium</i>	2	2	4
<i>Alternaria</i>	31,5	29	44,5
<i>Cladosporium</i>	1	-	-
<i>Rhizopus</i>	65,5	69	50
<i>Aspergillus</i>	-	-	-
<i>Penicillium</i>	-	-	1,5



Slika 5.7 - Udeo klasova po vizuelno ocenjenim klasama boje u zavisnosti od tretmana

Rezultati merenja boje zrna pšenice (Tabela 5.10) su se malo razlikovali: zrna inokulisane pšenice su se značajno razlikovala od drugih po parametrima L^* , a^* , b^* i C^* , dok su svi uzorci pripadali istoj homogenoj grupi po vrednostima ugla boje i dominantne talasne dužine.

Tabela 5.9 - Parametri boje različito tretiranih pšeničnih klasova

Uzorak	Bez tretmana	Zaštita fungicidom	Inokulacija sa <i>Alternaria tenuissima</i>
L*	60,91±3,05 ^b	63,16±3,46 ^a	60,09±3,87 ^c
a*	2,89±0,70 ^a	2,49±0,69 ^c	2,81±0,71 ^b
b*	24,07±3,89 ^b	25,41±3,32 ^a	24,11±4,01 ^b
C*	24,25±3,89 ^b	25,54±3,31 ^a	24,28±4,00 ^b
h (°)	83,03±1,81 ^c	84,35±1,62 ^a	83,19±2,05 ^b
DWL (nm)	578,33±0,52 ^a	577,94±0,49 ^c	578,29±0,59 ^b
vizuelna skala	2,90±0,50 ^b	2,35±0,74 ^c	3,01±0,75 ^a

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n≈2400).

^{a,b,c} Vrednosti sa različitim superskriptu u istoj koloni su statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Tabela 5.10 - Parametri boje različito tretiranih pšeničnih zrna

Uzorak	Bez tretmana	Zaštita fungicidom	Inokulacija sa <i>Alternaria tenuissima</i>
L*	53,05±1,63 ^a	53,34±1,88 ^a	52,20±1,53 ^b
a*	8,73±0,91 ^a	8,87±0,88 ^a	8,30±0,96 ^b
b*	23,81±1,60 ^a	24,09±1,84 ^a	22,25±1,84 ^b
C*	25,36±1,78 ^a	25,67±2,00 ^a	23,75±2,03 ^b
h (°)	69,91±1,05 ^a	69,81±0,97 ^a	69,58±1,02 ^a
DWL (nm)	582,64±0,41 ^a	582,68±0,37 ^a	582,67±0,40 ^a

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=40).

^{a,b,c} Vrednosti sa različitim superskriptu u istoj koloni su statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Korelacioni koeficijenti između vizuelne skale i instrumentalnih merenja ukazuju da su L* vrednosti u najvećoj negativnoj korelaciji ($r = -0,97$, $p \leq 0,001$) sa vizuelnom skalom. Ostali parametri boje (b*, C*, ugao boje i dominantna talasna dužina) su takođe u visokoj korelaciji ($p \leq 0,001$) sa vizuelnom skalom (-0,72; -0,72; -0,75 i +0,74, respektivno). Parametar boje a* je takođe značajno pozitivno koreliran sa vizuelnom skalom na nivou značajnosti od 5%. Šest klasova pšenice korišćenih za uspostavljanje vizuelne skale su se međusobno značajno razlikovali samo po vrednostima svetloće (L*).

Razmatrajući sve gorerečeno, može se zaključiti da je infekcija prodršla u zrno u većem obimu kod inokulisanih uzoraka pšenice, dok je u netretiranim bila manje izražena.

Zaštićeni uzorak pšenice je generalno okarakterisan većom svetloćom i izraženijim žutim tonom. Rezultati dobijeni instrumentalnim merenjem su u skladu sa ocenama dobijenim vizuelnom skalom kod tretiranih uzoraka pšenice (Janić Hajnal i sar., 2014b).

U ispitivanim uzorcima laboratorijski ovršene pšenice (Tabela 5.11) AOH nije detektovan ni u jednom uzorku, dok je AME kvantifikovan samo u uzorku inokulisane pšenice. Za razliku od ova dva *Alternaria* toksina, TeA je kvantifikovana u uzorcima zaštićene, kontrolne i inokulisane pšenice. Kao što se vidi iz Tabele 5.11 koncentracija TeA u ispitivanim uzorcima pšenice statistički se značajno razlikuje po tretmanima, pri čemu koncentracija TeA je najveća u uzorku inokulisane pšenice, a najmanja u uzorku pšenice zaštićene fungicidom.

Tabela 5.11 – Sadržaj AOH, AME i TeA u uzorcima zaštićene, kontrolne i inokulisane pšenice

Uzorak	AOH ($\mu\text{g/kg}$)	AME ($\mu\text{g/kg}$)	TeA ($\mu\text{g/kg}$)
Bez tretmana	<LOD	<LOD	59,5 ^b
Zaštita fungicidom	<LOD	<LOD	30,7 ^a
Inokulacija sa <i>Alternaria tenuissima</i>	<LOD	0,46	96,6 ^c

Različita slova (a, b) za jedan te isti mikotoksin ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti prema testu za višestruke razlike po Dunkanu. LOD - granica detekcije.

5.2. Mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria* toksina primenom odabranih postupaka prerade pšenice

U nadalje prikazanim istraživanjima obrađen je uticaj tehnoloških procesa uobičajenih i primenjivih u posležetvenom tretmanu i preradi pšenice od trenutka žetve pa do brašna kao finalnog proizvoda na redukciju sadržaja *Alternaria* toksina u odnosu na polaznu sirovinu podvrgnutu pojedinim tehnološkim postupcima.

Uzorci pšenice podvrgnuti odabranim tehnološkim postupcima predstavljaju prigodne uzorke iz lepeze uzorka na kojima je izvršena analiza uticaja stimulacije i inhibicije kontaminacije sa *Alternaria* spp. na pojavu *Alternaria* toksina u pšenici prikazana u prethodnom poglavlju u kom su dati i detaljni rezultati analize korišćenih uzoraka.

Pored ovih uzoraka deo istraživanja obavljen je na komercijalnoj pšenici raspoloživoj u dovoljnim količinama odabranoj tako da su u uzorku bili zastupljeni svi posmatrani *Alternaria* toksini u koncentracijama prikazanim u Tabeli 5.12. Pored činjenice da su u ovoj pšenici zastupljeni svi posmatrani mikotoksini ista je okarakterisana koncentracijama

posmatranih toksina koji su na bazi analize učestalosti i nivoa koncentracija *Alternaria* toksina u pšenici iz Vojvodine, karakteristične za ovo žitorodno područje.

Tabela 5.12 – Koncentracija *Alternaria* toksina u korišćenim uzorcima komercijalne pšenice

Uzorak	AOH ($\mu\text{g/kg}$)s.m.	AME ($\mu\text{g/kg}$)s.m.	TeA ($\mu\text{g/kg}$)s.m.
Komercijalna pšenica 1	1,67	0,61	78,07
Komercijalna pšenica 2	4,12	3,62	133,10

5.2.1. Redukcija sadržaja *Alternaria* toksina tokom žetve pšenice

U toku žetve, pšenica se podvrgava vršidbi, odnosno, odvajanju zrna pšenice od klasa i pleve, kao prvom tehnološkom postupku u kom dolazi do preraspodele prisutnih kontaminanata između dobijenih frakcija: zrnene mase koja će se dalje skladištiti i prerađivati i pleve koja nema prehrambenu namenu.

Uticaj vršidbe, odnosno odvajanja zrnene mase od klasa pšenice analiziran je na tri uzorka iz ogleada usmerenog na ispitivanje uticaja inhibicije i stimulacije kontaminacije pšenice sa *Alternaria* spp. na prisustvo *Alternaria* toksina: uzorku pšenice bez tretmana, uzorku zaštićenom fungicidom i uzorku inokulisanom sa *Alternaria tenuissima*.

Sadržaj alternariola (AOH), alternariol monometil etra (AME) i tenuazonske kiseline (TeA) je ispitivan u uzorcima ovršene pšenice i u uzorcima pleve preostale nakon vršidbe (**Tabela 5.13**).

U svim ispitivanim uzorcima najdominatniji *Alternaria* toksin, odnosno sa najvećom koncentracijom bila je TeA. U plevi netretirane pšenice i u plevi inokulisane pšenice detektovana su sva tri *Alternaria* toksina, dok u plevi pšenice zaštićene fungicidom AOH nije detektovan. Takođe se iz **Tabele 5.13** može videti da je u uzorcima pšenice bez pleve TeA detektovana u najvećoj koncentraciji u uzorku inokulisane pšenice. Detektovani nivo TeA u svim ispitivanim uzorcima pleve bio je oko tri puta veći kod svih primenjenih tretmana u odnosu na uzorke pšenice bez pleve. Takođe se može uočiti da je koncentracija AOH u plevi inokulisane pšenice bila duplo veća u odnosu na plevu netretirane pšenice, dok AOH u uzorcima pšenice bez pleve nije detektovan ni u jednom slučaju kod primenjenih tretmana. AME je detektovan u uzorcima pleve kod svih primenjenih tretmana. Koncentracija AME bila je oko tri puta veća u plevi inokulisane pšenice u odnosu na inokulisanu pšenicu bez pleve, dok u ostala dva slučaja pšeničnog zrna bez pleve AME nije detektovan. Ovi rezultati ukazuju na izvesnu zaštitnu funkciju pleve od prodiranja ispitivanih *Alternaria* toksina u unutrašnji deo endosperma zrna pšenice. Dobijeni rezultati su slični sa nalazima Vučković i sar. (2013), koji su ispitivali zaštitni efekat plevice na pojavu *Alternaria* toksina u slučaju spelte.

Tabela 5.13 - Sadržaj alternariola (AOH), alternariol monometil etra (AME) i tenuazonske kiseline (TeA) u ispitivanim uzorcima pleve i pšeničnog zrna bez pleve za primenjene tretmane

Uzorak		AOH ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AME ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TeA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		s.m.	s.m.	s.m.
Bez tretmana	pleva	10,6	0,99	189
	zrvena masa	-	-	59,5
Zaštita fungicidom	pleva	-	0,54	105
	zrvena masa	-	-	30,7
Inokulacija sa <i>Alternaria tenuissima</i>	pleva	21,1	1,25	227
	zrvena masa	-	0,46	96,6

5.2.2. Mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria* toksina primenom postupaka čišćenja pšenice

Čišćenje obuhvata prolazak zrna žita kroz niz mašina pomoću kojih se iz zrnene mase uklanjaju primese (crne i bele). Tu spadaju rešeta sa različitim veličinama i oblikom otvora, aspirateri, izdvajači kamena, trijeri, četkalice, ribalice i magneti. Separacijom i čišćenjem zrnene mase žita iz zrnene mase uklanja se deo zrna zaraženih gljivama, slomljena zrna, lake primese i prašina. Za čišćenje zrnene mase dostupna je i u upotrebi različita oprema, a samim tim u zavisnosti od stanja i stepena kontaminacije efikasnost čišćenja je različita.

S obzirom na to da je najveći udeo zrna zaraženim poljskim gljivama spada u kategoriju neodvojivih primesa, u poslednje vreme se sprovode ozbiljna istraživanja za praktičnu primenu bliske infracrvene spektroskopije (eng. *near - infrared spectroscopy*, NIR) ili fluorescentne analize u cilju razvrstavanja pšenice na prijemu ili izdvajanja tokom postupka čišćenja zrnene mase.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja u pogledu uticaja sortiranja i čišćenja zrnene mase pšenice i ostalih žita na stepen snižavanja nivoa mikotoksina zapaženo je snižavanje nivoa mikotoksina od nekoliko procenata do preko 80% (Visconti i sar., 2004 ; Delwiche i sar., 2005; Lancova i sar., 2008; Neuhofer i sar., 2008a, 2008b; Scudamore, 2008; Edwards i sar., 2011; Pascale i sar., 2011). Treba naglasiti da se većina ovih istraživanja odnosila na mogućnost smanjenja nivoa *Fusarium* toksina (DON, NIV, ZEA, T-2 i HT-2 toksina), dok podataka o uticaju sortiranja i čišćenja zrnene mase pšenice na smanjenje nivoa sadržaja *Alternaria* toksina prema dostupnoj literaturi za sada nema.

Sadržaj *Alternaria* toksina u uzorcima netretirane pšenice, pšenice zaštićene fungicidom, pšenice inokulisane sa *Alternaria tenuissima* i komercijalne pšenice 1 nakon

čišćenja na laboratorijskom aspirateru u odnosu na sadržaj ispitivanih *Alternaria* toksina u neočišćenoj zrnenoj masi pšenice i izdvojenim nečistoćama prikazani su u **Tabeli 5.14**.

Tabela 5.14 - Uticaj čišćenja zrnene mase pšenice na redukciju nivoa *Alternaria* toksina

Uzorak		AOH ($\mu\text{g}/\text{kg}$) s.m.	AME ($\mu\text{g}/\text{kg}$) s.m.	TeA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) s.m.
Netretirana pšenica	Neočišćena pšenica	<LOD	<LOD	59,5 ^b
	Očišćena pšenica	<LOD	<LOD	36,0 ^a
	Nečistoća	7,98 ^b	1,68 ^b	368 ^c
Pšenica zaštićena fungicidom	Neočišćena pšenica	<LOD	<LOD	30,7 ^b
	Očišćena pšenica	<LOD	<LOD	18,2 ^a
	Nečistoća	5,24 ^b	2,97 ^b	293 ^c
Pšenica inokulsana sa <i>Alternaria tenuissima</i>	Neočišćena pšenica	<LOD	0,46 ^a	96,6 ^b
	Očišćena pšenica	<LOD	<LOD	44,8 ^a
	Nečistoća	9,58 ^b	1,81 ^b	451 ^c
Komerrijalna pšenica 1	Neočišćena pšenica	1,67 ^b	0,61 ^b	78,07 ^b
	Očišćena pšenica	1,26 ^a	0,56 ^a	42,26 ^a
	Nečistoća	5,06 ^c	0,62 ^b	202 ^c

Različita slova (a, b, c) za jedan te isti mikotoksin ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti prema testu za višestruke razlike po Dunkanu. LOD - granica detekcije.

Iz **Tabele 5.14** može se videti isti trend u pogledu preraspodele i koncentrisanja ispitivanih *Alternaria* toksina primenom postupka čišćenja zrnene mase pšenice. Bez obzira na primenjeni tretman, AOH je jedino kvantifikovan u izdvojenim nečistoćama, pri čemu kao što se i pretpostavilo, najveća koncentracija AOH je utvrđena u izdvojenim nečistoćama iz uzorka inokulisane pšenice, a najmanja u nečistoćama iz uzorka pšenice zaštićene fungicidom. Sadržaj AOH u izdvojenim nečistoćama se u zavisnosti od primenjenog tretmana statistički, značajno razlikovao. Ista trendencija uočava se i u slučaju sadržaja AME u izdvojenim nečistoćama nakon čišćenja u odnosu na neočišćenu pšenicu. U slučaju kontrolne i pšenice zaštićene fungicidom, koncentracija AME bila je ispod LOD, dok je u izdvojenoj nečistoći AME kvantifikovan (**Tabela 5.14**). U slučaju inokulisane pšenice AME je kvantifikovan u uzorku neočišćene pšenice i u izdvojenoj nečistoći, dok u uzorku očišćene pšenice nije kvantifikovan. Koncentracija AME u izdvojenoj nečistoći inokulisane pšenice iznosila je 124% u odnosu na inicijalnu koncentraciju u neočišćenoj pšenici. U slučaju komercijalne pšenice koncentracija AME u neočišćenoj pšenici i u izdvojenim nečistoćama se statistički ne razlikuje. Ovo se može objasniti činjenicom da je uzorak komercijalne pšenice

već prošao kako silosko tako i mlinsko čišćenje u industrijskim uslovima. Iz istog razloga u slučaju komercijalne pšenice procentualni udeo sadržaja AME se razlikuje od ostalih slučajeva.

Čišćenjem zrnene mase pšenice u očišćenoj zrnoj masi uzoraka kontrolne, zaštićene fungicidom, inokulisane i komercijalne pšenice došlo je do smanjenja nivoa TeA od 60,5%, 59,3%, 46,4% i 54,2% u odnosu na inicijalnu koncentraciju TeA u uzorcima neočišćene pšenice. U uzorcima izdvojenih nečistoća kontrolne, zaštićene fungicidom, inokulisane i komercijalne pšenice koncentracija TeA je iznosila 619%, 954%, 467% i 259%, odnosno došlo je do povećanja sadržaja za 6,2, 9,5, 4,7 i 2,6 puta u odnosu na inicijalnu koncentraciju TeA u uzorcima neočišćene pšenice.

5.2.3. Mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria* toksina primenom postupaka mlevenja i razvrstavanja mliva

Zadatak mlevenja pšenice je da se zrno usitni i da se razdvoje anatomske delovi zrna. Mlevenjem pšenice dobijaju se brašna i krupice za ljudsku ishranu, stočna brašna i mekinje, koje se koriste kao hrana za životinje, i u maloj količini se izdvaja klica. Brašna i krupice čine usitnjene čestice jezgra endosperma, dok stočno brašno i mekinje potiču od omotača i aleuronskog sloja. Kako proces mlevenja nije savršen, deo omotača, aleuronskog sloja i klice se usitni i pomeša sa brašnom, dok deo jezgra endosperma završi u mekinjama. Efikasnost razdvajanja zavisi od mlevnih karakteristika pšenice (meljivost) i načina vođenja tehnološkog procesa pripreme pšenice za mlevenje i mlevenja.

Postupak mlevenja se sastoji iz sukcesivnog usitnjavanja i razvrstavanja usitnjenog mliva. Postupak obuhvata krupljenje, rastvaranje krupice i okrajaka i izmeljavanje. Krupljenjem se razdvajaju anatomske delovi zrna, sa težnjom da se dobije što manje brašna, a što više krupnih delova. Proces obuhvata obično 4-6 pasaža krupljenja. Rastvaranjem krupice i okrajaka se u stvari naziva njihovo usitnjavanje na valjcima. Teži se da se čestice omotača sa okrajaka što manje usitne, kako ne bi dospale u brašno. Izmeljavanjem se čestice krupice i okrajaka usitne i dobija se brašno za različite namene.

U skladu sa postavljenim ciljem u ovoj doktorskoj disertaciji uzorci kontrolne, zaštićene fungicidom i inokulisani sa *Alternaria tenuissima*, kao i uzorak komercijalne pšenice 1, samleveni su na laboratorijskom mlinu. Sa aspekta primenjivosti i značenja rezultata ispitivanja prisustva *Alternaria* toksina u frakcijama mlevenja pšenice značajno je osvrnuti se na udele dobijenih frakcija (Tabela 5.15). Generalno za sve ispitivane uzorke, a u skladu sa uobičajenim odnosima frakcija mlevenja u mlinarskoj tehnologiji, najzastupljenije frakcije su frakcije belih brašna sa prvih prolazišta mlevenja (brašna mlevenja 1, 2, 3). Sa značajnim udelima su zastupljne i prve dve frakcije krupljenja (brašna krupljenja I, II), dok je brašno sa trećeg krupljenja (brašna krupljenja III) zastupljeno sa manjim udelom. Sva ova brašna

pripadaju grupi belih brašna koja najvećim delom potiču iz centralnih delova endosperma i sadrže vrlo mali udeo perifernih delova zrna.

Tabela 5.15 – Udeli frakcija mlevenja ispitivanih uzoraka pšenice

Frakcije		Udeli frakcija (%)			
		Bez tremana	Zaštićena fungicidom	Inokulisana sa <i>Alternaria</i> <i>tenuissima</i>	Komercijalna 1
Brašna krupljenja	I	4,8	6,8	5,6	3,5
	II	10,8	11,0	10,8	7,3
	III	1,3	1,5	1,3	1,3
	IV	1,5	1,6	1,4	1,4
	V	1,3	1,6	1,1	1,5
	VI	0,8	0,9	0,8	0,6
Brašna mlevenja	1	16,1	17,4	19,6	15,0
	2	25,6	25,9	26,4	24,6
	3	10,9	11,4	9,1	18,3
	4	1,8	1,8	1,9	3,7
	5	2,2	1,5	1,3	1,3
	6	0,7	0,6	0,7	0,8
Sporedni proizvodi	Mekinje	14,0	14,4	13,7	15,8
	Osevc	3,3	2,7	3,3	9,7

Brašna sa zadnjih prolazišta mlevenja (brašna mlevenja 4, 5, 6) i krupljenja (brašno krupljenja IV, V, VI) koja pripadaju tamnijim brašnima sa višim sadržajem mineralnih materija i sadrže veće udele perifernih delova zrna su u mlevnim frakcijama zastupljena sa daleko manjim udelima koji su uglavnom ispod 2% od ukupnih proizvoda mlevenja.

Sporedni proizvodi mlevenja čine od 17% do 25% ukupnih proizvoda mlevenja sa dominantnim udelom krupnih mekinja koje su u ukupnim proizvodima mlevenja zastupljene sa 13,7 % do 15,8%.

U dobijenim frakcijama mlevenja ispitan je sadržaj *Alternaria* toksina. Distribucija AOH, AME i TeA po frakcijama mlevenja za sve primenjene tretmane su data u **Tabelama 5.16, 5.17 i 5.18**, respektivno.

Tabela 5.16 – Sadržaj AOH u frakcijama mlevenja ispitivanih uzoraka pšenice

Frakcije		Koncentracija AOH ($\mu\text{g/kg}$)s.m.			
		Bez tretmana	Zaštićena fungicidom	Inokulisana sa <i>Alternaria tenussima</i>	Komercijalna 1
Brašna krupljenja	I	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	II	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	III	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	IV	1,67 ^b	<LOD	1,20 ^b	1,62 ^d
	V	<LOD	1,16 ^b	<LOD	<LOD
	VI	<LOD	<LOD	2,64 ^d	6,58 ^f
Brašna mlevenja	1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4	2,41 ^c	<LOD	<LOD	0,94 ^b
	5	<LOD	<LOD	<LOD	1,52 ^c
	6	8,91 ^f	<LOD	2,45 ^c	6,86 ^g
Sporedni proizvodi	Mekinje	4,12 ^e	<LOD	<LOD	<LOD
	Osevc	4,04 ^d	<LOD	7,97 ^e	2,64 ^e

Različita slova (a, b, c, d, e, f) za isti uzorak ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti prema testu za višestruke razlike po Dunkanu. LOD - granica detekcije.

Iako je u slučaju AOH jedino uzorak komercijalne pšenice bio okarakterisan koncentracijom ovog toksina iznad granice detekcije korišćene metode, interesantno je zapaziti da se AOH javlja u barem jednoj od dobijenih frakcija mlevenja svih ispitivanih uzoraka (Tabela 5.16). Ovakav rezultat ukazuje na činjenicu da je velika verovatnoća da su pšenice u kojima je AOH ispod granica detekcije u značajnom broju slučajeva ipak kontaminirane ovim toksinom, a da postupak razdvajanja mliva na frakcije rezultira dobijanjem frakcija u kojima je ovaj toksin koncentrisan i sledstveno prisutan u količinama koje su se mogle detektovati korišćenom analitičkom metodom.

Frakcije mlevenja pšenice u koje dospevaju delovi pšeničnog zrna u kojima je koncentrisan AOH su pre svega kasnija prolazišta krupljenja i mlevenja, kao i sporedni proizvodi meljave. Ovakav rezultat ukazuje na to da je AOH skoncentrisan pre svega u perifernim delovima zrna koji pretežno procesom mlevenja dospevaju u ove frakcije.

Tabela 5.17 – Sadržaj AME u frakcijama mlevenja ispitivanih uzoraka pšenice

Frakcije		Koncentracija AME ($\mu\text{g/kg}$)s.m.			
		Bez tremana	Zaštićena fungicidom	Inokulisana sa <i>Alternaria tenuissima</i>	Komercijalna 1
Brašna krupljenja	I	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	II	<LOD	<LOD	0,17 ^c	0,56 ^d
	III	<LOD	<LOD	<LOD	1,50 ^k
	IV	1,30 ⁱ	<LOD	1,16 ^h	0,77 ^f
	V	0,27 ^d	0,32 ^c	0,41 ^d	1,01 ⁱ
	VI	0,85 ^h	0,24 ^b	1,15 ^h	4,89 ^l
Brašna mlevenja	1	0,15 ^c	<LOD	<LOD	0,17 ^c
	2	<LOD	<LOD	0,15 ^b	<LOD
	3	0,13 ^b	<LOD	<LOD	0,10 ^b
	4	0,95 ⁱ	<LOD	0,50 ^f	0,59 ^e
	5	0,77 ^g	<LOD	0,47 ^e	1,12 ^j
	6	3,74 ^k	0,78 ^d	0,83 ^g	5,20 ^m
Sporedni proizvodi	Mekinje	0,47 ^e	<LOD	0,41 ^d	0,81 ^g
	Osevci	0,61 ^f	<LOD	1,59 ⁱ	0,92 ^h

Različita slova (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k) za isti uzorak ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti prema testu za višestruke razlike po Dunkanu. LOD - granica detekcije.

U slučaju AME u polaznim uzorcima pšenice ovaj toksin je u koncentracijama iznad granice detekcije bio prisutan u dva od četiri ispitivana uzorka pšenice: komercijalnoj pšenici i pšenici inokuliranoj sa *Alternaria tenuissima*. Uprkos ovoj činjenici, slično kao i slučaju AOH, AME je registrovan u pojedinim frakcijama mlevenja (Tabela 5.17) kod svih ispitivanih uzoraka, što znači da je i u polaznim uzorcima bio prisutan u koncentracijama nižim od granice detekcije korišćene analitičke metode.

U uzorcima pšenice zaštićene fungicidom AME je detektovan samo u zadnjim pasażama mlevenja i krupljenja, što ukazuje na njegovu koncentraciju u perifernim delovima zrna koji pretežno dospevaju u ove frakcije. Kod ostalih uzoraka, posebno onih kod kojih je i pšenica bila kontaminirana sa analitički utvrđenim koncentracijama AME, ovaj toksin je detektovan po pravilu u svim sporednim proizvodima mlevenja, gotovo u svim tamnim brašnima poteklim od kasnijih prolazišta krupljenja i mlevenja ali i u pojedinim svetlim brašnima poteklim sa prvih prolazišta krupljenja i mlevenja, koja čine najveći deo finalnih proizvoda meljave koji se koriste za ljudsku ishranu.

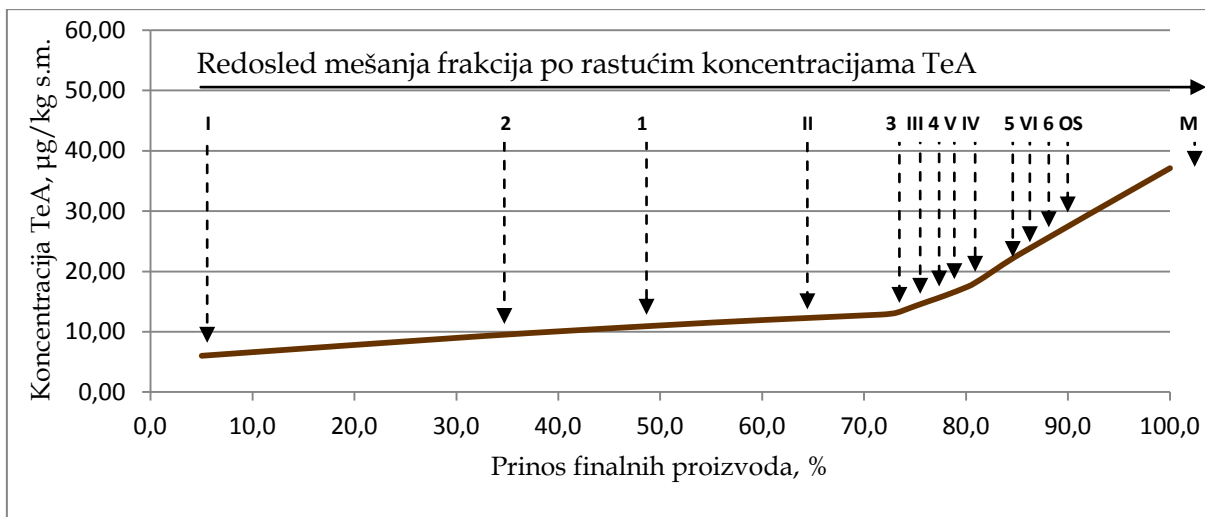
Tabela 5.18 - Sadržaj TeA u frakcijama mlevenja ispitivanih uzoraka pšenice

Frakcije		Koncentracija TeA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) s.m.			
		Bez tretmana	Zaštićena fungicidom	Inokulisana sa <i>Alternaria</i> <i>tenuissima</i>	Komercijalna 1
Brašna krupljenja	I	6,01 ^a	39,52 ^e	7,84 ^a	24,18 ^b
	II	16,34 ^d	36,36 ^d	15,07 ^d	25,72 ^b
	III	26,61 ^e	29,03 ^c	10,06 ^b	28,83 ^c
	IV	61,08 ^g	71,10 ⁱ	51,20 ^g	41,30 ^e
	V	59,76 ^h	63,91 ^h	46,88 ^f	30,37 ^c
	VI	92,58 ⁱ	47,79 ^g	126,19 ^h	219,80 ^h
Brašna mlevenja	1	14,20 ^c	14,90 ^a	13,51 ^c	24,67 ^b
	2	9,80 ^d	14,68 ^a	13,44 ^c	<LOD
	3	17,54 ^b	20,65 ^b	14,95 ^c	<LOD
	4	58,10 ^f	44,09 ^f	39,26 ^e	38,32 ^d
	5	69,09 ^h	36,09 ^d	132,47 ⁱ	55,26 ^f
	6	104,77 ^j	39,40 ^e	225,54 ^k	268,32 ^j
Sporadni proizvodi	Mekinje	119,56 ^l	141,89 ^k	147,54 ^j	109,19 ^g
	Osevc	112,49 ^k	91,00 ^j	258,19 ^l	249,14 ⁱ

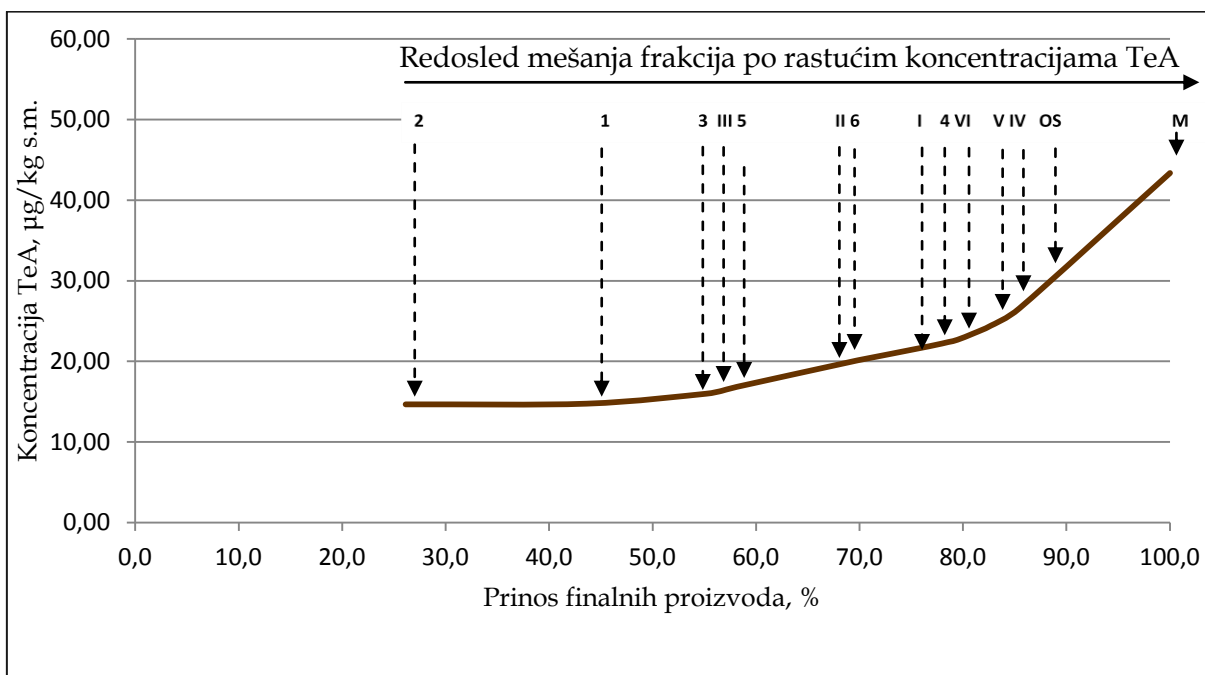
Različita slova (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l) za isti uzorak ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti prema testu za višestruke razlike po Dunkanu. LOD - granica detekcije.

Posebno zanimljivi rezultati distribucije toksina u frakcijama mlevenja (**Tabela 5.18**) dobijeni su u slučaju TeA, koja je u značajnim količinama bila prisutna u svim ispitivanim uzorcima. Pre svega, interesantno je istaći da se dobijene frakcije brašna međusobno u velikoj meri i statistički značajno razlikuju u pogledu sadržaja TeA, što upućuje na tehnološku mogućnost redukcije i upravljanja sadržajem TeA u finalnim proizvodima mlevenja uključivanjem frakcija mlevenja sa niskim sadržajem TeA u kompoziciju finalnih proizvoda i odbacivanjem frakcija sa povišenim sadržajem ovog toksina.

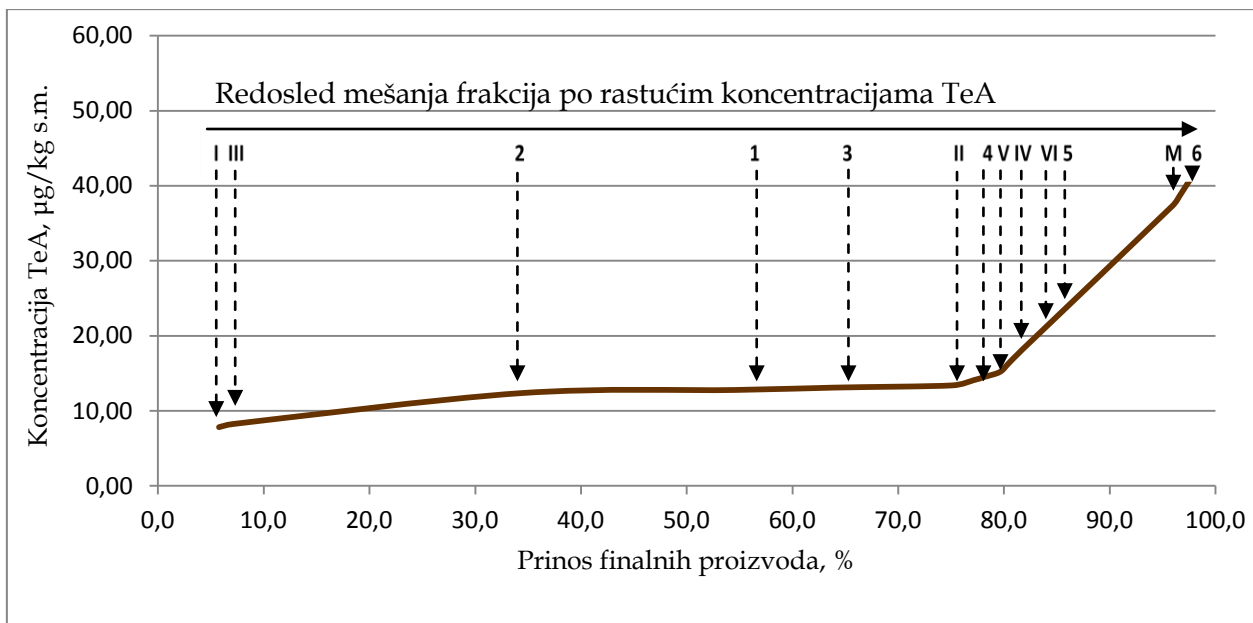
Kako bi se preciznije sagledale mogućnosti i principi upravljanja koncentracijom TeA u finalnim kompozitnim brašnima, za sve ispitivane uzorke konstruisane su kumulativne krive sadržaja TeA u finalnim proizvodima koje uključuju i podatak o koncentraciji TeA, ali i udeo posmatranih frakcija u dobijenoj strukturi proizvoda mlevenja za uzorke pšenice bez tretmana (Slika 5.8), pšenice zaštićene fungicidom (Slika 5.9), pšenice inokulisane sa *Alternaria tenuissima* (Slika 5.10) i komercijalne pšenice 1 (Slika 5.11).



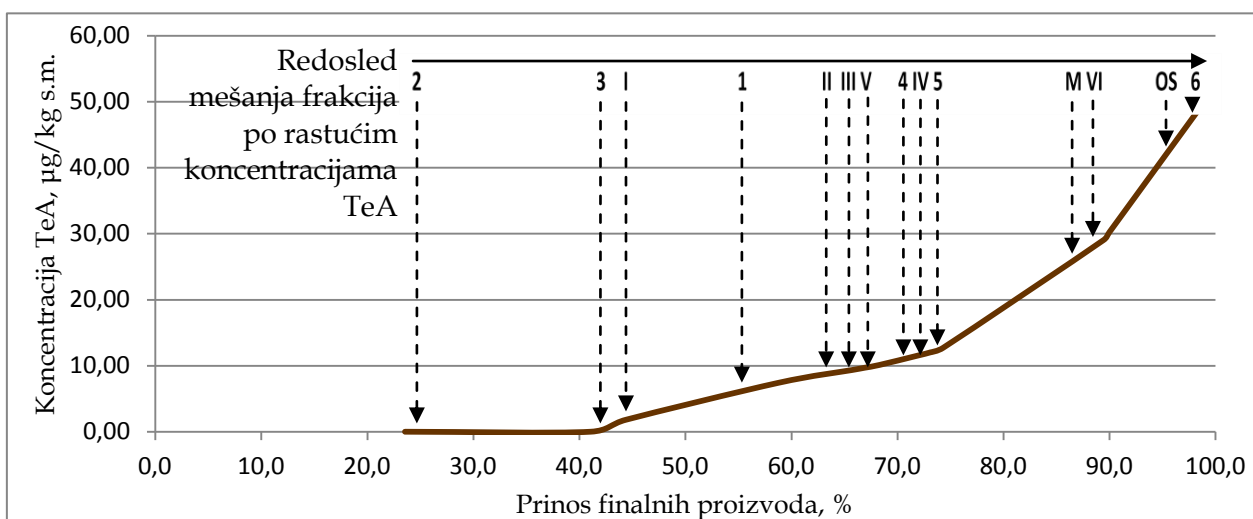
Slika 5.8 - Kumulativne krive sadržaja TeA u kompozitnim brašnim uzoraka pšenice proizvedene bez tretmana u zavisnosti od ostvarenog prinosa brašna



Slika 5.9 - Kumulativne krive sadržaja TeA u kompozitnim brašnim uzoraka pšenice proizvedene uz zaštitu fungicidom u zavisnosti od ostvarenog prinosa brašna



Slika 5.10 – Kumulativne krive sadržaja TeA u kompozitnim brašnim uzoraka pšenice proizvedene uz inokulaciju sa *Alternaria tenuissima* u zavisnosti od ostvarenog prinosa brašna



Slika 5.11 – Kumulativne krive sadržaja TeA u kompozitnim brašnim uzoraka komercijalne pšenice u zavisnosti od ostvarenog prinosa brašna

Uprkos naizgled različitim oblicima kumulativnih krivih koncentracije TeA u kompozitnim brašnim dobijenim mešanjem frakcija mlevenja ispitivanih uzoraka pšenice, prikazane kumulativne krive omogućuju zapažanja koja su zajednička za sve ispitivane uzorke i koja predstavljaju osnov za definisanje smernica za ostvarenje redukcije prisustva TeA u komercijalnim proizvodima mlevenja pšenice. Naime, kod svih ispitivanih uzoraka zapaža se da se kumulativna kriva koncentracije TeA sastoji iz dva uočljiva dela: prvog u

kom značajno raste prinos proizvoda, a vrlo blago raste sadržaj TeA u finalnom kompozitnom brašnu i drugog, strmijeg, u kom mala povećanja prinosa finalnih kompozitnih brašna rezultiraju značajnim povećanjem koncentracije TeA u finalnom proizvodu. Drugo značajno zapažanje je da se u prvom delu krive u kompozitna brašna prevashodno dodaju frakcije prvih prolazišta mlevenja (brašna mlevenja 1, 2, 3) i krupljenja (brašna krupljenja I, II, III) koje su ujedno u strukturi frakcija mlevenja zastupljena sa najvećim udelima (**Tabela 5.15**). U drugom delu krive, koji rezultira naglim porastom koncentracije TeA u kompozitnom brašnu prevashodno su prisutne zadnje frakcije mlevenja (brašna mlevenja 4, 5, 6) i krupljenja (brašna krupljenja IV, V, VI), kao i sporedni proizvodi mlevenja. Takođe treba istaći da kod pojedinih uzoraka (inokulisana i komercijalna pšenica) frakcije mlevenja sa najvišim udelom TeA nisu sporedni proizvodi mlevenja već upravo zadnja prolazišta mlevenja (brašno mlevenja 6) i krupljenja (brašno krupljenja VI), odnosno najtamnija brašna.

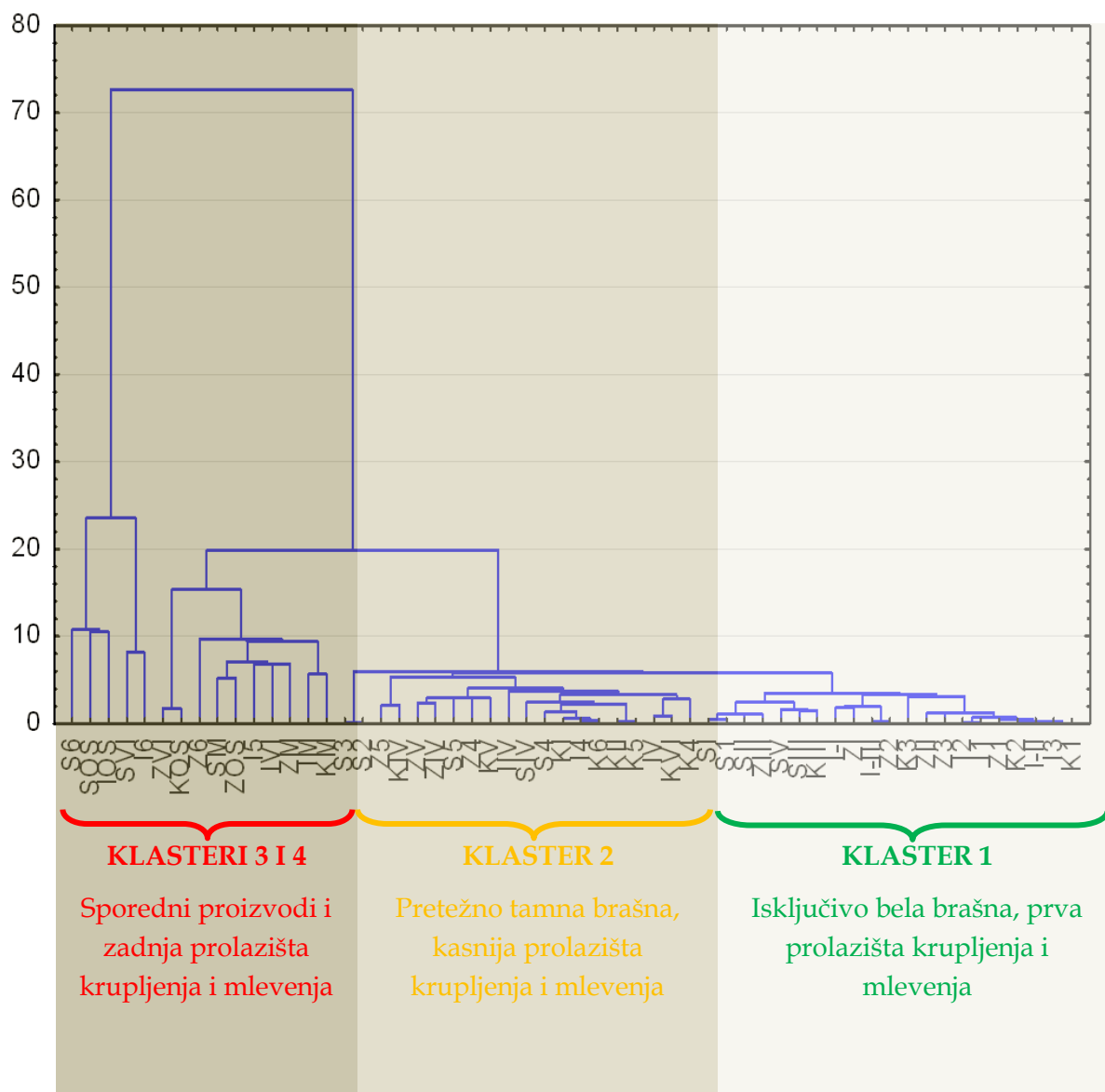
Izneta zapažanja ukazuju na zaključak da se odvajanjem belih brašna uz svesno izbegavanje povećanja prinosa brašna, dodavanjem frakcija dobijenih na zadnjim prolazištima krupljenja i mlevenja može dobiti finalni proizvod – belo brašno, sa tehnološki prihvatljivim prinosom u kom je koncentracija TeA u odnosu na polaznu sirovinu višestruko redukovana.

Pored navedenih razmatranja koja se odnose pre svega na redukciju TeA postavlja se pitanje mogućnosti redukcije svih posmatranih *Alternaria* toksina uz primenu navedenih principa. Kako bi se dobio odgovor na ovo pitanje urađena je klaster analiza grupisanja frakcija mlevenja svih ispitivanih uzoraka pšenice u odnosu na koncentraciju sva tri ispitivana *Alternaria* toksina u dobijenim frakcijama (Slika 5.12).

Na dobijenom dendogramu jasno se uočavaju 4 klastera. Prvi klaster čine isključivo bela brašna koja se dobijaju na prvim prolazištima mlevenja i krupljenja. Drugi klaster, koji nije mnogo udaljen, ali je ipak jasno izdvojen od prvog čine pretežno tamna brašna koja potiču sa kasnijih prolazišta mlevenja i krupljenja uz samo jedan slučaj brašna sa prvih prolazišta mlevenja (brašno sa drugog meljača od netretirane pšenice). Treći klaster koji je manje udaljen ali jasno izdvojen od prva dva, kao i četvrti koji je značajno udaljen od sva tri klastera čine isključivo sporedni proizvodi mlevenja i zadnja prolazišta krupljenja i mlevenja.

Dobijeni rezultati klaster analize ukazuju na realnu mogućnost značajne redukcije svih toksina u finalnim kompozitnim proizvodima mlevenja kroz postupak odbacivanja tamnih brašna koja se u strukturi frakcija mlevenja javljaju sa malim udelima, ali u kojima su koncentrisani *Alternaria* toksini.

S obzirom na nutritivnu vrednost tamnih, a posebno integralnih brašna, ovakav rezultat upućuje na potrebu temeljnije kontrole prisustva *Alternaria* toksina kako u pšenici, tako i u brašnima koja će se koristiti za proizvodnju i plasirati kao integralna, odnosno tamna brašna. S obzirom na dobijene rezultate proizvodnja ove vrste mlinskih proizvoda opravdana je i bezbedna jedino u slučaju korišćenja pšenice u kojoj je analitički utvrđeno odsustvo, odnosno veoma niska koncentracija *Alternaria* toksina.



Slika 5.12 – Klaster analiza frakcija mlevenja svih ispitivanih uzoraka pšenice u odnosu na koncentraciju AOH, AME i TeA u dobijenim frakcijama

(Prefiksi naziva frakcija: S-bez tretmana (standardna); Z-zaštićena fungicidom; I-Inokulisana sa *Alternaria tenuissima*; K- komercijalna pšenica; Oznake frakcija mlevenja 1, 2, 3, 4, 5, 6 – brašna mlevenja; I, II, III, IV, V, VI – brašna krupljenja, M-mekinje, Os-osevci)

5.2.4. Mogućnosti redukcije sadržaja *Alternaria* toksina primenom postupaka ekstrudiranja

S obzirom na to da ne postoje podaci o stabilnosti i sudbini *Alternaria* toksina tokom procesa ekstrudiranja, izvršeno je ispitivanje uticaja parametara u procesu ekstrudiranja (w- vlaga materijala, q-protok materijala, v- brzina obrtaja puža ekstrudera) na redukciju TeA, AOH i AME, uz praćenje procesnih parametara: pritiska (P) i temperature ekstrudiranja (T), kao i specifične potrošnje energije (E).

Za potrebe istraživanja mogućnosti redukcije prisustva *Alternaria* toksina primenom postupka ekstrudiranja korišćeno je brašno od celog zrna pšenice dobijeno mlevenjem na mlinu na kamen od komercijalne pšenice 2 u kom je registrovano prisustvo sva tri posmatrana *Alternaria* toksina (Tabela 5.12).

U postupku ekstrudiranja žita običajna vlažnost materijala pri dobijanju ekstrudata kreće se od 17 do 20%, a protok materijala i brzina obrtaja puža se podešava tako da postignuta temperatura bude oko 110 °C uz pritisak oko 70 kPa. U postupku ekstrudiranja procesni parametri mogu se podesiti, tako da je moguće postići temperaturu i preko 160 °C u kućištu ekstrudera. Za očekivati je da ovakvi uslovi rezultiraju redukcijom prisustva *Alternaria* toksina u korišćenim proizvodima mlevenja pšenice.

Ostvarenje navedenih proizvodnih uslova postiže se podešavanjem ulaznih parametara regulacije procesa ekstrudiranja uključujući sadržaj vlage materijala koji se ekstrudira, brzinu obrtanja puža ekstrudera, kao i brzinu proticanja materijala koji se ekstrudira. Kako bi se definisao opseg parametara regulacije procesa ekstrudiranja u kojima se ostvaruju željene vrednosti procesnih parametara, ali i ostvaruje redukcija sadržaja *Alternaria* toksina u proizvodima ekstrudiranja, obavljen je niz proba uz korišćenje različitih radnih uslova ekstrudera. Za jednopužni ekstruder korišćen u eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije, brzina puža je varirana u uobičajenim opsezima od 300 do 500 obrtaja u minuti uz kapacitete od 15 do 25 kg/h. Na bazi analize dobijenih ekstrudata, preliminarno su sagledane mogućnosti redukcije *Alternaria* toksina postupkom ekstrudiranja (Tabela 5.19).

Tabela 5.19 – Preliminarno sagledavanje mogućnosti redukcija *Alternaria* toksina primenom postupka ekstrudiranja

<i>Alternaria</i> toksin	Srednja vrednost	Minimum	Maximum
TeA (µg/kg) s.m.	57,91±8,33	47,75	79,42
AOH (µg/kg) s.m.	0,47±0,43*	<LOD	1,13
AME (µg/kg) s.m.	0,56±0,32	0,20	1,34

*uzeti u obračun samo uzorci sa sadržajem AOH iznad LOD

Prikazani rezultati ukazali su da se primenom ekstrudiranja ostvaruje značajna redukcija prisustva *Alternaria* toksina u odnosu na polazni uzorak pšenice (Tabela 5.12), kao i da primena različitih parametara regulacije postupka ekstrudiranja rezultira značajnim variranjem krajnjeg sadržaja *Alternaria* toksina u ekstrudiranom proizvodu. Ovakvi rezultati uputili su na potrebu i opravdanost optimizacije procesnih parametara ekstrudiranja u pravcu ostvarenja maksimalnih efekata redukcije prisustva *Alternaria* toksina u proizvodima ekstrudiranja.

5.2.5. Optimizacija procesnih parametara ekstrudiranja za maksimalnu redukciju sadržaja *Alternaria* toksina

Kako bi se uz minimalno potreban broj proba došlo do optimalnih rezultata optimizacija procesnih parametara postupka ekstrudiranja obavljena je uz primenu eksperimentalnog dizajna prikazanog u Tabeli 5.20. U navedenoj tabeli prikazani su paralelno ulazni parametri regulacije postupka ekstrudiranja dodeljeni definisanim kodovima eksperimentalnog dizajna, kao i merene vrednosti postignutih procesnih parametara ekstrudiranja – temperature, pritiska i utroška energije.

Tabela 5.20 – Dizajn eksperimenta optimizacije parametara ekstrudiranja

Proba broj	Kodovi dizajna			Ulazni parametri regulacije procesa			Procesni parametri		
	w	q	v	w (%)	q (kg/h)	v (o/m)	P (Pa)	T (°C)	E (kWh/t)
1	1	0	1	24	20	480	0,7×10 ⁵	113,0	92,0
2	1	-1	0	24	15	390	0,7×10 ⁵	111,1	81,2
3	1	1	0	24	25	390	0,7×10 ⁵	113,9	92,3
4	1	0	-1	24	20	300	0,7×10 ⁵	111,6	63,7
5	0	0	0	20	20	390	0,7×10 ⁵	142,7	89,8
6	0	-1	1	20	15	480	0,7×10 ⁵	125,3	99,8
7	0	0	0	20	20	390	0,7×10 ⁵	143,3	92,1
8	0	1	1	20	25	480	0,9×10 ⁵	150,6	95,1
9	0	0	0	20	20	390	0,8×10 ⁵	142,7	99,9
10	0	-1	-1	20	15	300	0,7×10 ⁵	116,0	82,6
11	0	1	-1	20	25	300	0,7×10 ⁵	129,0	80,7
12	-1	0	1	16	20	480	0,7×10 ⁵	146,0	108,4
13	-1	-1	0	16	15	390	0,7×10 ⁵	139,5	106,6
14	-1	1	0	16	25	390	1,3×10 ⁵	160,8	101,8
15	-1	0	-1	16	20	300	0,8×10 ⁵	136,8	87,3

w – vlaga brašna od celog zrna pšenice (%); q – brzina protoka materijala (kg/h), v – brzina obrtanja puža ekstrudera (obrtaja/minut), p – pritisak (Pa), T- temperatura (°C), E – specifična potrošnja energije (kWh/t materijala)

Nakon izvršenih proba ekstrudiranja prema prikazanom eksperimentalnom dizajnu u dobijenim ekstrudatima, izvršeno je analitičko određivanje prisustva *Alternaria* toksina. Pre pristupanja optimizaciji procesnih parametara ekstrudiranja, dobijene koncentracije *Alternaria* toksina su izražene kao procentualna redukcija sadržaja posmatranih *Alternaria* toksina u odnosu na njihovu koncentraciju u polaznom uzorku pšenice koja je prikazana u **Tabeli 5.12**. Na bazi izračunatih redukcija prisustva *Alternaria* toksina za postavljene eksperimentalni dizajn izračunata je vrednost standardne ocene (eng. *standard score*, SS). Ovako dobijeni deskriptivni rezultati prikazani su u **Tabeli 5.21**.

Statistička analiza varijansi je pokazala da između pojedinih primenjenih kombinacija procesnih parametara postupka ekstrudiranja ostvarenim pri različitim ulaznim veličinama, postoje statistički značajne razlike u nivoima redukcije ispitivanih *Alternaria* toksina, čime je dodatno potvrđena opravdanost pristupa optimizaciji postupka ekstrudiranja u cilju definisanja optimalnih proizvodnih uslova sa aspekta redukcije prisustva *Alternaria* toksina u proizvodima ekstrudiranja.

Tabela 5.21 -Uticaj procesnih parametara ekstrudiranja na redukcija *Alternaria* toksina

Proba broj	Odziv						SS
	T (°C)	p (Pa)	E (Kwh/t)	Redukcija AOH (%)	Redukcija AME (%)	Redukcija TeA (%)	
1	113,0	0,7×10 ⁵	92,0	87,9 ^{bc}	91,4 ^{efg}	59,3 ^e	0,88
2	111,1	0,7×10 ⁵	81,2	72,7 ^a	77,1 ^b	55,3 ^d	0,35
3	113,9	0,7×10 ⁵	92,3	87,9 ^{bc}	94,5 ^g	65,6 ^g	1,00
4	111,6	0,7×10 ⁵	63,7	87,9 ^{bc}	92,9 ^{fg}	60,1 ^e	0,91
5	142,7	0,7×10 ⁵	89,8	87,9 ^{bc}	89,6 ^{efg}	55,1 ^d	0,81
6	125,3	0,7×10 ⁵	99,8	74,4 ^a	87,7 ^{def}	64,4 ^{fg}	0,62
7	143,3	0,7×10 ⁵	92,1	87,9 ^{bc}	93,0 ^{fg}	51,9 ^c	0,80
8	150,6	0,9×10 ⁵	95,1	78,5 ^{ac}	85,6 ^d	56,8 ^d	0,58
9	142,7	0,8×10 ⁵	99,9	86,4 ^b	90,3 ^{efg}	58,0 ^e	0,82
10	116,0	0,7×10 ⁵	82,6	74,6 ^a	82,4 ^{cd}	55,7 ^d	0,45
11	129,0	0,7×10 ⁵	80,7	87,9 ^{bc}	62,8 ^a	50,4 ^b	0,47
12	146,0	0,7×10 ⁵	108,4	80,1 ^{abc}	74,7 ^b	62,5 ^f	0,58
13	139,5	0,7×10 ⁵	106,6	87,9 ^{bc}	87,3 ^{de}	59,2 ^e	0,84
14	160,8	1,3×10 ⁵	101,8	87,9 ^{bc}	82,9 ^{cd}	40,3 ^a	0,54
15	136,8	0,8×10 ⁵	87,3	87,9 ^{bc}	78,5 ^{bc}	52,7 ^c	0,66

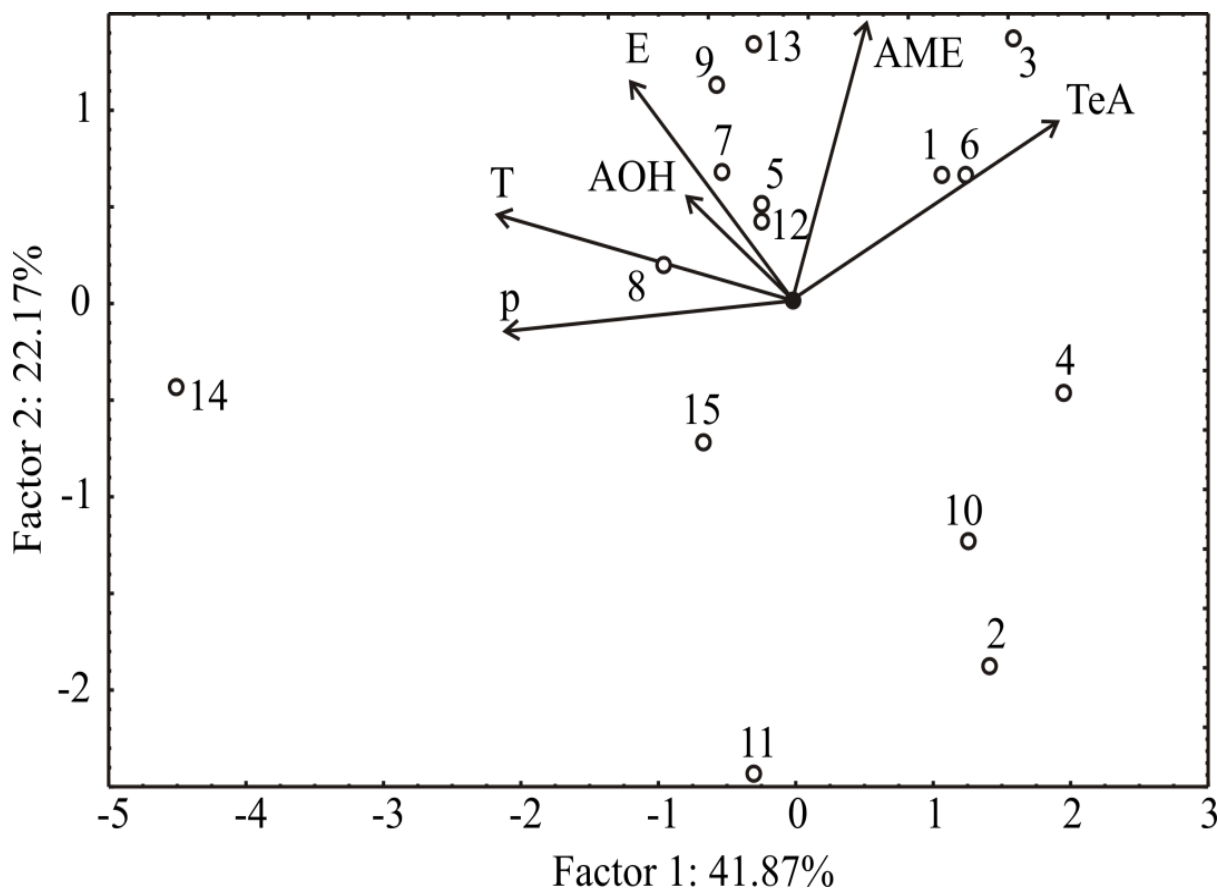
Različita slova (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l) za isti uzorak ukazuju na signifikantnost razlika ($p < 0,05$) između vrednosti prema testu za višestruke razlike po Dunkanu.

S druge strane, rezultati Duncanovog testa prikazani u **Tabeli 5.21** ukazuju i na značajno preklapanje primenjenih postupaka, kao i različit uticaj primenjenih procesnih parametara na posmatrane *Alternaria* toksine. Odsustvo jasnog izdvajanja pojedinih kombinacija procesnih parametara na bazi posmatranja redukcije pojedinačnih *Alternaria* toksina, potvrđuje potrebu optimizacije procesa uz primenu alatki koje obezbeđuje primenjeni elspperimentalni dizajn.

Metoda odzivne funkcije (eng. *response surface method*, RSM) je korišćena kao efikasna tehnika za optimizaciju velikog broja parametara koji opisuju proces ekstrudiranja (Mohboob i sar., 2013).

Eksperimentalni rezultati su podvrgnuti analizi varijanse (ANOVA), da bi se pokazali odnosi među merenim veličinama. U svrhu boljeg uvida i komparacije između uzoraka, primenjena je SS. Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analyses*, PCA) je korišćena da bi se razdvojile grupe uzoraka u faktorskoj ravni.

Grafički prikaz trendova i efikasnost odvajanja grupa parametara na osnovu korišćenih deskriptora prikazani su na Slici 5.13, gde su dati uzorci korišćenjem prve dve glavne komponente, koje su dobijene iz PCA analize.



Slika 5.13 - Biplot grafik redukcije *Alternaria* toksina tokom procesa ekstrudiranja pšeničnog brašna od celog zrna

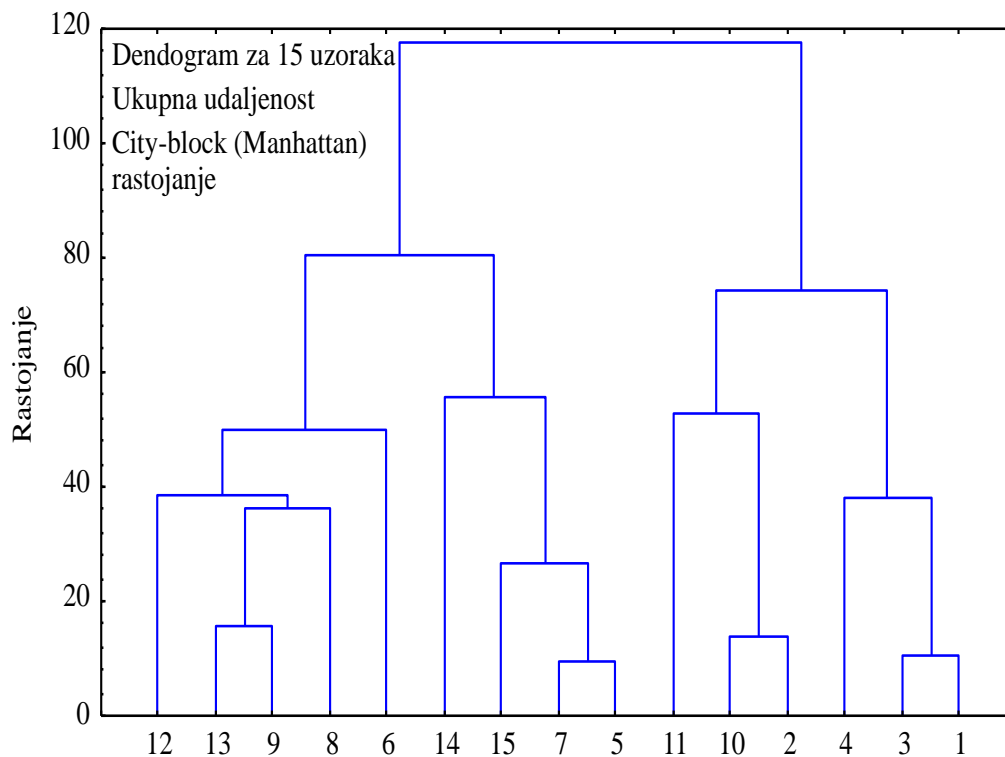
Na Slici 5.13 može se videti da je izvršeno uspešno odvajanje grupa podataka za 15 uzoraka. Kvalitativni rezultati za ovu analizu pokazuju da prve dve glavne komponente zajednički prikazuju 64,04% ukupne varijanse i da se to može smatrati dovoljnim za prikazivanje celokupnog seta eksperimentalnih podataka. Promenljive T (koja prikazuje 31,1% totalne varijanse), p (29,4%) i TeA (24,2%) su bile najznačajnije za reprezentaciju prve glavne komponente, dok su doprinosi AME (43,7%), E (27,0%) i TeA (18,1%) bili najznačajniji za izračunavanje druge faktorske koordinate.

Uticaj procesnih parametara na različite uzorke može da se oceni sa Slike 5.13, na kojoj su uzorci koji imaju veću potrošnju energije locirani u gornjoj levoj zoni grafika, a veće vrednosti redukcije AME, TeA i AOH imaju uzorci na gornjoj strani grafika. PCA grafik je pokazao da se uzorci sasvim dobro grupišu na osnovu razlika u p, T, E, TeA, AME i AOH. Uzorak 3 se pokazao kao najbolji sa stanovišta redukcije AME i TeA, što se slaže sa rezultatima SS analize.

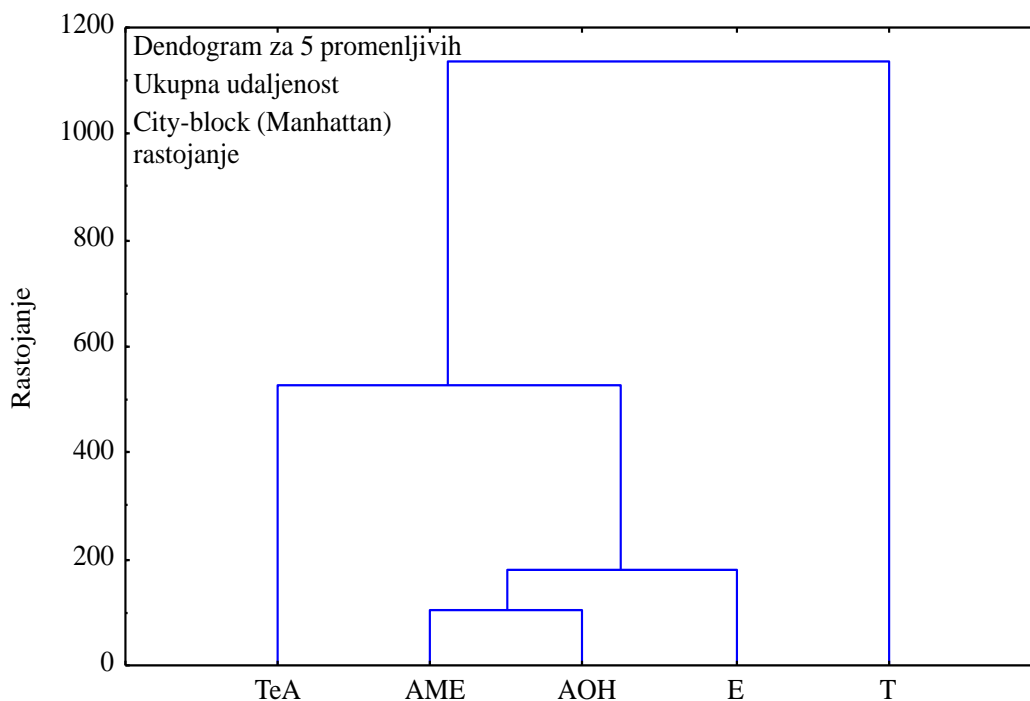
Na Slikama 5.14 i 5.15 prikazani su dendogrami vezani za primenjeni proces ekstrudiranja. Računate su ukupne povezanosti tačaka (eng. *complete linkage*), a rastojanja između tačaka u 6-dimenzionalnom koordinatnom prostoru su merena korišćenjem City-block (Manhattan) algoritma. City-block rastojanja, koje se prikazuju na ordinatnoj osi grafika su merena kao srednje razlike između dimenzija različitih uzoraka. Merenje udaljenosti City-block algoritmom daje rezultate slične Euklidskom merenju, ali je to merenje pogodnije zato što je smanjen uticaj pojedinačnih velikih udaljenosti (autlajer, eng. *outlier*), pošto se ne računaju kvadrati vrednosti pojedinačnih koordinata.

Dendogram na Slici 5.14 prikazuje klaster analizu za kombinacije ulaznih parametara regulacije postupka ekstrudiranja. Na dendogramu se primećuju dva odvojena klastera, desni koji obuhvata uzorke 1, 2, 3, 4, 10 i 11 (koji imaju povećane vrednosti AME, AOH i TeA) i levi klaster koji obuhvata uzorke 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 i 15. Uočena je znatna udaljenost ova dva klastera (oko 120).

Dendogram na Slici 5.15 prikazuje klaster analizu za posmatrane *Alternaria* toksine (AOH, AME i TeA) i postignute procesne parametre ekstrudiranja (E i T). Na dendogramu se primećuje postojanje tri klastera: prvi u kome se nalazi samo T, drugi u kome je TeA i treći klaster koji je obuhvatio AOH, AME i E. Najveća udaljenost je zapažena između T i TeA (što odgovara najmanjoj korelaciji). Isti zaključak je proizašao i iz PCA analize. Udaljenost između TeA i E je takođe veoma izražena (ove dve promenljive nisu u korelaciji). Korelacija između AOH i AME je najveća, pa je udaljenost na dendogramu najmanja. Ovo se može objasniti činjenicom da AOH i AME po hemijskoj strukturi pripadaju istoj strukturnoj grupi, tj. derivati su dibenzo- α -pirona.



Slika 5.14 - Dendrogram za klaster analizu za kombinacije ulaznih parametara regulacije postupka ekstrudiranja



Slika 5.15 - Dendrogram za klaster analizu za posmatrane *Alternaria* toksine (AME, AOH i TeA) i postignute procesne parametre ekstrudiranja (E i T)

Analizom varijanse (ANOVA) određuje se uticajnost nezavisnih veličina na odzivne promenljive, kao i uticajnost interakcije nezavisnih veličina na odzive. ANOVA analiza (Tabela 5.22) je urađena da bi se pokazali uticaji nezavisnih procesnih parametara procesa ekstrudiranja (w , q i v) na odzive, kao i da bi se pokazalo na koje odzive su statistički značajno uticale pojedine nezavisne promenljive i/ili kombinacije tih promenljivih (Montgomery, 1984). SOP modeli svih odzivnih promenljivih koji su fitovani sa eksperimentalnim podacima su bili statistički značajni.

Tabela 5.22 – Koeficijenti regresione jednačine za temperature, specifičnu potrošnju energije i redukciju AOH, AME i TeA tokom procesa ekstrudiranja

Term	dF	T	E	p	AOH	AME	TeA
w	1	2227,78 ⁺	698,07 ⁺	0,06 ^{**}	79,38	132,03 ^{**}	81,92 ^{**}
w²	1	206,31 [*]	0,05	0,01	260,79 [*]	0,54	9,40
q	1	486,72 ⁺	0,01	0,08 ^{**}	1055,70 ⁺	9,46	57,78 ^{**}
q²	1	62,07	9,56	0,02	341,76 ⁺	97,30	0,19
v	1	215,28 [*]	819,17 ⁺	0,00	371,28 ⁺	64,98	72,60 ^{**}
v²	1	271,50 [*]	132,40 ^{**}	0,01	55,56	142,314 ^{**}	40,72
w × q	1	85,56	63,74	0,09 ^{**}	285,61 [*]	118,81	213,16 [*]
w × v	1	15,21 [*]	12,96	0,00	156,25 [*]	1,32	28,09
q × v	1	37,82	2,05	0,01	107,12	76,56	1,32
Error	5	113,51	119,37	0,07	101,59	406,66	95,75
r²		0,969	0,936	0,804	0,964	0,606	0,840

Skraćenice:⁺Značajno na nivou $p < 0,01$, ^{*} Značajno na nivou $p < 0,05$, ^{**} Značajno na nivou $p < 0,10$, 95% interval poverenja, utvrđeno je da greška nije statistički značajna.

Linearni članovi w i q SOP modela za računanje T su bili najuticajnije (statistički značajno na nivou $p < 0,01$, 99% nivo poverenja), dok su kvadratni članovi w i v , kao i linearni član SOP modela v bili takođe značajni za računanje T , statistički značajno na nivou $p < 0,05$.

Linearni članovi SOP modela w i v su bili najznačajnije za izračunavanje E , $p < 0,01$, dok je kvadratni član v bio takođe veoma značajan, statistički značajan na nivou $p < 0,10$.

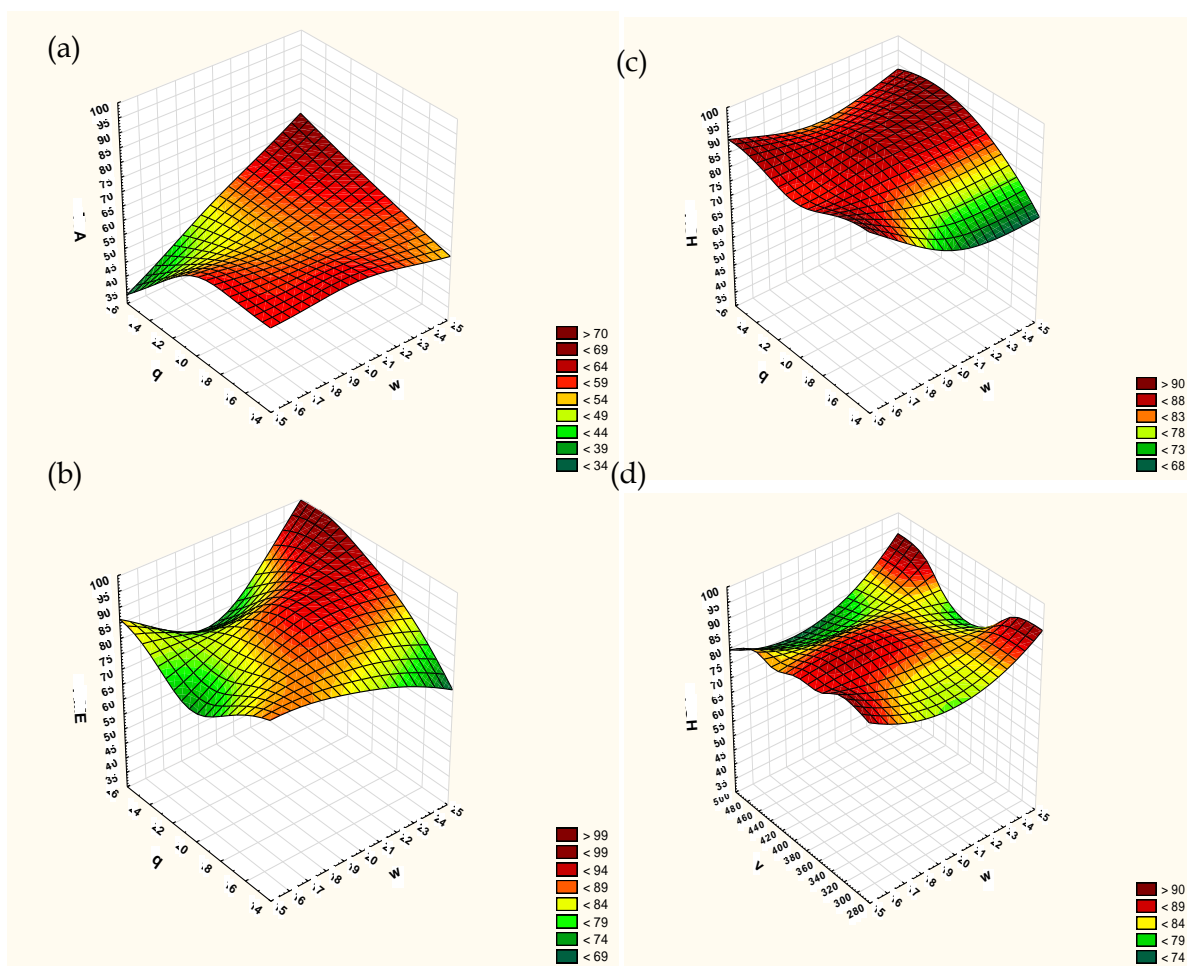
Linearni članovi w i q su bili najznačajnije za predikciju p statistički značajan na nivou $p < 0,10$.

Član mešovitog proizvoda $w \times q$ bio je najznačajnije za računanje TeA redukcije, statistički značajno na nivou $p < 0,05$, dok je linearni član w takođe veoma značajan, statistički značajan na nivou $p < 0,10$.

Linearni član q je bio najznačajniji za računanje redukcije AOH, dok su kvadratni članovi w i q , kao i linearni član v i član mešovitog proizvoda $w \times q$ bili takođe značajni za predviđanje redukcije AOH, statistički značajno na nivou $p < 0,05$. Uticaj $w \times v$ je takođe primećen, statistički značajno na nivou $p < 0,05$.

Na izračunavanje redukcije AME najveći uticaj ima linearni član w i nelinearni članovi: kvadratni član v i član mešovitog proizvoda $w \times q$, statistički značajan na nivou $p < 0,10$.

Uticaj w i q na redukcija TeA, AME i AOH, kao i uticaj w i v na redukciju AOH prikazani su grafički na Slici 5.16.



Slika 5.16 - Uticaj w i q na redukcija (a) TeA, (b) AME i (c) AOH i uticaj w i v na redukciju (d) AOH

Ostatak varijanse je takođe prikazan u **Tabeli 5.22**, pri čemu greška poklapanja modela i eksperimentalnih podataka predstavlja doprinose viših članova polinoma koji nisu prikazani u modelu. U slučaju da je vrednost ove greške značajno visoka, to pokazuje da regresioni model neuspešno prikazuje eksperimentalne podatke na zadovoljavajući način.

Koeficijent determinacije r^2 se definiše kao odnos prikazane varijanse i ukupne varijanse (Madamba, 2002). Ovaj koeficijent takođe predstavlja onaj deo varijabilnosti odzivne promenljive koja je opisana regresionom analizom. Visoka vrednost r^2 ukazuje da je prikazani stepen varijacije veliki i da model na zadovoljavajući način predstavlja eksperimentalne podatke (SOP u ovom slučaju).

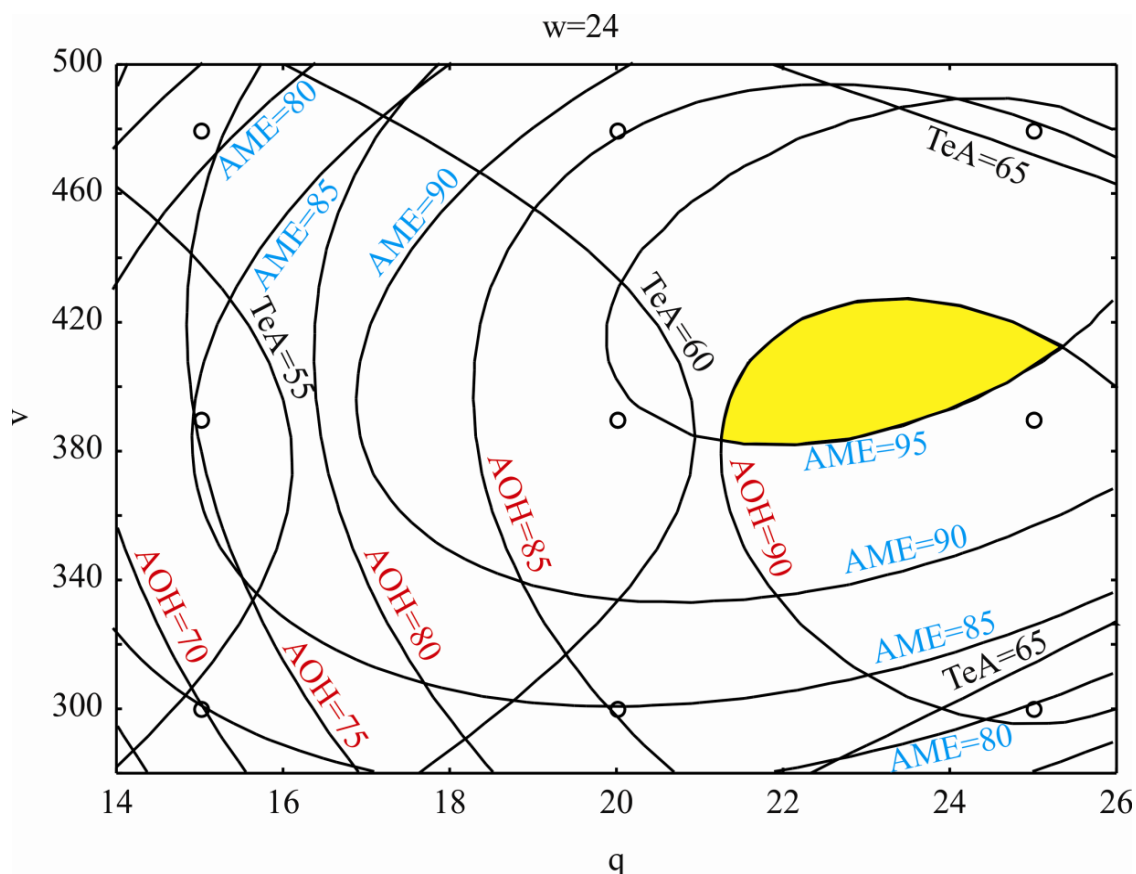
Vrednosti za r^2 za p (0,804), T (0,969), E (0,936), TeA (0,840), AOH (0,964) i AME (0,606) su veoma dobre, što znači da modeli na dobar način predstavljaju eksperimentalne podatke.

Korišćenjem ovih modela nacrtane su konture za redukciju TeA, AOH i AME (Slika 5.17), i zatim preklopljene da bi se dobila zona optimalnih procesnih uslova. Optimizacija procesa je vršena da se obezbedi brza proizvodnja, sa visokim T vrednostima redukcije TeA, AOH i AME, kao i povećanje produktivnosti.

Optimalna zona za određivanje procesnih parametara je dobijena posle nekoliko interaktivnih koraka: redukcija TeA (veća od 50%), AOH (90 - 100%) i AME (više od 50%). Optimalna zona koja je označena žutom bojom, dobijena je na osnovu približnog određivanja optimalnih vrednosti na grafiku.

Konturni grafici za redukciju TeA i AOH pokazali su da su najveće vrednosti dobijene na donjoj desnoj strani grafika, dok se redukcija AME bliži maksimalnoj vrednosti na desnoj strani grafika. Optimalne vrednosti za nezavisne promenljive su: $w=24\%$, $q=25$ kg/h, $v=390$ obrtaja/minut, a željeni odzivi su: TeA=60-65%, AOH=90% i AME=95%.

SS (**Tabela 5.21**) predstavlja srednju vrednost standardnih ocena koje su dobijene na osnovu početnog seta podataka za različite merene vrednosti (TeA, AME, AOH), za svaki analizirani uzorak, pri čemu je svaki mereni parametar imao isti težinski koeficijent. SS je bezdimenzioni broj i opisuje zajednički uticaj svih merenih veličina. Iako predstavlja samo relativnu vrednost, a ne jednu specifičnu osobinu uzorka, SS ipak prikazuje realnu ocenu svakog uzorka.



Slika 5.17 - Optimalna zona dobijena nakon preklapanja konturnih grafika odziva sistema

Vrednosti SS iznad 0,7 podrazumevaju da je uzorak visokog kvaliteta. Korišćenje SS analize n različitim uzorcima koji su dobijeni korišćenjem različitih procesnih parametara, omogućava razvijanje strategije kako poboljšati finalne karakteristike proizvoda. Promenama q , w i v može se smanjiti sadržaj mikotoksina u ekstrudiranom proizvodu, tj. može se povećati SS ocena.

SS analiza je pokazala (**Tabela 5.21**) da su optimalne vrednosti redukcije TeA, AOH, AME ostvarene kod uzorka 3, sa $w=24\%$, $q=25\text{kg/h}$, $v=390$ obrtaja/minut ($SS=1,00$). Potom sledi ekstrudat 4, čija je SS ocena bila $SS=0,91$, dok je uzorak 2 imao najmanju redukciju mikotoksina (SS je bio svega 0,35).

5.3. Procena rizika prisustva *Alternaria* toksina u pšenici primenom ispitivanih tehnoloških postupaka

Rezultati dobijeni ispitivanjem mogućnosti redukcije prisustva *Alternaria* toksina primenom odabranih i analiziranih tehnoloških postupaka predstavljaju osnov za sveobuhvatnu procenu mogućnosti pojave rizika bezbednosti izazvanih prisustvom *Alternaria* toksina u pšenici i proizvodima njene prerade.

Model procene rizika razvijen je na primeru TeA kao *Alternaria* toksina koji je:

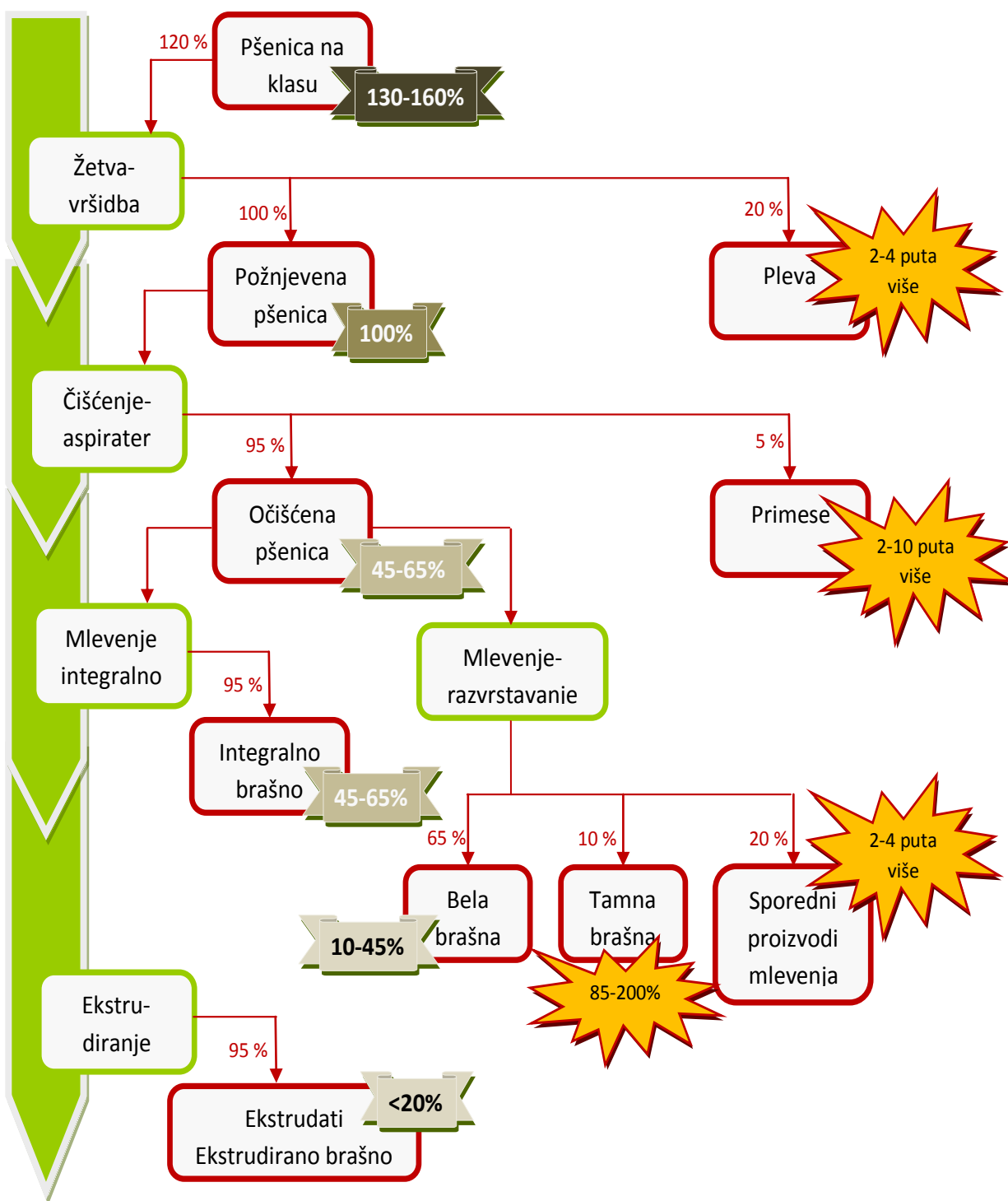
- najučestaliji i u najvećim količinama prisutan u pšenici gajenoj na području Vojvodine kao najznačajnijeg žitorodnog regiona Srbije;
- bio prisutan u svim analiziranim uzorcima pšenice i većini analiziranih proizvoda prerade pšenice.

Za potrebe procene rizika u odabranim tačkama lanca proizvodnje i prerade pšenice pre čišćenja, dakle u stanju u kom u lancu proizvodnje, prometa i prerade pšenice prelazi iz domena poljoprivredne proizvodnje u domen skladištenja i prerade i gde se najčešće obavlja kontrola njenog kvaliteta i bezbednosti, definisana je kao pšenica sa polaznih 100% prisustva TeA.

Nadalje je za potrebe razvoja modela procene rizika od kontaminacije pšenice na njivi, kao i kontaminacije proizvoda prerade pšenice sa TeA na bazi svih analiziranih uzoraka proračunat opseg redukcije, odnosno stepena smanjenja koncentracije TeA u posmatranim proizvodima.

Takođe za svaki od posmatranih proizvoda je na bazi dobijenih rezultata i uobičajene tehnološke prakse definisan prinos koji je takođe za sve proizvode obračunat u odnosu na pšenicu pre čišćenja kao polazni materijal.

Ovako dobijene vrednosti korišćene su za izradu modela procene rizika kontaminacije pšenice i proizvoda prerade pšenice sa TeA koji je prikazan na Slici 5.18.



Legenda: xx % oznake prinosa posmatranih proizvoda u odnosu na pšenicu pre čišćenja

- Procenjena procentualna redukcija odnosno koncentracija TeA
- Procenjena koncentracija TeA u visokorizičnim proizvodima

Slika 5.18 - Model procene rizika kontaminacije pšenice i proizvoda prerade pšenice sa TeA

Razvijeni model ukazuje na to da je značajan udeo TeA koncentrisan u plevi koja štiti zrno pšenice, te se već u postupku vršidbe uklanja deo ovog toksina iz pšenice. Pri tome sadržaj TeA u plevi je višestruko veći nego u zrnenoj masi, što treba imati u vidu u slučaju bilo kakvih nastojanja da ovaj sporedni proizvod nađe prehrambenu namenu.

Procesom izdvajanja primesa iz pšenice uz primenu metoda odvajanja lakših primesa strujom vazduha, kao i odvajanja sitnih primesa metodom razdvajanja zrnene mase po veličini sadržaja TeA u čistoj zrnenoj masi se redukuje na 45 do 65% od polazne koncentracije u neočišćenju pšenici.

Ovaj podatak alarmantno potvrđuje bojazan potrošača kada je u pitanju prerada pšenice u integralna brašna u malim zanatskim pogonima koji ne raspolažu adekvatnim postrojenjima za čišćenje zrnene mase. U izdvojenim nečistoćama koncentracija TeA može biti i do 10 puta veća nego u polaznoj pšenici, što treba imati u vidu u slučaju korišćenja primesa izdvojenih u procesu silosnog i mlinskog čišćenja kao hrane za životinje.

Savremenim procesom mlevenja pšenice na mlinskim valjcima praćenim razvrstavanjem mliva, koji obezbeđuje efikasno odvajanje anatomskih delova zrna po frakcijama mlevenja u belim brašnima, koja čine najveći deo finalnog proizvoda mlevenja, udeo TeA se redukuje na nivo od 10 do 45% od polazne koncentracije u pšenici pre čišćenja, te se bela brašna mogu smatrati relativno bezbednim proizvodima kada je u pitanju kontaminacija sa TeA.

Međutim, u tamnim brašnima TeA se koncentruje, te se za proizvodnju ovih, nutritivno vrednijih proizvoda mlevenja pšenice mora koristiti isključivo pšenica u kojoj je utvrđeno odsustvo rizičnih koncentracija TeA.

U sporednim proizvodima mlevenja pšenice, mekinjama i osevcima, TeA je prisutna u 2 do 4 puta većim koncentracijama nego u polaznoj pšenici pre čišćenja.

S obzirom na to da se ovi proizvodi po pravilu koriste kao hrana za životinje ovaj podatak treba da izazove interesovanje i pažnju stručnjaka koji se bave ishranom životinja i bezbednošću hrane za životinje. Sa aspekta proizvoda za ljudsku potrošnju posebno je značajno da se za proizvodnju mekinja za ljudsku ishranu koristi isključivo pšenica bez prisustva TeA.

Procesom ekstrudiranja brašna, uz primenu optimalnih procesnih parametara može se postići redukcija TeA na nivo ispod 20% od polazne koncentracije u neočišćenoj pšenici, te se ovaj postupak praćen proizvodnjom ekstrudiranih brašna, može preporučiti kao adekvatan za smanjanje rizika od prisustva rizičnih koncentracija TeA u integralnim brašnima.

6. Zaključak

Sprovedena istraživanja i analiza dobijenih rezultata upućuju na sledeće zaključke vezane za prisustvo i mogućnosti redukcije koncentracije *Alternaria* toksina u pšenici:

*

- Analiza učestalosti incidencije *Alternaria* toksina u pšenici sa područja Vojvodine ukazuje na evidentnu pojavu značajnog broja partija pšenice kontaminirane sa TeA, praćenu sporadičnom pojavom partija kontaminiranih sa AOH i AME.
- Kako su prosečne, tako i maksimalne koncentracije TeA u pšenici iz Vojvodine proizvedene u trogodišnjem periodu od 2011. do 2013. godine bile više od zvanično objavljenih višegodišnjih podataka od strane Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA). Utvrđene koncentracije AME i AOH u pšenici iz Vojvodine su bile daleko niže od koncentracije TeA kao najčešćeg kontaminanta iz grupe *Alternaria* toksina.
- Preliminarno ima indicija da se najviše, visoke koncentracije ispitivanih *Alternaria* toksina u pšenici iz pojedinih proizvodnih godina i iz najugroženijih regiona mogu povezati sa višim prosečnim dnevnim temperaturama sa jedne i povećanom sumom padavina u maju i junu sa druge strane, u odnosu na dugogodišnji prosek (1981-2010).
- Inokulacija pšenica sa *Alternaria tenuissima* dovela je do povećanja koncentracije TeA u zrnoj masi u odnosu na netretiranu pšenicu, dok je tretman iste pšenice fungicidom uticao na smanjenje prisustva ovog *Alternaria* toksina, što ukazuje da infekcija prodire u zrno u većem obimu kod inokulisanih uzoraka pšenice, dok je u netretiranim i zaštićenim manje izražena.

**

- Na bazi dobijenih rezultata nije bilo moguće potvrditi povezanost prisustva i koncentracije *Alternaria* toksina u pšenici sa udelom tamnokličinih zrna kao vizuelnom manifestacijom infekcije pšenice gljivama iz roda *Alternaria*.

- Koncentracija *Alternaria* toksina u plevi pšenice bila je značajno viša u odnosu na zrnenu masu ovršene pšenice, što ukazuje na izvesnu zaštitnu funkciju pleve od prodiranja *Alternaria* toksina u unutrašnji deo endosperma zrna pšenice.
- Primenom postupaka čišćenja pšenice uobičajenih u praksi rada silosne i mlinske čistione postiže se značajna redukcija prisustva svih ispitivanih *Alternaria* toksina u zrnoj masi.
- U postupku mlinske prerade pšenice, čak i u slučaju prerade pšenice u kojoj je udeo *Alternaria* toksina ispod granice detekcije u frakcijama mlevenja pšenice u koje dospevaju periferni delovi pšeničnog zrna, odnosno kasnijim prolazištima krupljenja i mlevenja, kao i sporednim proizvodima meljave, može se očekivati povišen sadržaj *Alternaria* toksina.
- Frakcije brašna dobijene mlevenjem pšenice i razvrstavanjem mliva su se međusobno u velikoj meri i statistički značajno razlikovale u pogledu sadržaja *Alternaria* toksina, što upućuje na tehnološku mogućnost redukcije i upravljanja sadržajem *Alternaria* toksina u finalnim proizvodima mlevenja, uključivanjem frakcija mlevenja sa niskim sadržajem *Alternaria* toksina u kompoziciju finalnih proizvoda i odbacivanjem frakcija sa povišenim sadržajem *Alternaria* toksina.
- Analizom kumulativnih krivih *Alternaria* toksina u proizvodima mlevenja i klaster analizom utvrđenih koncentracija *Alternaria* toksina u frakcijama mlevenja zaključeno je da se odvajanjem belih brašna uz svesno izbegavanje povećanja prinosa brašna dodavanje frakcija dobijenih na zadnjim prolazištima krupljenja i mlevenja može dobiti finalni proizvod – belo brašno, sa tehnološki prihvatljivim prinosom u kom je koncentracija *Alternaria* toksina u odnosu na polaznu sirovinu višestruko redukovana.
- Primenom postupka ekstrudiranja može se postići višestruko smanjenje koncentracije *Alternaria* toksina u ekstrudiranim proizvodima u odnosu na polazno pšenično brašno, pri čemu stepen redukcije prisustva *Alternaria* toksina zavisi od procesnih parametara ekstrudiranja.
- Optimalni efekti procesa ekstrudiranja u slučaju korišćenja jednopužnog ekstrudera ostvareni su u slučaju visoke vlage polaznog materijala ($w=24\%$) velike brzine protoka materijala ($q=25$ kg/h) i srednje brzine obrtanja puža ekstrudera ($v=390$ obrtaja/minut) pri čemu je postignuta redukcija $TeA=60-65\%$, $AOH=90\%$ i $AME=95\%$.

- U lancu proizvodnje, prometa, skladištenja i prerade pšenice kao proizvodi sa niskim rizikom u pogledu pojave i koncentracije *Alternaria* toksina mogu se istaći bela brašna i hidrotermički obrađeni proizvodi, kao što su na primer ekstrudirani proizvodi od pšenice.
- Kao proizvodi visokog rizika u pogledu pojave i koncentracije *Alternaria* toksina ističu se pleva dobijena tokom žetve pšenice, nečistoće dobijene u procesu silosnog postupka čišćenja pšenice, tamne frakcije brašna dobijene u postupku mlevenja pšenice i sporedni proizvodi mlevenja pšenice – mekinje i osevci.

7. Literatura

- Abbas, H. K., Mirocha, C. J., Pawlosky, R. J., Pusch, D. J. (1985). Effect of cleaning, milling, and baking on deoxynivalenol in wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 482-486.
- AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final, mars, 308.
- Alldrick, A. J. (1996). The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. *Food Additives and Contaminants*, 13, 27.
- An, Y. H., Zhao, T. Z., Miao, J., Liu, G. T., Zheng, Y. Z., Xu, Y. M., Van Etten, R. (1989). Isolation, identification and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1341-1343.
- Andersen, B., Frisvad, J. C. (2004). Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7507-7513.
- Ansari, A. A., Shrivastava, A. K., (1990). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in sorghum and ragi from North Bihar, India. *Food Additives and Contaminants*, 7(6), 815-820.
- Asam, S., Konitzer, K., Schieberle, P., Rychlik, M. (2009). Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5152-5160.
- Asam, S., Konitzer, K., Rychlik, M. (2011). Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays. *Mycotoxin Research*, 27(1), 23-28.
- Asam, S., Lichtenegger, M., Muzik, K., Liu, Y., Frank, O., Hofmann, H., Rychlik M. (2013). Development of analytical methods for the determination of tenuazonic acid analogues in food commodities. *Journal of Chromatography A*, 1289, 27-36.
- Azcarate, M. P., Patriarca, A., Terminiello, L., Pinto, V. F. (2008). *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *Journal of Food Protection*, 71(6), 1262-1265.
- Bagi, F., Balaž, F., Stojšin, V., Nemet, A. (2004). Mikopopulacija semena strnih žita u 2003. godini. *Žito-hleb*, 31(3), 75-82.

- Bagi, F., Stojšin, V., Balaž, F. (2005). Cereal seed mycopopulations in Serbia. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, 108, 189-195.
- Balaž, F., Bagi, F., Škrinjar, M., Stojšin, V. (2003). Mikopopulacija semena strnih žita u 2002. godini. *Žito-hleb*, 30(4-5), 149-155.
- Balaž, F., Bodroža, M., Zečević, T. Uticaj hemijske zaštite na elemente prinosa, tehnološki kvalitet i štetnu mikofloru semena i nekih sorti pšenice. VII Savetovanja o zaštiti bilja Soko Banja, 15 - 18. novembar 2005. godine, Zbornik rezimea radova, 32-33.
- Balaž, F., Balaž, J., Tošić, M., Stojšin, V., Bagi, F. (2010). Fitopatologija, Bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Barkai-Golan, R. (2008). *Alternaria* mycotoxins. In: Mycotoxins in fruits and vegetables (Barkai-Golan, R., Paster, N., eds.), pp. 185-204, Elsevier, San Diego, CA, USA.
- Battilani, P., Costa, L. G., Dossena, A., Gullino, M. L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D., Gualla, A. (2009). Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. Chapter 3 - *Alternaria* mycotoxins in food and feed, 128-174. Dostupno na: (<http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/scdoc/24e.htm>).
- Bennett, G. A., Richard, J. L., Eckhoff, S. R. (1996). Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. In: Fumonisin in Food (Jackson, L.S., De Vries, J.W., Bullerman, L.B. eds.), pp. 317-322, Plenum, New York, USA.
- Bensassi, F., Zid, M., Rhouma, A., Bacha H., Hajlaoui, M. R. (2009). First report of *Alternaria* species associated with black point of wheat in Tunisia. *Annals of Microbiology*, 59(3), 465-467.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krska, R. (2005). Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1062(2), 209-216.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G., Krska, R. (2009). Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1243-1252.
- Berthiller, F., Burdaspal, P.A., Crews, C., Iha, M.H., Krska, R., Lattanzio, V.M.T., MacDonald, S., Malone, R. J., Maragos, C., Solfrizzo, M., Stroka, J., Whitaker, T. B. (2014). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. *World Mycotoxin Journal*, 7(1), 3-33.
- Betina, V. (1993). *Alternaria* toxins. In: Chromatography of mycotoxins: Techniques and applications. (Betina. V. eds.), pp. 396-397, Elsevier, Amsterdam.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2003): Stellungnahme des BfR vom 30. Juli 2003: *Alternaria* Toxine in Lebensmitteln. http://www.bfr.bund.de/cm/208/alternaria_toxine_in_lebensmitteln.pdf.
- Bhat, R., Rai, R. V., Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57-81.

- Bočarov - Stančić, A. (1996). Uticaj ekoloških i drugih faktora na rasprostranjenost plesni i mikotoksina u žitaricama i mogućnost njihove dekontaminacije. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu.
- Bodroža-Solarov, M., Brkljača, J., Vučković, J., Balaž, F. (2012). Changes in technological quality of winter wheat with different intensity of *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. contamination. In *Proceedings of 15th International Feed Technology Symposium „Feed-to-Food/Cost Feed for Health joint Workshop* (pp. 366-370).
- Bottalico, A., Logrieco, A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. (Sinha, K.K., Bhatnager, D. eds.), pp. 65-108, Marcel Dekker, New York, USA.
- Boudra, H., Le Bars, P., Le Bras, J. (1995). Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1156-1158.
- Brera, C., Debegnach, F., Grossi, S., Miraglia, M. (2004). Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B1 in dry milling corn fractions. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1261-1266.
- Broggi, L. E., González, H. H., Resnik, S. L., Pacin, A. (2007). *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(1), 47-51.
- Brugger, E. M., Wagner, J., Schuhmacher, D. M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M., Lehmann, L. (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, 164(3), 221-230.
- Burkhardt, B., Pfeiffer, E., Metzler, M. (2009). Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells in vitro. *Mycotoxin Research*, 25(3), 149-157.
- Burkin, A. A., Kononenko, G. P. (2011). Enzyme immunoassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(1), 72-76.
- Castelo, M. M., Sumner, S. S., Bullerman, L. B. (1998). Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *Journal of Food Protection*, 61(8), 1030-1033.
- Castelo, M. M., Jackson, L. S., Hanna, M. A., Reynolds, B. H., Bullerman, L. B. (2001). Loss of fumonisin B1 in extruded and baked corn-based foods with sugars. *Journal of Food Science*, 66(3), 416-421.
- Cazzaniga, D., Basílico, J. C., González, R. J., Torres, R. L., de Greef, D. M. (2001). Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 144-147.
- Chelkowski, J., Golinski, P., Szebiotko, K. (1980). Mycotoxins in cereal grain. Part II. The fate of ochratoxin A after processing of wheat and barley grain. *Die Nahrung*, 25(5), 423-426.
- Chelkowski, J., Visconti, A. (1992). *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

- Chulze, S. N., Torres, A. M., Dalcero, A. M., Etcheverry, M. G., Ramírez, M. L., Farnochi, M. C. (1995). *Alternaria* mycotoxins in sunflower seeds: incidence and distribution of toxins in oil and meal. *Journal of Food Protection*, 58(10), 1133-1135.
- Corden, J., Millington, W., Mullins, J. (2003). Long-term trends and regional variation in the aeroallergen *Alternaria* in Cardiff and Derby UK – are differences in climate and cereal production having an effect. *Aerobiologia*, 19(3-4), 191-199.
- CSCF (Czech Scientific Committee on Food of the Czech Republic) (2008). Dostupno na: http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/info_2007_24_deklas_AL_T.pdf
- Da Motta, S., Soares, L. M. V. (2000a). A method for the determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 315-320.
- Da Motta, S. I. L. V. A. N. A., Soares, L. M. V. (2000b). Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. *Food Chemistry*, 71(1), 111-116.
- Da Motta, S., Soares, L. M. V. (2001). Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Additives and Contaminants*, 18(7), 630-634.
- Dalcero, A. A., Chulze, S., Etcheverry, M., Farnochi, C., Varsavsky, E. (1989). Aflatoxins in sunflower seeds: influence of *Alternaria alternata* on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 108(1), 31-35.
- De Linares, C., Belmonte, J., Canela, M., de la Guardia, C.D., Alba-Sanchez, F., Sabariego, S., Alonso-Pérez, S. (2010). Dispersal patterns of *Alternaria* conidia in Spain. *Agricultural and Forest Meteorology*, 150(12), 1491-1500.
- Delgado, T., Gómez-Cordovés, C., Scott, P. M. (1996). Determination of alternariol and alternariol methyl ether in apple juice using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 731(1), 109-114.
- Delgado, T., Gomez-Cordoves, C. (1998). Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, 815(1), 93-97.
- Delwiche, S. R., Pearson, T. C., Brabec, D. L. (2005). High-speed optical sorting of soft wheat for reduction of deoxynivalenol. *Plant Disease*, 89(11), 1214-1219.
- Desphande, S. S., (2002). Fungal Toxins. In: Handbook of food toxicology (Desphande S.S., eds.), pp. 387-456, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Diana Di Mavungu, J., Monbaliu, S., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C., De Saeger, S. (2009). LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. *Food Additives and Contaminants*, 26(6), 885-895.
- Dong, W. H., Zheng, Z. M., Liu, G. T., Lin, D., Xiu, D. S., Ma, J. Q. (1993). Studies on the point mutation of c-Haras gene of human fetal esophageal epithelium induced by the mycotoxins of *Alternaria alternata*. *Journal of Henan Medical University*, 3, 30-34.

- Edwards, S. G., Dickin, E. T., MacDonald, S., Buttler, D., Hazel, C. M., Patel, S., Scudamore, K. A. (2011). Distribution of *Fusarium* mycotoxins in UK wheat mill fractions. *Food Additives and Contaminants Part A - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 28(12), 1694-1704.
- EFSA on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*; 9(10), 2407. Dostupno na: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- El-Aal, S. S. A. (1997). Effects of gamma radiation, temperature and water activity on the production of *Alternaria* mycotoxins. *Egyptian Journal of Microbiology*, 32, 379-396.
- European Commission (2002). Commission Regulation 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221, 8-36.
- European Commission. (2006). Commission Regulation 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L, 70, 12-34.
- European Commission (2006). Commission Regulation 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5-18.
- European Commission (2007). Commission Regulation 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*, L 255, 14-17.
- European Commission (2013). Commission recommendation 165/2013 of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of the European Union*, L 91, 12-15.
- European Committee for Standardization (CEN), (2013). Call for tenders for project leaders for the development of standardized methods for the analysis of mycotoxins in food. CEN, Brussels, Belgium. Available at: ftp://ftp.cen.eu/CEN/Sectors/List/Food/Call_520.pdf.
- Fàbrega, A., Agut, M., Calvo, M. A. (2002). Optimization of the method of detection of metabolites produced by the *Alternaria* genus: alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene, altertoxin I and tentoxin. *Journal of Food Science*, 67(2), 802-806.
- Fehr, M., Baechler, S., Kropat, C., Mielke, C., Boege, F., Pahlke, G., Marko, D. (2010). Repair of DNA damage induced by the mycotoxin alternariol involves tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Mycotoxin Research*, 26(4), 247-256.
- Fente, C. A., Jaimez, J., Vázquez, B. I., Franco, C. M. Cepeda, A. (1998). Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst*, 123(11), 2277-2280.

- Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., Tadeo, J. L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1(2), 113-122.
- Fleck, S. C., Burkhardt, B., Pfeiffer, E., Metzler M. (2012). *Alternaria* toxins: altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, 214(1), 27-32.
- Fox, E. M., Howlett B. J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 481-487.
- Grabarkiewicz-Szczęsna, J., Chelkowski, J., Zajkowski, P. (1989). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in the grain and chaff of cereals. *Mycotoxin Research*, 5(2), 77-80.
- Gross, M., Curtui, V., Ackermann, Y., Latif, H., Usleber E. (2011). Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12317- 12322.
- Hajslova, J., Zachariasova, M., Cajka, T. (2011). Analysis of multiple mycotoxins in food. In: *Mass Spectrometry in Food Safety: Methods and Protocols*, (Zweigenbaum, J., eds.), pp.233-258, Humana Press/ Springer Science+Business Media, New York, USA.
- Hasan, H. A. H. (1995). *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit, Conditions and regulation of their production. *Mycopathologia*, 130(3), 171-177.
- Herebian, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., Spiteller, M. (2009). Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. *Journal of Separation Science*, 32(7), 939-948.
- HGCA Cereal Disease Encyclopedia: Black Point.[online] Available from URL: <http://www.hgca.com/>.
- Horiuchi, M., Akimoto, N., Ohnishi, K., Yamashita, M., Maoka, T. (2003). Rapid and simultaneous determination of tetra cyclic peptide phytotoxins, tentoxin, isotentoxin and dihydrotentoxin, from *Alternaria porri* by LC/MS. *Chromatography*, 24(3), 109- 116.
- Horiuchi, M., Ohnishi, K., Yamashita, M., Maoka, T. (2004). LC/PAD/APCI-MS for the characterization and analysis of porritoxin and its related compounds from *Alternaria porri*. *Chromatography*, 25(2), 55-59.
- <http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org>
- <http://www.cropt.north.local-host.info>
- http://www.fao.org/ag/agn/agns/chemicals_mycotoxins_en.asp
- <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri336.htm>
- Hu, D., Liu, M., Xia, X., Chen, D., Zhao, F., Ge, M. (2008). Preparative isolation and purification of altertoxin I from an *Alternaria* sp. by HSCCC. *Chromatographia*, 67(11-12), 863-867.

- Hudec, K. (2007). Influence of harvest date and geographical location on kernel symptoms, fungal infestation and embryo viability of malting barley. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 125–132.
- Hussein, H. S., Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134.
- ICC. (1972). Standard method No. 102/1, Determination of besatz of wheat. (https://www.icc.or.at/standard_methods/102.1)
- Iglesias, I., Rodríguez-Rajo, F. J., Méndez, J. (2007). Evaluation of the different *Alternaria* prediction models on a potato crop in A Limia (NW of Spain). *Aerobiologia*, 23(1), 27-34.
- International Agency for Research on Cancer, IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 56. World Health Organization, IARC, Lyon, France, 19–23.
- International Agency for Research on Cancer, IARC (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 82. World Health Organization, IARC, Lyon, France. 171.
- International Agency for Research on Cancer, IARC (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1-104.
- International Organization for Standardization (2009). Cereals and cereal products Determination of moisture content – Reference method. ISO 712:2009. Geneva, Switzerland.
- Ivanović, M., Martić, M., Đurić, N., Dragović, G. (2001). The most common wheat disease in the conditions of Pančevački rit. *Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik*, 7(1), 27-31.
- Ivanović, M., Koprivica, M., Milijašević, S., Dukić, N., Duduk, B. (2004). Molecular methods in plant disease diagnosis. *Pesticides and Phytomedicine*, 19, 223-231.
- Jackson, L. S., Hlywka, J. J., Senthil, K. R., Bullerman, L. B., Musser, S. M. (1996a). Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B1 in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 906–912.
- Jackson, L. S., Hlywka, J. J., Senthil, K. R., Bullerman, L. B. (1996b). Effects of thermal processing on the stability of fumonisin B2 in an aqueous system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 1984–1987.
- Janardhanan, K. K., i Husain, A. (2008). Phytotoxic Activity of Tenuazonic Acid Isolated from *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler Causing Leaf Blight of *Datura innoxia* Mill and its Effect on Host Metabolism. *Journal of Phytopathology*, 111(3-4), 305-311.
- Janić Hajnal, E., Orčić, D., Mastilović, J., Milovanović, I., Kos, J. (2014a). The choice of preparation method for the determination of *Alternaria* toxins from wheat samples by LC-MS/MS. *Food&feed research*, 41(2), 131-138.

- Janić Hajnal, E., Belović, M., Plavšić, D., Mastilović, J., Bagi, F., Budakov, D., Kos, J. (2014b). Possibilities of visual and instrumental identification of wheat infection with field fungi. II International congress „Food Technology, Quality and Safety”, 28-30.10.2014., Novi Sad, Serbia. Proceedings II International congress „ Food Technology, Quality and Safety”, 337-342.
- Janić Hajnal, E., Orčić, D., Torbica, A., Kos, J., Mastilović, J., Škrinjar, M. (2015). *Alternaria* toxins in wheat from Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: A preliminary survey. *Food Additives and Contaminants*, DOI 10.1080/19440049.2015.1007533.
- Jevtić, R., Telečk, M., Malešević, M. Opravdanost primene fungicida u usevima strnih žita. IX Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24 - 30. novembar 2008. godine, Zbornik rezimea radova, 13-15.
- Kada, T., Sadaie, Y., Sakamoto, Y. I. (1984). *Bacillus subtilis* repair test. In: Handbook of Mutagenicity test procedures. (Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel C., 2nd eds.), pp. 13-31, Elsevier Science, Publishers, Amsterdam.
- Katta, S. K., Cagampang, A. E., Jackson, L. S., Bullerman, L. B. (1997). Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in dry-milled corn fractions. *Cereal Chemistry*, 74(6), 858-863.
- Katta, S. K., Jackson, L. S., Sumner, S. S., Hanna, M. A., Bullerman, L. B. (1999). Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B1 in extrusion-cooked corn grits. *Cereal Chemistry*, 76(1), 16-20.
- Kilic, M., Altintas, U., Yilmaz, M., Kendirli, G., Karakoc, B., Taskin, E., Ceter, T., Pinar, N. M. (2010). The effects of meteorological factors and *Alternaria* spore concentrations on children sensitised to *Alternaria*. *Allergologia et Immunopathologia*, 38(3), 122-128.
- Klaffke, H. (2010). Biotoxine und herstellungsbedingte Kontaminanten. In: Handbuch für Lebensmittelchemiker (Frede, W., eds.), pp.449-489, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Klaustermeyer, W. B., Bardana, E. J., Hale, F. C. (2006). Pulmonary hypersensitivity to *Alternaria* and *Aspergillus* in baker's asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 7(3), 227-223.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1595-1612.
- Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., Andersen, B., (2004). *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality: a matched pair sample study. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 51-62.
- Krnjaja, V., Lević, J., Tomić, Z., Nešić, Z., Stojanović, Lj., Trenkovski, S. (2007). Dinamika pojave i učestalosti populacija *Fusarium* vrsta na uskladištenom zrnu kukuruza. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23(5-6-1), 589-600.
- Krnjaja V. Stanković S., Lević J. (2011). Prisustvo toksigenih *Fusarium* vrsta i fuzariotoksina deoksinivalenola i zearalenona u ozimjoj pšenici. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(1), 63-73.

- Kütt, M. L., Lõiveke, H., Tanner, R. (2010). Detection of alternariol in Estonian grain samples. *Agronomy Research* 8 (Special Issue II), 317-322.
- Kwasna, H., Kosiak, B. (2003): *Lewia avenicola* sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *Mycol Research*, 107(03), 371-376.
- Laemmlen, F. (2001). *Alternaria* diseases. ANR Publication 8040, University of California. Dostupno na: <http://anrcatalog.ucdavis.edu>.
- Lancova, K., Hajslova, J., Kostelanska, J., Kohoutkova, J., Moravcova, H., Vanova, M. (2008). Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking. *Food Additives and Contaminants*, 25(25), 650-659.
- Lau, B. P. Y., Scott, P. M., Lewis, D. A., Kanhere, S. R., Cléroux, C., Roscoe, V. A. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *Journal of Chromatography A*, 998(1), 119-131.
- Lauren, D. R., Ringrose, M. A. (1997). Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Additives and Contaminants*, 14(59), 435-443.
- Lawley, R. (2009). *Alternaria* Toxins. Dostupno na: www.micotoxinas.com.br.
- Lehmann, L., Esch, H., Wagner, J., Rohnstock, J., Metzler, M. (2005). Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of daidzein in cultured human Ishikawa cell. *Toxicology Letters*, 158(1), 72-86.
- Lehmann, L., Wagner, J., Metzler, M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 398-408.
- Lehmensiek, A., Campbell, A. W., Williamson, P. M., Michalowitz, M., Sutherland, M. W., Daggard, G. E. (2004). QTLs for black-point resistance in wheat and the identification of potential marker for use in breeding programmes. *Plant breeding*, 123(5), 410-416.
- Lević, J., Kovačević, T., Vukojević, J., Stanković, S. Mikrobiota semena sirka. IX Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24 - 30. novembar 2008. godine, Zbornik rezimea radova, 48-49.
- Lević, J., Stanković, S., Krnjaja, V., Bočarov-Stančić, A., Ivanović D. (2012). Pojava i učestalost patogenih semena žita i industrijskih biljaka u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 27(1), 33-40.
- Li, F.Q., Yoshizawa, T. (2000). *Alternaria* mycotoxins in weathered wheat from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2920-2924.
- Linass, M. D., Morassin, B., Recco, P. (1998). Actualités sur *Alternaria*: écologie, Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. *Journées Nationales de la Société Française D'allergologie et D'immunologie Clinique*, 38 (4), 349-355.
- Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, W. H., Qi, Y. M., Guo, H. T. (1992): Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105(5), 394-400.

- Liu, Y., Rychlik, M. (2013). Development of a stable isotope dilution LC-MS/MS method for the *Alternaria* toxins tentoxin, dihydrotentoxin and isotentoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(12), 2970-2978.
- Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2(2), 129-140.
- Lohrey, L., Marschik, S., Cramer, B., Humpf, H.-U. (2012). Large-scale synthesis of isotopically labeled ¹³C₂-tenuazonic acid and development of a rapid HPLC-MS/MS method for the analysis of tenuazonic acid in tomato and pepper products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 114-120.
- Lyons, T. W., Wakefield, D. B., Cloutier, M. M. (2011). Mold and *Alternaria* skin test reactivity and asthma in children in Connecticut. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, 106(4), 301-307.
- Madamba, P. S. (2002). The Response Surface Methodology: An Application to optimize dehydration operations of selected agricultural crops. *LWT-Food Science and Technology*, 35(7), 584-592.
- Madden, L., Pennypacker, S. P., MacNab, A. A. (1978). FAST, a forecast system for *Alternaria solani* on tomato. *Phytopathology*, 68(9), 1354-1358.
- Magan, N. A. R. E. S. H., Cayley, G.R., Lacey, J. (1984). Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5), 1113-1117.
- Magan, N., Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 131-139.
- Magnani, R. F., De Souza, G. D., Rodrigues-Filho, E. (2007). Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of *Alternaria* brown spot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 4980-4986.
- Mansfield, M. A., Archibald, D. D., Jones, A. D., Kuldau, G. A. (2007). Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions, and agronomic and ensiling practices. *Phytopathology*, 97(4), 504-511.
- Mašková, Z., Tančinová, D., Barboráková, Z., Felšöciová, S., Cíсарová, M. (2012). Comparison of occurrence and toxigenity of *Alternaria* spp. isolated from samples of conventional and new crossbred wheat of Slovak origin. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 1, 552-562.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019-3030.
- Matysik, G., Giryń, H. (1996). Gradient thin-layer chromatography and densitometry determination of *Alternaria* mycotoxins. *Chromatographia*, 42(9-10), 555-558.
- Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J. V, Mateo, F., Jiménez, M. (2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the

- mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 196–203.
- Mercado Vergnes, D. M., Renard, M. E., Duveiller, E., Maraite, H. (2006). Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology*, 55(4), 485–493.
- Molina, P. G., Zon, M. A., Fernandez, H. (2002). The electrochemical behavior of the altenuene mycotoxin and its acidic properties. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 520(1-2), 94-100.
- Monbaliu, S., Van Poucke, C., Van Peteghem, C., Van Poucke, K., Heungens, K., De Saeger, S. (2009). Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(1), 3-11.
- Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E., Van Dyck, S., Averkieva, O., Van Peteghem, C., De Saeger, S. (2010). Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 66-71.
- Montgomery, D. C. (1984). *Design and Analysis of Experiments*, 2nd ed., John Wiley and Sons Inc., New York, USA.
- Moressi, M. B., Andreu, R., Calvente, J. J., Fernandez, H., Zon, M. A. (2004). Improvement of alternariol monomethyl ether detection at gold electrodes modified with a dodecanethiol self-assembled monolayer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 570(2), 209-217.
- Moschini, R. C., Sisterna, M. N., Carmona, M. A. (2006). Modelling of wheat black point incidence based on meteorological variables in the southern Argentinian Pampas region. *Crop and Pasture Science*, 57(11), 1151-1156.
- Müller, H. M., Korn, U. (2013). *Alternaria* mycotoxins in wheat - A 10 year survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 34(1), 191–197.
- Neuhof, T., Koch, M., Rasenko, T., Nehls, I. (2008a). Occurrence of zearalenone in wheat kernels infected with *Fusarium culmorum*. *World Mycotoxin Journal*, 1(4), 429-435.
- Neuhof, T., Koch, M., Rasenko, T., Nehls, I. (2008b). Distribution of trichothecenes, zearalenone, and ergosterol in a fractionated wheat harvest lot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7566-7571.
- Noser, J., Schneider, P., Rother, M., Schmutz, H. (2011). Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. *Mycotoxin research*, 27(4), 265-271.
- Osborne, L. C., Jones, V. I., Peeler, J. T., Larkin, E. P. (1988). Transformation of C3H/10T $\frac{1}{2}$ cells and induction of EBV-early antigen in Raji cells by altertoxins I and III. *Toxicology in Vitro*, 2(2), 97-102.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1(1), 175-188.

- Oviedo, M. S., Ramirez, M. L., Barros, G. G., Chulze, S. N. (2009). Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1186-1192.
- Oviedo, M. S., Ramirez, M. L., Barros, G. G., Chulze, S. N. (2011). Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 127-132.
- Ozcelik, S., Ozcelik, N., Beuchat, L. R. (1990). Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Food Microbiology*, 11(3), 187-194.
- Park, D. L. (2002). Effect of processing on aflatoxin. In *Mycotoxins and Food Safety* (DeVries, J. W., Trucksess, M. W., Jackson, L. S., eds.), pp. 173-179, Springer Science – Business Media, New York, USA.
- Pascale, M., Haidukowski, M., Lattanzio, V. M. T., Silvestri, M., Ranieri, R., Visconti, A. (2011). Distribution of T-2 and HT-2 toxins in milling fractions of durum wheat. *Journal of Food Protection*, 74(10), 1700-1707.
- Patriarca, A., Azcarate, M. P., Terminiello, L., Fernández Pinto, V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 219-222.
- Pavón, M. A., González, I., Pegels, N., Martín, R., García, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control*, 21(12), 1745-1756.
- Perellò, A. E., Sisterna, M. N. (2006). Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. *Plant Pathology*, 55(2), 303 (www.bspp.org.uk/NDR/july2005/2005-35.asp).
- Perellò, A. and Mónaco, C. (2007). Status and Progress of Biological Control of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Foliar Diseases in Argentina. *Fitosanidan*, 11 (2), 85-105.
- Pfeiffer, E., Schebb, N. H., Podlech, J., Metzler, M. (2007a). Novel oxidative metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(3), 307-316.
- Pfeiffer, E., Eschbach, S., Metzler, M. (2007b). *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells in vitro. *Mycotoxin Research*, 23(3), 152-157.
- Pfeiffer, E., Schmit, C., Burkhardt, B., Altemöller, M., Podlech, J., Metzler, M. (2009). Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in vitro: chemical structures of glucuronides and activities of human UDPglucuronosyltransferase isoforms. *Mycotoxin Research*, 25(1), 3-10.
- Pineda-Valdes, G., Bullerman, L. B. (2000). Thermal stability of moniliformin at varying temperature, pH, and time in an aqueous environment. *Journal of Food Protection*, 63(11), 1598-1601.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3th edition, pp. 1-485, Springer Science – Business Media, New York, USA.

- Pollock, G. A., DiSabatino, C. E., Heimsch, R. C., Coulombe, R. A. (1982). The distribution, elimination, and metabolism of ¹⁴C-alternariol monomethyl ether. *Journal of Environmental Science and Health B*, 17(2), 109-124.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A. A., Fernández Pinto, V. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), 348-353.
- Prasada, R., Prabhu, A. S. (1962). Leaf blight of wheat caused by new species of *Alternaria triticina*. *Indian Phytopathology*, 15(3-4), 292-293.
- Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Službeni glasnik Republike Srbije broj 28/2011, ispravke 20/2013, 29/2014, 37/2014 – ispravka i 39/2014; 79/2014).
- Prelusky, D. B., Rotter, B. A., Rotter, R. G. (1993). Toxicology of mycotoxins. In: *Mycotoxins in grains, compounds other than aflatoxin*. (Miller, J. D., Trenholm, H. L., eds.) pp. 359-404, Eagan Press, St.Paul, Minnesota, USA.
- Prescott, J. M, Burnett, P. A., Saari, E. E., Ransom, J., Bowman, J., de Milliano, W., Singh, R. P., Bekele, G.. (1986). *Wheat Diseases and Pests: A Guide for Field Identification*. Mexico, D.F.: CIMMYT. pp. 34-35. [online] Available from URL: <http://www.cimmyt.org/>.
- Pryor, B. M. (2011). *Alternaria* online, University of Arizona. Dostupno na: <http://ag.arizona.edu/PLP/alternaria/online/>.
- Rasmussen, R. R., Storm, I. M. L. D., Rasmussen, P. H., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F. (2010). Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(2), 765-776.
- Reinhold, L. and Bartels, I.,(2010). LC-MS/MS Determination of *Alternaria* Toxins in Vegetables and Fruit Beverages. Dostupno na: www.chem.agilent.com/Library/applications/SI-01322.pdf.
- Republički hidrometeorološki zavod Srbije.
<http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/agro.php>
- Rotem, J. (1994). *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. APS press, St Paul, MN, USA.
- Ryu, D., Hanna, M. A., Bullerman, L. B. (1999). Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1482-1484.
- Ryu, D., Jackson, L.S., Bullerman, L.B. (2002). Effects of processing on zearalenone. In *Mycotoxins and Food Safety* (DeVries, J. W., Trucksess, M. W., Jackson, L. S., eds.), pp. 205-216, Springer Science – Business Media, New York, USA.
- Ryu, D., Hanna, M. A., Eskridge, K. M., Bullerman, L. B. (2003). Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1746-1748.

- Samson, R. A., Frisvad, J. C. (2004). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, 49, 1-257.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. (2004). Introduction to Food and Airborne Fungi. Seventh edition, pp. 1-389, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Sanchis, V., Magan, N. (2004). Environmental profiles for growth and mycotoxin production. In *Mycotoxins in food: detection and control* (Magan, N., Olsen, M., eds.), pp. 174-189, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, U.K.
- Sauer, D., Seitz, L. M., Burroughs, R., Mohr, H., West, J., Milleret, R., Anthony, H. (1978). Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(6), 1380-1383.
- Schrader, T. J., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I. (2006). Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity in vitro. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 606(1), 61-71.
- Schroeder, H. W., Cole, R. J. (1977). Natural occurrence of alternariols in discolored pecans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(1), 204-206.
- Schuchardt, S., Ziemann, C., Hansen, T. (2014). Combined toxicokinetic and in vivo genotoxicity study on *Alternaria* toxins. EFSA supporting publication 2014:EN-679, 130 pp.
- Scott, P.M. (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47, 489-499.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R., Dexter, J. E., Brennan, P. W., Trenholm, H. L., (1984). Distribution of DON during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. *Food Additives and Contaminants*, 1(4), 313-323.
- Scott, P. M., Weber, D. A., Kanhere, S. R. (1997). Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 765(2), 255-263.
- Scott, P. M. (2001). Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *Journal of AOAC International*, 84(6), 1809-1817.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R. (2001). Stability of *Alternaria* toxins in fruit juices and wine. *Mycotoxin Research*, 17(1), 9-14.
- Scott, P. M., Lawrence, G. A., Lau, B. P. Y. (2006.) Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Research*, 22(2), 142-147.
- Scott, P. M., Zhao, W., Feng, S., Lau, B. P. Y. (2012). *Alternaria* toxins alternariol and alternariolmonomethyl ether in grain foods in Canada. *Mycotoxin Research*, 28(4), 261-266.
- Scudamore, K. A., Banks, J., MacDonald, S. J. (2003). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants*, 20(12), 1153-1163.

- Scudamore, K. A., Banks, J. N., Guy, R. C. E. (2004). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. *Food Additives and Contaminants*, 21(5), 488-497.
- Scudamore, K. A. (2008). Fate of *Fusarium* mycotoxins in the cereal industry: recent UK studies. *World Mycotoxin Journal*, 1(1), 315-323.
- Scudamore, K. A., Guy, R. C., Kelleher, B., MacDonald, S. J. (2008). Fate of the *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, during extrusion of wholemeal wheat grain. *Food Additives and Contaminants*, 25(3), 331-337.
- Semaskiene, R., Mankeviciene, A., Dabkevicius, Z., Leistrumaite, A., (2005). Toxic fungi infection and mycotoxin level in organic grain. *Botanica Lithuanica*, 7, 17-25.
- Shephard, G.S., Berthiller, F., Dorner, J., Krska, R., Lombaert, G.A., Malone, B., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., Trucksess, M.W., van Egmond, H.P., Whitaker, T.B. (2009). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007-2008. *World Mycotoxin Journal*, 2(1), 3-21.
- Shephard, G. S., Berthiller, F., Dorner, J., Krska, R., Lombaert, G.A., Malone, B., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., Trucksess, M.W., Van Egmond, H.P., Whitaker, T.B. (2010). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2008-2009. *World Mycotoxin Journal*, 3(1), 3-23.
- Shephard, G. S., Berthiller, F., Burdaspal, P., Crews, C., Jonker, M. A., Krska, R., MacDonald, S., Malone, B., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., van Egmond, H. P., Whitaker, T. B. (2011). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2009-2010. *World Mycotoxin Journal*, 4(1), 3-28.
- Shephard, G. S., Berthiller, F., Burdaspal, P. A., Crews, C., Jonker, M. A., Krska, R., MacDonald, S. (2012). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011, *World Mycotoxin Journal*, 5(1), 3-30.
- Shephard, G. S., Berthiller, F., Burdaspal, P. A., Crews, C., Jonker, M. A., Krska, R., Lattanzio, V. M. T., MacDonald, S., Malone, R. J., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., van Egmond, H.P., Whitaker, T. B (2013). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2011-2012. *World Mycotoxin Journal*, 6(1), 3-30.
- Shwab, E. K., Keller, N. P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, 112(2), 225-230.
- Siegel, D., Rasenko, T., Koch, M., Nehls, I. (2009). Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acids in cereals by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, 1216(21), 4582-4588.
- Siegel, D., Feist, M., Proske, M., Koch, M., Nehls, I. (2010a). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9622-9630.
- Siegel, D., Merkel, S., Koch, M., Nehls, I. (2010b). Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer. *Food Chemistry*, 120(3), 902-906.

- Siegel, D. (2011). Chemical Solutions to Current Issues in the Instrumental Quantification of Food Mycotoxins. PhD Dissertation, Faculty of Mathematics and Natural Sciences the Humboldt University of Berlin.
- Simmons, E. (2007). An Identification Manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands.
- Skarkova, J., Ostry, V., Prochazkova, I. Planar chromatographic determination of *Alternaria* toxins in selected foodstuffs. Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography, Milestones in Instrumental TLC, Siofok, Hungary, 29-31 May, 2005.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrots. *Journal of AOAC International*, 87(1), 101-106.
- Sommer, N. F. (1985). Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7(3), 331-339.
- Stack, M. E., Prival, M. J. (1986). Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxins I, II, and III. *Applied and environmental microbiology*, 52(4), 718-722.
- Stanković, S. Ž., Lević J. T., Krnjaja, V., S., Bočarov-Stančić, A. S., Tančić S. L., Kovačević T. M. (2007). Frequency of toxigenic *Fusarium* species and fusariotoxins in wheat grain in Serbia. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, (113), 93-102.
- STATISTICA (Data Analysis Software System) (2013). v. 12., Stat-Soft, Inc., USA (www.statsoft.com).
- Stennett, P. J., Beggs, P. J. (2004). *Alternaria* spores in the atmosphere of Sydney, Australia and relationships with meteorological factors. *International Journal of Biometeorology*, 49(2), 98-105.
- Stojanović, T. (1999). Kvalitet pšenice i brašna sa mikološkog i mikotoksikološkog aspekta. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Stojanović, M., Šarić M., Škrinjar M. (2002). Mikološka i mikotoksikološka slika i promene u biološkom i tehnološkom kvalitetu pšenice i brašna u zavisnosti od stepena infekcije. *Žito-hleb*, 29(4), 151-157.
- Stojanović, M., Šarić M., Psodorov, Đ., Škrinjar M. (2003). Mikološka i mikotoksikološka kontaminacija pšenice i njen uticaj na tehnološki kvalitet. *Žito-hleb*, 30(2), 57-63.
- Streit, E., Schwab, Ch., Suljok, M., Naehrer, K., Krska, R., Schatzmayr, G. (2013). Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins*, 5(3), 504-523.
- Sundström, A. (2010). Prediction models for the emergence of mycotoxins in grain, Biology Education Centre, Uppsala University, Sweden.
- Sydenham, E.W., Thiel, P. G., Marasas, W. F. (1988). Occurrence and chemical determination of zearalenone and alternariol monomethyl ether in sorghum-based mixed feeds associated with an outbreak of suspected hyperestrogenism in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(3), 621-625.

- Sydenham, E. W., Van der Westhuizen, L., Stockenström, S., Shepard, G. S., Thiel, P. G. (1994). Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. *Food Additives and Contaminants*, 11(1), 25-32.
- Šarić, M., Škrinjar, M., Dimić, G., Filipović, N., Rasić, J. (1997). Changes in hygienic and technological wheat quality caused by mould infection. *Acta Alimentaria*, 26(3), 255-269.
- Šarić, M., Vapa, Lj., Stojanović, T. Promene u biološkom kvalitetu pšenice kontaminirane plesnima. Treći jugoslovenski naučno-stručni simpozijum iz selekcije i semenarsva, Zlatibor, 28-01. jun 2000. godine, Zbornik izvoda, <http://www.dsss.org.rs/abstrakti/dsss-treci-simpozijum.htm#Rad101>.
- Šarić, M. D., Psodorov, Đ., Živančev, D., Košutić, M. (2004). Uticaj neodvojivih primesa na promene tehnološkog kvaliteta pšenice. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi / PTEP*, 8(1-2), 31-34.
- Šarić, M. D., Stojanović, T. V., Škrinjar, M. M., Menkovska, M. M. (2008). Effects of moulds on the safety and processing quality of *Triticum aestivum*. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, (114), 105-114.
- Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G. Fernández Pinto, V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22(4), 236-240.
- Thomma, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 226-236.
- Torres, A., Chulze, S., Varsavasky, E. Rodriguez, M. (1993). *Alternaria* metabolites in sunflower seeds -Incidence and effect of pesticides on their production. *Mycopathologia*, 121, 17-20.
- Torres, A., González, H. H., Etcheverry, M., Resnik S. L., Chulze, S. (1998). Production of alternariol and alternariol mono-methyl ether by isolates of *Alternaria* spp. from Argentinian maize. *Food Additives and Contaminants*, 15(1), 56-60.
- Tóth, B., Csósz, M., Szabó-Hevér, A., Simmons, E. G., Samson, R. A., Varga, J. (2011). *Alternaria hungarica* sp. nov., a minor foliar pathogen of wheat in Hungary. *Mycologia*, 103(1) 94-100.
- UC IPM Online. Pest Management Guidelines: Small Grains. Dostupno na: <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/selectnewpest.small-grains.html>.
- Uhlig, S., Eriksen, G. S., Hofgaard, I. S., Krska, R., Beltrán, E., Sulyok, M. (2013). Faces of a changing climate: semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. *Toxins*, 5(10), 1682-1697.
- Van de Perre, E., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Vekeman, F., Van Der Hauwaert, W., Asam, S., Rychlik, M., Devlieghere, F., De Meulenaer, B. (2014). Screening of moulds and mycotoxins in tomatoes, bell peppers, onions, soft red fruits and derived tomato products. *Food Control*, 37, 165-170.

- Visconti, A., Haidukowski, E. M., Pascale, M., Silvestri, M. (2004). Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology letters*, 153(1), 181-189.
- Vučković, J. (2012). *Alternaria* spp. parazit na strnim žitima. Seminarski rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Vučković, J., Bagi, F., Bodroža-Solarov, M., Stojšin, V., Budakov, D., Ugrenović, V., Aćimović, M. (2012). *Alternaria* spp. on spelt kernels (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). *Plant Doctor*, 1, 50-55.
- Vučković, J., Bodroža-Solarov, M., Vujić, Đ., Bočarov- Stančić, A., Bagi, F. (2013). The protective effect on hulls on *Alternaria* mycotoxins occurrence in spelt wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), 1996-2001.
- Webley, D. J., Jackson, K. L., Mullins, J. D., Hocking, A. D., Pitt, J. I. (1997). *Alternaria* toxins in weather-damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian harvest. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48(8), 1249-1255.
- Weidenbörner, M. (2001). *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Xu, L., Du, L. (2006). Direct detection and quantification of *Alternaria alternata lycopersici* toxins using high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), 398-405.
- Yu, W., Yu, F. Y., Undersander, D. J., Chu, F. S. (1999). Immunoassay of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. *Food and Agricultural Immunology*, 11(4), 307-309.
- Zhen, Y. Z., Xu, Y. M., Liu, G. T., Miao, J., Xing, Y. D., Zheng, Q. L., Ma, Y. F., Su, T., Wang, X. L., Ruan, L. R. (1990). Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer - Linxian, China. *IARC Scientific Publications*, (105), 253-257.
- Zhou, B., Qiang, S. (2008). Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata*. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 1151-1156.
- Walravens, J., Mikula, H., Rychlik, M., Asam, S., Ediage, E. N., Di Mavungu, J. D., Van Landschoot, A., Vanhaecke, L., De Saeger, S. (2014). Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1372, 91-101.

Biografija

Diplomirani inženjer Elizabet Janić Hajnal diplomirala je na osnovnim studijama Tehnološkog fakulteta na smeru Ugljenohidratna hrana 1999. godine sa prosečnom ocenom 8,06. Od novembra 1999. do oktobra 2008. godine radila je u kompaniji „Žitko“ a.d. Bačka Topola, kao tehnolog skladištenja i prijemne kontrole (u periodu 1999-2003), kao samostalni referent službe razvoja i investicije (oblasti skladištenje žita i tehnologija proizvodnje testenina, u periodu 2003-2005), kao rukovodilac akreditovane laboratorije za ispitivanje „Žitko“ a.d. Bačka Topola (u periodu 2005-2007) i kao direktor sektora obezbeđenja kvaliteta (u periodu 2007-2008) gde stiče iskustvo u radu kako u proizvodnji, tako i u oblastima razvoja i rukovođenja. Doktorske studije iz oblasti prehrambenog inženjerstva upisala je na Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu školske 2008/2009. godine. Od oktobra 2008. godine zaposlena je na Institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu kao rukovodilac akreditovane Laboratorije za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane-FINSLab i ovu funkciju obavljala je do juna 2010. godine. Od juna 2010. godine obavlja funkciju rukovodioca obezbeđenja kvaliteta Laboratorije za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane - FINSLab. U zvanje istraživača saradnika izabrana je 2009. godine. Reizabrana je u zvanje istraživač-saradnik 2012. godine. Kao saradnik Naučnog instituta za prehrambene tehnologije uključena je u mnogobrojna istraživanja iz oblasti postharvest tehnologije i zdravstvene bezbednosti (mikotoksikologije). Tokom svog dosadašnjeg naučnoistraživačkog rada pokazala je veliko interesovanje za stalno napredovanje i usavršavanje. Učetovala je na više naučnih projekata: Monitoring, analiza i unapređenje bezbednosti hrane i očuvanje životne okoline u Vojvodini (114-451-3483) (u periodu 2010-2012) finansiran od strane Sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj AP Vojvodine i na jednom međunarodnom projektu CHANCE - Low cost technologies and traditional ingredients for the production of affordable, nutritionally correct, convenient foods enhancing health in population groups at risk of poverty (FP7-KBBE-2010-4 Proposal No 266331) (u periodu 2011-2014). Trenutno učestvuje na dva naučna projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za domaće i svetsko tržište -STVORIMO BOGATSTVO IZ BOGATE SRBIJE (III46001) i Vrednovanje kvaliteta i optimizacija prerade pšenice u svetlu klimatskih promena (TR31007). Udata je i majka je dvoje dece.