



Univerzitet u Novom Sadu
Tehnološki fakultet

Autentičnost cerealija i pseudocerealija – razvoj novih metoda analize brašna i gotovih pekarskih proizvoda

– DOKTORSKA DISERTACIJA –

Kristian Pastor - Kandidat
Prof. dr Marijana Ačanski - Mentor

Novi Sad, 2018.

Zahvalnica

*Želeo bih, pre svega, da se zahvalim svojoj porodici na neizmernoj ljubavi. Kako za mene predstavlja najveću podršku i najstabilniji oslonac u životu, istinski je zaslužna za svaki moj postignut uspeh.
Zbog nje sam ono što jesam.*

*Zahvalnost, zatim, dugujem mojoj mentorki, dragoj profesorki Marijani Ačanski, večitom optimisti i hrabrom borcu za pravdu. Ona me beskrajno podržava, sa entuzijazmom podučava i profesionalno unapređuje.
Lepo je kada na posao ideš nasmejan.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svom guruu i vodiču kroz svet nauke, gospodinu Đuri Vujiću, vrhunskom hemičaru, od kog sam mnogo naučio o beskrajnim prostranstvima čudesne hemije.
Ali i o svetu i životu uopšte.*

I na kraju bih želeo da se zahvalim svim dragim prijateljima, bez kojih moj život ne bi bio ni blizu čaroban, kao što jeste.

Hvala svima,

Autor

Sadržaj

I	Uvod	1
II	Opšti deo	4
	1. Koncept autentičnosti hrane	5
	1.1. Autentičnost cerealijskih, pseudocerealijskih, brašna i pekarskih proizvoda – <i>Status Quo</i>	7
	2. Pojam funkcionalne hrane	9
	3. Cerealije	13
	Pšenica	15
	Kukuruz	16
	Ječam	17
	Ovas	19
	Raž	20
	Tritikale	21
	Spelta	22
	4. Pseudocerealijske	24
	Amarantus	25
	Heljda	26
	5. Liposolubilni i hidrosolubilni profili cerealijskih i pseudocerealijskih	29
	5.1. Sastav i sadržaj lipida	29
	5.2. Sastav i sadržaj prostih šećera	32
	6. Sistem GC-MS	34
	6.1. Gasna hromatografija	34
	6.2. Masena spektrometrija	35
	6.3. Primena GC-MS sistema u određivanju autentičnosti	37
	7. Multivarijantna analiza podataka	39
	7.1. Istraživačke multivarijantne procedure	40
	7.1.1. Klaster analiza	40
	7.1.2. Faktorska i analiza osnovnih komponenata	41
	7.1.3. Analiza osnovnih koordinata	42
	8. Pravni aspekt autentičnosti	43
	8.1. Nacionalne regulative	43
	8.2. Međunarodne regulative	44
III	Eksperimentalni deo	46
	1. Priprema uzoraka brašna	47
	1.1. Ekstrakcija i derivatizacija uzoraka brašna	48
	2. Priprema uzoraka hleba	50
	2.1. Ekstrakcija i derivatizacija uzoraka hleba	52

3.	Parametri GC-MS analize	54
4.	Analiza hromatograma	55
4.1.	Kreiranje numeričkih matrica u TIC modu	55
4.2.	Kreiranje numeričkih matrica u IC modu	55
4.3.	Kreiranje binarnih matrica	57
5.	Multivarijantna analiza GC-MS podataka	59
6.	Mikroskopija	60
6.1.	Analiza svetlosnim mikroskopom	60
6.2.	Analiza elektronskim mikroskopom	60
IV	Rezultati i diskusija	61
IV-A	Analiza brašna	62
1.	Kvalitativni profili uzoraka brašna	63
1.1.	Profili liposolubilnih ekstrakata	64
1.2.	Profili hidrosolubilnih ekstrakata	67
2.	Homogenost uzoraka brašna	71
2.1.	Homogenost genotipova heljde	72
2.1.1.	Homogenost liposolubilnih profila brašna heljde	72
2.1.2.	Homogenost hidrosolubilnih profila brašna heljde	73
2.2.	Homogenost genotipova ječma	77
2.2.1.	Homogenost liposolubilnih profila brašna ječma	77
2.2.2.	Homogenost hidrosolubilnih profila brašna ječma	79
2.3.	Homogenost genotipova ovsa	81
2.3.1.	Homogenost liposolubilnih profila brašna ovsa	81
2.3.2.	Homogenost hidrosolubilnih profila brašna ovsa	82
2.4.	Homogenost hibridnih sorti kukuruza	84
2.4.1.	Homogenost liposolubilnih profila brašna kukuruza	84
2.4.2.	Homogenost hidrosolubilnih profila brašna kukuruza	85
2.5.	Homogenost genotipova pšenice	87
2.5.1.	Homogenost botaničke vrste i razlikovanje genotipova sa visokim i niskim sadržajem lipidne frakcije	87
3.	Diferencijacija uzoraka brašna	90
3.1.	Diferencijacija genotipova cerealija i pseudocerealija	91
3.1.1.	Metode binarnih sistema	91
3.1.1.1.	Korelacije liposolubilnih profila brašna cerealija i pseudocerealija	91
3.2.	Diferencijacija genotipova cerealija: strnih i prosolikog žita	101
3.2.1.	Metode mikroskopiranja	101
3.2.1.1.	Primena svetlosnog mikroskopa	101
3.2.1.2.	Primena elektronskog mikroskopa	105
3.2.2.	Metode semi-kvantitativnog profilisanja	108
3.2.2.1.	Korelacije liposolubilnih profila brašna strnih žita i	108

	kukuruza	
	3.2.2.2. Korelacije hidrosolubilnih profila brašna strnih žita i kukuruza	111
	3.2.3. Metode binarnih sistema	115
	3.2.3.1. Korelacije hidrosolubilnih profila brašna strnih žita i kukuruza	115
	3.3. Diferencijacija genotipova cerealijskih – strnih žita	121
	3.3.1. Metode binarnih sistema	121
	3.3.1.1. Korelacije hidrosolubilnih profila brašna strnih žita	121
IV-B	Analiza hleba	125
	1. Karakteristike proizvedenog pšeničnog hleba sa dodatkom heljde	126
	2. Korelacije liposolubilnih komponenata	129
	2.1. Korelacije metil-estara dominantnih masnih kiselina u kori i sredini hleba	129
	2.2. Korelacije metil-estara minornih masnih kiselina u kori i sredini hleba	130
	3. Korelacije hidrosolubilnih komponenata	132
	3.1. Korelacije hidrosolubilnih komponenata kora hleba	132
	3.2. Korelacije hidrosolubilnih komponenata sredina hleba	134
V	Tok budućih istraživanja	136
VI	Zaključak	138
VII	Literatura	142
	Prilog 1	
	Prilog 2	
	Biografija	

I

Uvod

Dokazi o postojanju značajnih relacija između načina ishrane i zdravlja čoveka snažni su i uverljivi. Sve veći broj potrošača postaje svestan ove činjenice. U savremenom društvu, usled ekspanzije metaboličkog sindroma, zahtevi za razvojem tehnologija proizvodnje kvalitetnijih namirnica sa funkcionalnim svojstvima i širenjem asortimana prehrambenih proizvoda sa zdravstvenim benefitima, se stalno povećavaju.

Svako poboljšanje kvaliteta najčešće uzrokuje i porast tržišne vrednosti, što otvara prostor za širenje sive ekonomije i na polju prehrambenih proizvoda. Eksplozivnim razvojem tehnike i tehnologije, omogućena je primena izuzetno sofisticirane analitičke instrumentacije, kako u falsifikovanju hrane i pića, tako i u razotrkivanju ovakvih postupaka. Prema zvaničnim regulativama razvijenih društava, potrošačima moraju biti dostupne jasne i tačne informacije o proizvodu koji kupuje. To podrazumeva stalnu kontrolu proizvoda u svim fazama proizvodnje, distribucije i prodaje – od provere kvaliteta sirovina, do kontrole finalnih proizvoda na tržištu.

Brašno cerealija i pseudocerealija, kao i gotovi pekarski i konditorski proizvodi, sa aspekta određivanja autentičnosti predstavljaju najviše zapostavljene namirnice. Pooštavanje zakonskih regulativa definiše jasnu potrebu za razvojem savremenih metoda određivanja autentičnosti i u spektru ovakvih proizvoda, sa ciljem da se spreči supstitucija skupljih i vrednijih sirovina, jeftinijim sirovinama lošijeg kvaliteta. Ovakav trend dodatno stimuliše i sve učestalija pojava hipersenzitivnosti i intolerancije čoveka na gluten pšenice i srodnih vrsta cerealija, usled sveprisutnosti i širokog obima korišćenja proizvoda od brašna u svakodnevnoj ishrani.

Sastav svake botaničke vrste, pa tako i cerealija i pseudocerealija, je genetički determinisan i, prema tome, karakterističan za datu vrstu i sortu. Prema literaturnim podacima, metoda za određivanje autentičnosti brašna cerealija i pseudocerealija ima malo. Prva, koja datira s početka prošlog veka, je metoda mikroskopiranja skrobnih zranaca svetlosnim mikroskopom. Ona podrazumeva poređenje veličine i oblika skrobnih granula različitih vrsta cerealija i pseudocerealija (Kaluderski i Filipović, 1998). Pored svetlosnog mikroskopa, danas se u ovu svrhu koristi i elektronska mikroskopija (Baldwin et al., 1994; Thomas i Atwell, 1999). Savremenije metode za analizu brašna i određivanje autentičnosti uključuju primenu reflektivne spektroskopije u bliskoj infracrvenoj oblasti (Cheewapramong, 2007) i sinhronu fluorescentne spektroskopije (Zeković et al., 2012). Svaka metoda koja podrazumeva primenu neke od navedenih tehnika ima i određene nedostatke.

Biohemijski procesi u biljkama su, takođe, strogo genetički determinisani. To se odnosi i na male molekule, koji učestvuju u anaboličkim i kataboličkim biohemijskim procesima svake biljne vrste. Zato se došlo na ideju da bi, analizom malih molekula, bilo moguće utvrditi autentičnost brašna određene biljne vrste cerealija i pseudocerealija (Ačanski i Vujić, 2014a; Ačanski et al., 2015b). Predmet istraživanja ove doktorske disertacije podrazumeva razvoj novih, savremenih metoda za određivanje autentičnosti brašna različitih botaničkih vrsta

analizom lipidnih materija (masne kiseline i neosapunjive materije, poput fitosterola i tokoferola) i rastvorljivih šećera (mono-, di-, trisaharidi i šećerni alkoholi). Biće ispitana mogućnost razlikovanja uzoraka pseudocerealija – heljde i amarantusa, kao bezglutenskih alternativnih sirovina, od uzoraka konvencionalnih cerealija. Biće razmotrena i mogućnost razlikovanja bezglutenskog prosolikog žita - kukuruza, od uzoraka strnih žita – hlebne pšenice, spelte, raži, tritikalea, ječma i ovsu, koja sadrže gluten. Mogućnost primene nove metode za određivanje autentičnosti brašna biće ispitana i na finalnom pekarskom proizvodu – hlebu od mešanog brašna, sa ciljem da se pored pšeničnog brašna identifikuje i prisustvo brašna drugih biljnih vrsta. Za analizu malih molekula ispitivanih uzoraka brašna najpogodniji je gasni hromatograf sa masenim detektorom (GC-MS). Razlike u sastavu malih molekula iste biljne vrste su minimalne. Zato će posle obrade podataka sa dobijenih hromatograma biti primenjene i savremene statističke tehnike multivarijantne analize.

II

Opšti deo

II-1. Koncept autentičnosti hrane

Postupci prevare na tržištu prehrambenih proizvoda poznati su još iz perioda Antike (Oliveri i Downey, 2012; Danezis et al., 2016a). Ustanovljeno je da su i tokom XIX veka pekarskom brašnu dodavani krečnjak, gips i stipsa radi povećanja težine, pivu strihnin radi povećanja gorčine, a soli bakra, olova i žive dodavane su slatkišima, kako bi dobili lepu boju i sjaj (Accum, 1820; Manning i Soon, 2014; Spink i Moyer, 2011). Neki od primera različitih postupaka savremenog falsifikovanja širokog spektra prehrambenih proizvoda prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Primeri savremenog falsifikovanja različitih prehrambenih proizvoda (Primrose et al., 2010)

Način falsifikovanja	Primeri
Supstitucija jednog sastojka sličnim, ali jeftinijim	Supstitucija tunjevine bonitom Supstitucija lososa morskom pastrmkom Dodavanje vode u cilju povećanja mase pilećih grudi Mešanje sorti pirinča dugačnog zrna sa Basmati pirinčem
Povećanje zapremine ili mase proizvoda jeftinijim bazičnim sastojkom	Dodavanje hlebne pšenice durum pšenici pri proizvodnji testenina Ekstrakcija kafe iz zrna pomešanih sa omotačem i ljuskama Mešanje jeftinijih biljnih ulja sa skupljim Dodavanje vode, šećera, kiselina i boje u voćne sokove
Prisustvo nedeklarisanih sastojaka	Iznutrice i otpaci u mesnim prerađevinama Meso konja i magarca u salami
Falsifikovanje sa ciljem povećanja vrednosti proizvoda	Dodatak soka mandarine ili tangerine soku od narandže, sa ciljem poboljšanja boje Dodatak glicerola vinu, zbog poboljšanja punoće i konzistencije Označavanje živine kao sveže, iako je prethodno bila zamrznuta
Nedeklarisani ili pogrešno deklarirani procesi	Nedostatak informacije da je sok proizveden od koncentrata Nedostatak informacije da je hrana izložena zračenju
Povećanje sadržaja kvalitativnog sastojka	Uključivanje hidrolizovanog proteina kao mesnog sadržaja
Lažne tvrdnje o geografskom poreklu i poreklu proizvodnje	Deklarisanje uzgajane ribe kao divlje Deklarisanje konvencionalnih proizvoda kao organskih Tvrdnje o specifičnom geografskom poreklu ekstra-devičanskog maslinovog ulja

Zainteresovanost potrošača za bezbednost, autentičnost i kvalitet prehrambenih proizvoda u stalnom je porastu (Borras et al., 2015). Autentičnost je povezana sa istinitošću, pa se za neki prehrambeni proizvod može reći da je autentičan, ukoliko nije bio predmet bilo kakve prevare (Cuadros-Rodríguez, 2016). Evropske i globalne polise o prehrambenim proizvodima zahtevaju da hrana na tržištu bude autentična. To znači da deklaracija proizvoda na etiketi mora da se poklapa sa njegovim stvarnim sastavom, poreklom (geografsko, botaničko, genetičko) i načinom proizvodnje (konvencionalna, organska, tradicionalna) (Cubero-Leon et al., 2014; Danezis et al., 2016a, 2016b).

Globalizacijom, razvojem tržišta i brzih distributivnih sistema, kao i širenjem spektra prehrambenih artikala, falsifikovanje i kontaminacija prehrambenih proizvoda dobijaju međunarodni karakter, a posledice su dalekosežne (Wishart, 2008; Moore et al., 2012; Manning i Soon, 2014; Danezis et al., 2016a, 2016b). Najčešći tip falsifikovanja – ekonomski motivisano falsifikovanje hrane, definiše se kao *Obmanjujuća i namerna supstitucija ili dodatak pojedinih sastojaka u proizvod sa ciljem povećanja prividne vrednosti proizvoda ili snižavanja troškova njegove proizvodnje, sa posledicom određene ekonomske dobiti* (Spink i Moyer, 2011; Manning i Soon, 2014). U zavisnosti od prirode dodatog supstituenta, dobijeni falsifikovani proizvodi mogu predstavljati i potencijalnu opasnost za zdravlje potrošača. Time određivanje autentičnosti u prehrambenoj industriji, pored ekonomskog dobija i zdravstveno-bezbednosni aspekt (Cubero-Leon et al., 2014; Borras et al., 2015; Manning, 2016).

Imajući sve ovo u vidu, globalne polise zahtevaju striktni monitoring i kontrolu kvaliteta i bezbednosti hrane. Zato postoji jasna težnja ka razvoju novih tehnika i metoda koje bi omogućile postizanje ovog cilja. Tradicionalne i standardne metode analize i dalje su vrlo često u upotrebi. Zbog nižih troškova i/ili bržih analitičkih protokola razvija se potreba za novim metodologijama ispitivanja autentičnosti, koje bi bile komplementarne ili čak zamenile postojeće. Pojavom savremenih analitičkih i matematičkih pristupa - masene spektrometrije i multivarijantne statističke analize, tokom poslednjih nekoliko decenija raste interesovanje za određivanje autentičnosti različitih prehrambenih proizvoda (Cubero-Leon et al., 2014; Danezis et al., 2016b). Ovakav trend stimulišu sami potrošači, regulatorna tela, kao i prehrambena industrija. Savremena analiza autentičnosti zasniva se na detekciji i merenju parametara koji imaju potencijal faktora diskriminacije ispitivanih artikala. Osnivanje velike baze podataka kontrole kvaliteta omogućilo bi efikasnu razmenu rezultata merenja i njihovu uporedivost (Danezis et al., 2016a, 2016b).

Prema Danezis et al. (2016) prvih deset zemalja u svetu koje se najintenzivnije bave određivanjem autentičnosti hrane, pored SAD-a i Kine, čine članice Evropske Unije. Te zemlje aktivno subvencionišu i podstiču razvoj ove naučne oblasti (Danezis et al., 2016a). Odredbe Evropske komisije svedoče o pravima potrošača na istinite informacije o prehrambenim proizvodima, koje kupuju (European Commission, 2002; Reid et al., 2006; European Commission, 2011). Ove regulative imaju za cilj prevenciju (i) krivotvornih i obmanjujućih akcija, (ii) falsifikovanja prehrambenih proizvoda i (iii) svih drugih postupaka prevare potrošača. Primer veoma učestalog načina falsifikovanja hrane

je supstitucija nekog sastojka prehrambenog artikla sličnim, a jeftinijim, tako da potrošač ovakav postupak ne ume da prepozna (Oliveri i Downey, 2012; Cubero-Leon et al., 2014; Borrás et al., 2015; Corrado, 2016).

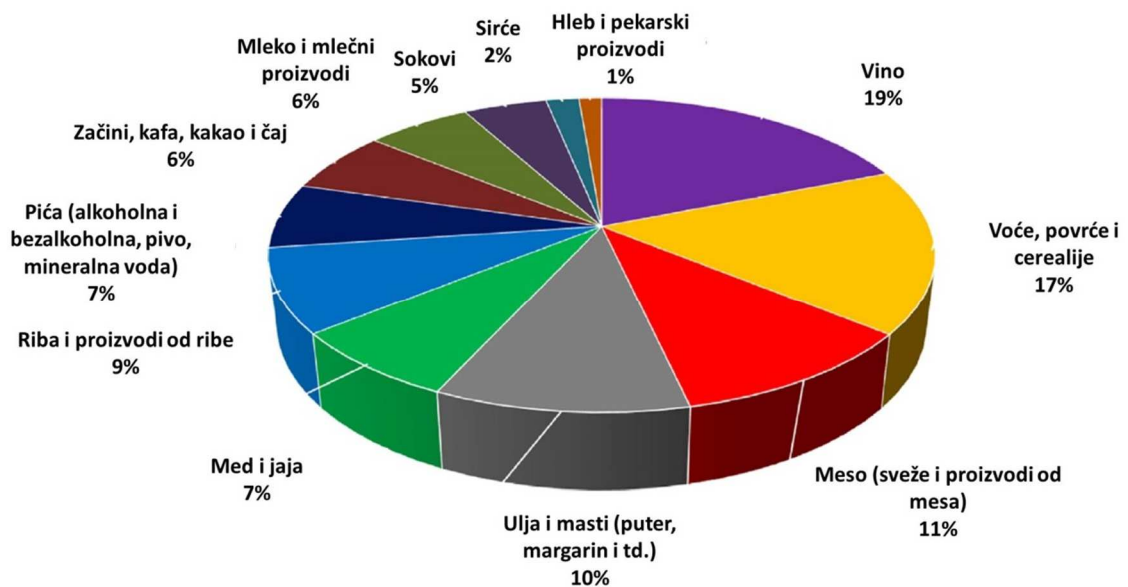
Međunarodno udruženje proizvođača prehrambenih proizvoda procenjuje da postupci falsifikovanja na globalnom nivou koštaju između 10 i 15 milijardi dolara godišnje i obuhvataju oko 10% komercijalno dostupnih prehrambenih artikala (Manning, 2016). Prema literaturi, prehrambeni proizvodi podložni falsifikovanju uključuju: proizvode od cerealijske, jestiva ulja, mlečne proizvode, ribu, voće i voćne sokove, povrće, mesne proizvode, koštunjavo voće, začine, med, kafu, čaj, vino, hranu iz organske proizvodnje i mnoge druge (Moore et al., 2012; Danezis et al., 2016b).

U principu postoje tri analitička pristupa određivanja autentičnosti prehrambenih proizvoda: (i) hemijski pristup - određivanje sastava i sadržaja hemijskih komponenata hrane, (ii) biomolekulski pristup - analiza DNA i proteina, (iii) izotopski pristup – određivanje sastava stabilnih izotopa određenih atoma (Cuadros-Rodríguez et al., 2016). Hromatografske tehnike predstavljaju najčešći izbor u analizi autentičnosti većine prehrambenih artikala (Danezis et al., 2016a, 2016b). Ovo je delom i stoga što instrumentalne metode, poput hromatografije, mogu biti primenjivane kako sa ciljem detekcije postupaka falsifikovanja, tako i sa ciljem određivanja autentičnosti (Cuadros-Rodríguez et al., 2016). Dodatno, analitička mogućnost masene spektrometrije, koja se često koristi u sprezi sa hromatografskim tehnikama, omogućava karakterizaciju širokog spektra komponenata u veoma kompleksnim sistemima (Gallo i Ferranti, 2016). Pojedini autori smatraju da se budućnost određivanja autentičnosti hrane ogleda u sinergističkoj fuziji različitih komplementarnih instrumentalnih tehnika, te obradi ovako kompleksnog bloka ogromne količine podataka primenom savremenih tehnika multivarijantne analize (Borrás et al., 2015). Od 2001. godine pojavio se veliki broj naučnih članaka, koji se odnose na određivanje autentičnosti hrane primenom novih ili postojećih analitičkih tehnika u kombinaciji sa multivarijantnom analizom. Međutim, mora se napomenuti da su i postupci falsifikovanja veoma savremeni i u konstatnom razvoju, sa stalnim interesom da nadmaše moć utvrđenih analitičkih metoda njihovog razotkrivanja (Reida et al., 2006).

II-1.1. Autentičnost cerealijske, pseudocerealijske, brašna i pekarskih proizvoda – *Status Quo*

Sa godišnjom proizvodnjom od više od 2 milijarde tona, cerealijske predstavljaju najvažniji prehrambeni usev na svetu (Jespersen i Munck, 2009). Analiza autentičnosti proizvoda od cerealijske je neophodna, kako bi se utvrdila tačnost deklaracije artikla. Time bi se izbegla nepravedna ekonomska dobit nekih proizvođača i sprečio unos pojedinih cerealijske, čiji su proteini toksični za organizam osetljivih i alergičnih individua. Propisi Evropske Unije i Komisije *Codex Alimentarius* zahtevaju obaveznu deklaraciju sastojaka koji mogu da izazovu intoleranciju i alergijske reakcije. Ovo se naročito odnosi na

cerealije koje sadrže gluten, poput pšenice (uključujući hlebnu pšenicu, durum pšenicu i speltu), raži, ječma, ovsu i njihovih hibrida, kao i proizvode koji su dobijeni od ovih biljnih vrsta (Codex Alimentarius Commission, 2007; European Commission, 2011; European Commission, 2014). Time se identifikacija prisustva ovih botaničkih vrsta cerealija u proizvodima može okarakterisati kao veoma značajna (Pegels et al., 2015). Prema Danezis et al. (2016) fokus naučne javnosti ka određivanju autentičnosti hleba i pekarskih proizvoda zauzima najmanji procenat, od samo 1%, u ukupnoj analizi autentičnosti svih prehrambenih proizvoda, slika 1. Ta problematika postaje aktuelna relativno kasno, tek između 2011. i 2014. godine. Autentičnost botaničkih vrsta celih zrna cerealija određuje se češće u odnosu na njihove finalne proizvode (Danezis et al., 2016b).



Slika 1. Učestalost izučavanja različitih prehrambenih artikala u smislu određivanja autentičnosti (Danezis et al., 2016b)

Detaljnim pregledom literature uočena je primena različitih instrumentalnih analitičkih tehnika u određivanju autentičnosti pojedinih botaničkih vrsta cerealija - u najvećem broju slučajeva određivanja geografskog porekla njihovog uzgoja. Mogućnost diferencijacije cerealija prema botaničkom poreklu biljke uglavnom je ispitivana primenom bioloških tehnika. Nije zabeležen nijedan slučaj ispitivanja botaničkog porekla brašna proizvedenog od šireg spektra biljnih vrsta, cerealija i pseudocerealija, primenom kako GC-MS sistema, tako ni drugih instrumentalnih tehnika.

II-2. Pojam funkcionalne hrane

Koncept pozitivnog uticaja ishrane na zdravlje čoveka ima veoma dugu istoriju, dužu od 2500 godina. Još je Hipokrat izjavio: *Neka hrana bude tvoj lek, a lek tvoja hrana* (Pinto et al., 2014).

Problemi sa ishranom prisutni su širom sveta. Prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije neinfektivne bolesti, poput kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, gojaznosti, kancera i respiratornih oboljenja, sačinjavaju 59% smrtnih slučajeva godišnje i 45,9% ukupnih oboljenja na svetu. Procenjuje se da je 80% slučajeva kardiovaskularnih oboljenja, 90% slučajeva dijabetesa tipa 2, kao i 1/3 kancerogenih oboljenja moguće izbeći promenom stila života, uključujući i promene u ishrani. Poslednjih godina potrošači se sve više interesuju za ishranu, zdravlje i bezbednost hrane (WHO/FAO Report, 2003; Kotilainen et al., 2006; Mohamed, 2014). Dakle, prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije ustanovljene su značajne relacije između kvaliteta ishrane čoveka i različitih bolesti novog doba, kao što su gojaznost, dijabetes, kardiovaskularna oboljenja, hipertenzija, infarkt i neki tipovi kancera. Ishrana se smatra glavnom promenljivom determinantom hroničnih oboljenja, a definitivno postoje i naučni dokazi koji podržavaju stav da promene u ishrani imaju snažan efekat, kako pozitivan - tako i negativan, na zdravlje čoveka (Sanders, 1998; WHO/FAO, 2003).

U poslednje vreme prehrambena industrija, poljoprivreda i potrošači pokazuju sve veći interes za tzv. *funkcionalnu* hranu. Roberfroid (1999) opisuje funkcionalnu hranu kao *hranu, koja je po izgledu slična konvencionalnoj hrani i koja bi trebala da se konzumira u sklopu redovne ishrane, ali je modifikovana tako, da pored toga što zadovoljava potrebe za osnovnim nutrijentima, ima i određene fiziološke uloge* (Huggett i Schliter, 1996; Roberfroid, 1999; Charalampopoulos et al., 2002; Spence, 2006).

Pojam *funkcionalna hrana* prvi put je upotrebljen u Japanu 1980-ih, kako bi se opisali obogaćeni prehrambeni proizvodi, koji su imali pozitivna fiziološka dejstva na organizam čoveka. Ministarstvo zdravlja Japana je 1991. godine uvelo pravila za odobravanje specifične kategorije zdrave hrane pod nazivom FOSHU - *Foods for Specified Health Use*. U Japanu je 1997. godine donešen i zakon koji reguliše funkcionalne prehrambene proizvode. Danas i druge zemlje imaju slične pravne regulative, uključujući i mnoge zemlje Evropske Zajednice. U SAD-u je nekoliko ograničavanja predložilo različite definicije za ovaj tip proizvoda. Međutim, i dalje ne postoje zvanične i uniformne regulative. Uprkos svemu ovome, mora se naglasiti da su organizacije, poput Američke administracije za hranu i lekove (FDA – *Food and Drug Administration*) i Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA – *European Food Safety Authority*) izložile koncept zdravstvenih benefita pojašnjavajući da funkcionalna hrana nema za cilj da tretira, leči, ublaži ili dijagnostifikuje bolesti, jer se ta svojstva pripisuju lekovima. Prema njima, hronične bolesti su rezultat brojnih faktora, poput ishrane, okruženja i životne sredine, ali i genetičkih karakteristika svake individue (Pinto et al., 2014).

Evropska Komisija predlaže da *prehrambeni proizvod može da se smatra funkcionalnim samo ako, pored zadovoljenja bazičnog nutritivnog aspekta, ima i pozitivne efekte na jednu ili više funkcija u organizmu čoveka, poboljšavajući opšte i fizičko stanje i/ili smanjujući rizik od razvoja različitih oboljenja. Količina i forma unetog funkcionalnog proizvoda mora biti kao i kod proizvoda u redovnoj ishrani. To znači da takav proizvod ne može biti u obliku tablete ili kapsule, već isključivo u obliku konvencionalnog prehrambenog proizvoda* (Consensus Document, 1999). Prema tvrdnjama mnogih autora, svrha jednog prehrambenog proizvoda nije samo da utoli glad i obezbedi esencijalne nutrijente (proteine, masti, ugljene hidrate i minerale), nego i da spreči oboljenja koja su vezana za promene stila života i načina ishrane, kao i da poboljša fizičko i mentalno stanje potrošača. Koncept funkcionalne hrane definitivno je rezultat otkrića o nedvosmislenoj povezanosti načina ishrane i zdravlja čoveka. Takav koncept suštinski predstavlja novi praktični pristup postizanja optimalnog zdravstvenog stanja i snižavanja rizika od različitih oboljenja (Wood, 1997; Charalampopoulos et al., 2002; Wildman and Kelley, 2007; Siroa et al., 2008; Betoret et al., 2011; Pinto et al., 2014; Stajić et al., 2014). Klasifikacija funkcionalnih proizvoda prikazana je u tabeli 2.

Tabela 2. Tipovi funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Kotilainen, 2006; Spence, 2006)

Tip funkcionalne hrane	Definicija	Primer
Prirodni proizvodi <i>Natural products</i>	Prehrambeni proizvodi koji prirodno sadrže dovoljne količine nutritivnih sastojaka sa pozitivnim svojstvima	Ovas (β -glukan)
Poboljšani proizvodi <i>Fortified products</i>	Prehrambeni proizvodi kod kojih je povećan sadržaj neke nutritivne komponente (ili više njih)	Voćni sokovi sa dodatim vitaminom C Žitarice sa povećanim sadržajem folne kiseline
Obogaćeni proizvodi <i>Enriched products</i>	Prehrambeni proizvodi kod kojih je dodata neka nova nutritivna komponenta, koja prirodno nije prisutna u tom tipu proizvoda	Margarin obogaćen biljnim sterolima Sok od narandže sa dodatkom kalcijuma
Izmenjeni proizvodi <i>Altered products</i>	Prehrambeni proizvodi kod kojih je neka štetna komponenta (ili više njih) uklonjena, ili joj je smanjen sadržaj, ili je pak zamenjena nekom drugom nutritivnom komponentom	Dijetetska vlakna u mesnim proizvodima Proizvodi bez laktoze i glutena
Unapređene sirovine <i>Enhanced commodities</i>	Prehrambeni proizvodi sa izmenjenim nutritivnim sastavom, kod kojih je sadržaj nutritivnih komponenata prirodno povećan specijanim uslovima uzgoja, izmenjenim sastavom hrane za životinje, genetičkom manipulacijom ili na neki drugi način	Jaja sa povećanim sadržajem omega-3 masnih kiselina, koji se postiže izmenjenom ishranom živine Kukuruz sa visokim sadržajem lizina Voće i povrće sa povećanim sadržajem vitamina

Funkcionalni proizvodi zastupljeni su na tržištu napitaka, mlečnih proizvoda, konditora i pekarskih proizvoda, tabela 2. Sastojci koji se primenjuju u proizvodnji pekarskih proizvoda imaju različite funkcionalne osobine. Pekarski proizvodi imaju veoma važnu ulogu u ishrani čoveka s obzirom na njihovu ukupnu potrošnju na globalnom novou. Oni pored makro-nutrijenata, poput skroba i dijetetskih vlakana, sadrže i mikronutrijente, poput vitamina, minerala i antioksidanasa (Kotilainen et al., 2006; Pinto et al., 2014). Povećan interes za potencijalni uticaj unosa cerealijskih proizvoda na zdravlje čoveka vuče poreklo u rezultatima kliničkih studija, koje pored uticaj unosa proizvoda od integralnog i rafinisanog brašna. U proizvodima od integralnog brašna omotač zrna, aleuronski sloj i klica, koji sadrže vlakna, mikronutrijente, masti i proteine, ostaju u sastavu proizvoda, dok se pomenuti delovi zrna kod proizvoda od rafinisanog brašna uklanjaju mlevenjem, pri čemu zaostaje samo endosperm, bogat skrobom (Topping, 2007; Patel, 2015). Nekoliko epidemioloških studija ukazuje na to da je ishrana bogata proizvodima od integralnih cerealijskih proizvoda u pozitivnoj korelaciji sa nižom učestalošću hroničnih oboljenja, poput dijabetesa, kardiovaskularnih oboljenja i kancera. Razlog za to je što celo zrno cerealijskih proizvoda pored esencijalnih nutrijenata (proteina, ugljenih hidrata i vlakana), sadrži i različite fitohemikalije i nutraceutike, kojima se pripisuje potencijalna biološka aktivnost i različiti zdravstveni benefiti (WHO/FAO, 2003; Topping, 2007; Dinelli et al., 2009; Dinelli et al., 2011; Mohamed, 2014; Pinto et al., 2014; Masisi et al., 2016).

Danas, na početku trećeg milenijuma, tri botaničke vrste dominiraju svetskim tržištem, čineći 75% ukupne proizvodnje cerealijskih proizvoda, a to su: pšenica, pirinač i kukuruz. Ovako mala raznovrsnost u ishrani ima snažan dugoročni uticaj na zdravlje čoveka. Takođe, postoji sve veća zabrinutost oko nedovoljnog unosa mikronutrijenata u ishrani. Pored toga, sve je učestalija pojava različitih alergija i intolerancija, pri čemu pšenica predstavlja jedan od uzroka ovakvih stanja. Postoje dokazi da je konzumiranje šireg spektra biljnih prehrambenih proizvoda veoma poželjno, jer organizmu pruža različite funkcionalne komponente sa poželjnim fiziološkim svojstvima (Belton i Taylor, 2002). Primer predstavljaju druge botaničke vrste cerealijskih proizvoda, kao alternativne sirovine u proizvodnji funkcionalne hrane. Pekarski proizvodi predstavljaju idealan matriks za unos supstanci sa funkcionalnim svojstvima u obliku prehrambenih proizvoda, potpuno prihvatljivih od strane potrošača. Može se, dakle, reći da funkcionalni proizvodi na bazi cerealijskih proizvoda predstavljaju snažnu perspektivu, ali i veliki izazov, u formulaciji i razvoju novih tehnologija proizvodnje (Charalampopoulos et al., 2002; Brennan i Cleary, 2005; Havrlentová i Kraic, 2006; Siroa et al., 2008). Pojedine obogaćene vrste hleba (kalcijumom, dijetetskim vlaknima, inulinom, β -glukanom, oligosaharidima, ω -3 masnim kiselina) dostupne su na tržištu u formi funkcionalnog hleba. Formulacije u koje je uključen veći broj biljnih vrsta omogućavaju razvoj šireg spektra proizvoda koji sadrže mnoštvo bioaktivnih komponentata. Trenutno je aktuelan trend primene drugih poljoprivrednih useva, pored pšenice, poput heljde, ovsa, ječma, spelte, raži, kvinoje i amarantusa, zbog izuzetno kvalitetnog nutritivnog sastava ovih sirovina. Primena mešavina minornih cerealijskih proizvoda i pseudocerealijskih proizvoda u pekarskim proizvodima predstavlja jednostavnu i efikasnu strategiju njihovog obogaćivanja važnim komponentama, poput

dijetetskih vlakana, rezistentnog skroba, minerala, vitamina i polifenola (Angioloni i Collar, 2011).

Primena različitih nepšeničnih tipova brašna u proizvodnji hleba predstavlja skorašnji trend u razvoju formulacija širokog spektra bezglutenskih proizvoda, zbog visoke učestalosti celijačnog oboljenja u svetskoj populaciji (Pinto et al., 2014).

Dakle, može se istaći važnost uticaja tipa brašna i biljne vrste cerealijske i pseudocerealijske, kao i njihovog udela u formulaciji, na osobine, kvalitet i nutritivnu vrednost pekarskog proizvoda.

II-3. Cerealije

Istorija upotrebe cerealija veoma je duga. Cerealije predstavljaju osnovnu komponentu ishrane čoveka i životinja širom sveta. One su važan izvor nutrijenata, kako u razvijenim, tako i u zemljama u razvoju. Koriste se u obliku hleba i peciva, testenina, muslija, biskvita, torti, kolača, kaša i dr. Od skora se primenjuju i u energetske proizvodnji, u dobijanju biogasa i bioetanolu (Kent i Evers, 1994; McKevith, 2004; Koehler i Wieser, 2013). Pekarski proizvodi predstavljaju veoma važan deo ishrane svetske populacije, jer su bogat izvor energije, neophodne za svakodnevno funkcionisanje organizma (Ali Karrar, 2014). Skup ovih činjenica predstavlja razlog masovne proizvodnje ovog tipa proizvoda (Nagi et al., 2012).

Najznačajnije i najčešće uzgajane cerealije su pšenica, kukuruz, pirinač, ječam, sirak, proso, ovas i raž. One se uzgajaju na skoro 60% obradive površine na planeti. Definitivno najzastupljenije među njima su pšenica, kukuruz i pirinač. Botanički, cerealije pripadaju porodici trava, *Gramineae*, odnosno monokotiledonih trava, *Poaceae*. Pšenica (u svim svojim kultivisanim oblicima), raž, njihov hibrid – tritikale, i ječam su veoma bliske vrste koje pripadaju podfamiliji *Pooideae*, pleme *Triticeae*. Ovas je njihov dalji rođak, ali u okviru iste podfamilije *Pooideae*, dok su se pirinač, kukuruz, sirak i proso razvijali drugim evolucionim stazama. Pšenica se uzgaja u pet oblika, kao heksaploidna AABBDD - konvencionalna hlebna pšenica i spelta, tetraploidna AABB – durum pšenica i emer, i diploidni ajkorn genoma AA. Tritikale je veštački hibrid durum pšenice i raži, genoma AABBRR (Koehler i Wieser, 2013).

Sve cerealije su strukturno slične i sadrže omotač, klicu - koja nosi genetički materijal nove biljke, i endosperm - u kome su sadržana skrobna zrna (McKevith, 2004).

Vlažnost zrna cerealija je između 11 i 14%. Sadržaj ugljenih hidrata je veoma visok, od čega skrob čini 56-74% suve materije (s.m.), a vlakna čine između 2 i 13% s.m. i locirana su uglavnom u omotaču (Koehler i Wieser, 2013). Odnos polimera amiloze i amilopektina u skrobu je pod genetičkom kontrolom, pa se kod cerealija javljaju varijacije u odnosima ova dva polimera u zavisnosti od botaničke vrste. Kod najvećeg broja vrsta amiloza čini 25-27% skroba, dok kod voskastih vrsta, poput kukuruza, ona sačinjava većinu skrobnog zrna, a po nekim autorima čak i do 100% (Kent i Evers, 1994; Shelton, 2000; Simsek et al., 2004; Koehler i Wieser, 2013). Cerealije koje sadrže veći udeo amiloze u skrobu, a naročito kukuruz, koriste se kao osnova u formulaciji prehrambenih proizvoda bogatih rezistentnim vlaknima. Amiloza sporije želira i brže retrogradira u odnosu na amilopektin, pa daje proizvode bogatije rezistentnim skrobom (Kent i Evers, 1994; Charalampopoulos et al., 2002; Topping, 2007). Neskrobni polisaharidi, kao glavna komponenta dijetetskih vlakana, mogu se podeliti u tri grupe: celuloza, pentozani i β -glukan (Shelton, 2000).

Drugu važnu komponentu cerealija čine proteini. Cerealije sadrže 6-15% proteina (McKevith, 2004), a prema nekim autorima 8-11%. Postoje značajne varijacije u

zavisnosti od botaničke vrste, sorte i hibrida, kao i spoljašnjih uslova: klime, zemljišta i fertilizacije (naročito azotnim đubrivima). (Koehler i Wieser, 2013). Većinsku frakciju od oko 80%, kod velikog broja vrsta cerealija, čini grupa skladišnih proteina, prolamina i glutelina. Izuzetak je zrno ovsa, koje je bogato globulinima. Na primer, skladišni proteini čine 80-85% ukupnih proteina pšenice i ječma (u skoro jednakim odnosima), dok ovas i pirinač imaju najniži sadržaj prolaminske frakcije (Lookhart, 2000; Koehler i Wieser, 2013). Najvažniji i najzastupljeniji skladišni proteini pšenice i spelte su prolamini (gliadini) i glutelini (glutenini), dok je u zrnu pirinča to prolamin (orizin), kukuruza prolamin (zein), u zrnu ječma prolamini (hordeini) i glutelini, a u zrnu ovsa albumini i globulini. Prolamini ovsa su avelini (ili avenini), a raži sekalini (Kent i Evers, 1994; McKevith, 2004; Koehler i Wieser, 2013). Uopšteno se može reći da proteini cerealija imaju nizak sadržaj esencijalnih aminokiselina, a naročito lizina (najoskudnija aminokiselina) i treonina (druga najoskudnija aminokiselina), ali su bogate glutaminskom kiselinom i prolinom, koje su veoma značajne u procesu formiranja testa (Ragaee et al., 2006; Escarnot et al., 2012). Genetička identifikacija određene sorte za sada predstavlja u suštini karakterizaciju ekspresije gena. Kako svaka sorta ima određen i specifičan genom, a primarni produkt strukturnog gena je protein, taj protein može biti marker tog specifičnog sistema. Za identifikaciju sorti najčešće se primenjuju skladišni proteini koji su različiti po veličini, obliku i naelektrisanju u različitim biljnim vrstama i sortama i direktno zavise od njihove genetičke konstitucije (Lookhart, 2000).

Može se uopšteno reći da su lipidi minorne komponente većine cerealija, jer njihova količina varira od 1-3% s.m. u zrnu ječma, raži, tritikalea i pšenice, između 5-9% s.m. u zrnu kukuruza i čak 5-10% s.m. u zrnu ovsa (Kim Chung i Ohm, 2000; McKevith, 2004; Barthole et al., 2012). Najveći udeo lipida u zrnu cerealija čine acil-lipidi, koje čine slobodne masne kiseline kao i masne kiseline esterifikovane alkoholima, u najvećem broju slučajeva glicerolom. Masne kiseline mogu da budu esterifikovane i sterolima, karotenoidima i tokoferolima, pa se i ti estri mogu smatrati acil-lipidima. Neacil lipidne komponente se javljaju u slobodnom, neesterifikovanom obliku i sačinjavaju neosapunjivu lipidnu frakciju, a to su: steroli, triterpenoli, karotenoidi, tokoli i ugljovodonici (Kim Chung i Ohm, 2000). Tokoferoli i tokotrienoli kao derivati tokola odgovorni su za vitaminsku aktivnost vitamina E u biljnim tkivima. U zrnu cerealija prisutne su različite kombinacije svih osam derivata tokola. U opštem slučaju γ -tokoferol i γ -tokotrienol ili nisu detektovani, ili su detektovani u veoma malim količinama u zrnu cerealija, koje imaju visok sadržaj β -tokoferola i β -tokotrienola, kao što su pšenica, raž i tritikale. S druge strane, derivati β -tokola nalaze se u neznatnim količinama u zrnu cerealija koje imaju viši sadržaj derivata γ -tokola, kao što je to kukuruz. Zrno ječma predstavlja izuzetak, jer sadrži i derivate β - i γ -tokola (Kim Chung i Ohm, 2000). Cerealije se smatraju dobrim izvorom fitosterola. Iako je njihova koncentracija u zrnu umerena (0,4 – 1,2 mg/g), ova tvrdnja je opravdana velikim unosom cerealija i njihovih proizvoda u svakodnevnom životu. Smatra se da je unos fitosterola poreklom iz cerealija oko 30% ukupnog unosa fitosterola u organizmu čoveka (Ryan et al., 2007; Iafelice et al., 2009). Najzastupljeniji je β -sitosterol i čini 56-79% ukupno unetih biljnih sterola, a prisutan je u zrnu svih cerealija. Kampesterol i stigmasterol doprinose sa 18% i 9%,

respektivno, a fitostanoli sa 9%. Dominantan fitosterol u zrnu ovsa je Δ^5 -avenasterol. Među različitim cerealijama postoje razlike u sadržaju i sastavu fitosterola, pri čemu njihov sadržaj značajno varira, između 350 i 1200 mg/kg. Na ove varijacije utiču genetički faktori i geografsko područje uzgoja pojedine cerealije (Kim Chung i Ohm, 2000; Piironen i Lampi, 2004).

Cerealije ne sadrže vitamin C, vitamin B12 i vitamin A, dok β -karoten sadrže u vrlo malim količinama, izuzev kukuruza. Međutim, može se reći da su cerealije važni izvori vitamina B grupe, a naročito tiamina, riboflavina i niacina, i umereni izvori vitamina E u ljudskoj ishrani. Kao i većina drugih biljaka i cerealije sadrže niske koncentracije natrijuma, ali su dobar izvor kalijuma. Sadrže i značajne količine gvožđa, magnezijuma i cinka, a elemente poput selena sadrže u tragovima (Bock, 2000; McKeivith, 2004). Iako ih sadrže u malim količinama (1-2,5%), cerealije predstavljaju jedan od najvažnijih izvora minerala u ljudskoj ishrani, jer se konzumiraju u velikim količinama (Koehler i Wieser, 2013).

Najvažniji monosaharidi cerealija su heksoze - glukoza i fruktoza, i pentoze – arabinoza i ksiloza. Saharoza i maltoza su najzastupljeniji disaharidi. Cerealije sadrže samo malu količinu slobodnih šećera, 1-2%, ali se taj procenat povećava u procesu klijanja, pri sladovanju (Kent i Evers, 1994; Shelton, 2000; Charalampopoulos et al., 2002; McKeivith, 2004). Izuzev tri- i tetrasaharida, oligosaharidi predstavljaju relativno retke komponente cerealija (Shelton, 2000; Samala et al., 2015). Nekoliko tipova oligosaharida je prisutno u cerealijama, poput galaktozil-derivata saharoze, stahioze i rafinoze, zatim fruktozil-derivati saharoze i frukto-oligosaharida (Charalampopoulos et al., 2002).

Antioksidansi integralnih cerealija skoncentrisani su u mekinjama i klici zrna i uključuju minerale, vitamine, karotenoide, polifenole, alkilrezorcinole, betain, holin, sumporne aminokiseline, fitinsku kiselinu, lignane i avenantramid (Masisi et al., 2016). Cerealije i prehrambeni proizvodi na bazi cerealija smatraju se važnim izvorom ovih fitohemikalija u ljudskoj ishrani, jer se ovakvi proizvodi konzumiraju svakodnevno i u velikim količinama širom sveta (Shahidi i Liyana-Pathirana, 2008).

U pogledu hemijskih konstituenata, kako sa kvalitativnog, tako i sa kvantitativnog aspekta, primećene su značajne razlike između različitih vrsta cerealija, ali i između različitih sorti u okviru jedne iste botaničke vrste (Koehler i Wieser, 2013).

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) predstavlja jedan od najvažnijih useva i sirovinu koja se najviše prerađuje i konzumira (Dinelli et al., 2011). Veliku popularnost duguje svojoj osobini da daje visoke prinose pri veoma različitim uslovima i sposobnosti pšeničnog proteina – glutena, da formira testo specifičnih i veoma povoljnih visko-elastičnih svojstava.

Pšenica je jednogodišnja biljka, pripada porodici trava *Poaceae* (*Gramineae*) i rodu *Triticeae* (Arendt i Zannini, 2013). Prvobitno uzgajane sorte pšenice su diploidni ajkorn (*T. monococcum* L., AA) i tetraploidni emer (*T. dicoccum* Schrank, AABB). Početkom

srednjeg veka spelta (*T. spelta* L., AABBDD) je bila najdominantnija sorta. Međutim, njih je u prethodna dva veka skoro potpuno potisnula heksaploidna hlebna pšenica (*T. aestivum* L. subspecies *vulgare*, AABBDD), koja se odlikuje višim prinosima i kod koje se vršidba odvija lakše. Pored hlebne pšenice, trenutno se jedino tetraploidna durum pšenica (*T. durum* Desf., AABB) uzgaja u značajnijim količinama, oko 5% ukupno uzgajane pšenice (McKevith, 2004; Arendt i Zannini, 2013; Ziegler et al., 2016).

Spoljašnji omotač zrna pšenice – perikarp, bogat je pentozanima, celulozom i mineralnim materijama. Aleuronski sloj anatomski pripada endospermu, ali se prilikom obrade zrna mlevenjem uklanja zajedno sa perikarpom. Aleuron je bogat enzimskim proteinima, lipidima, pentozanima, mineralnim materijama i kompleksom B vitamina. Skrob je skoncentrisan u endospermu. Embrio i skutelum, koji zajedno sačinjavaju klicu, sadrže velike količine proteina, lipida i liposolubilnog vitamina E, šećera (saharoze i rafinoze) i mineralnih materija.

Tvrdoća, struktura i sadržaj proteina endosperma značajno se razlikuju kod različitih sorti pšenice, i utiču na proces mlevenja. Sa porastom sadržaja proteina raste i tvrdoća endosperma. Sorte različite tvrdoće endosperma melju se na različite načine, pri čemu se dobija brašno različitih osobina, koje je pogodno za različitu krajnju upotrebu. Sorte pšenice koje se odlikuju mekim, brašnastim endospermom, pogodne su za proizvodnju biskvita, kolača, krepera i krofni, dok su sorte tvrdog, staklastog endosperma pogodne za proizvodnju hleba. Tvrda durum pšenica koristi se u proizvodnji testenina (Posner, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

Razvojem biotehnologije omogućena je manipulacija genetičkim karakteristikama, čime se dobijaju sorte sa različitim osobinama, prinosom, hemijskim sastavom i krajnjom upotrebom (Posner, 2000; Arendt i Zannini, 2013). Mora se naglasiti da se mogu očekivati veće varijacije u hemijskom sastavu zrna pšenice i usled uticaja različitih faktora okoline (Arendt i Zannini, 2013).

Formiranjem intermolekulskih disulfidnih veza glutenin i gliadin zajedno formiraju gluten, koji je odgovoran za povoljna visko-elastična svojstva testa od pšeničnog brašna (Lookhart, 2000; Posner, 2000; Gao et al., 2010; Escarnot et al., 2012). Pored različitih sorti pšenice, smatra se da jedino raž sadrži skladišne proteine, koji imaju sposobnost formiranja glutenske mreže jedinstvenih osobina (Lookhart, 2000; Posner, 2000; Arendt i Zannini, 2013). Masisi et al. (2016) ispitivali su antioksidativna svojstva rafinisanog i integralnog pšeničnog brašna i utvrdili da je hleb proizveden od integralnog pšeničnog brašna superiorniji u smislu *in vitro* antioksidativnih svojstava (Masisi et al., 2016).

Kukuruz (*Zea mays* L.) vodi poreklo sa zapadne hemisfere (McKevith, 2004) i, zajedno sa pšenicom i pirinčem, predstavlja najšire uzgajanu cerealiju (Arendt i Zannini, 2013). Pojedini autori smatraju da potiče iz Meksika i predstavlja jedno od Kolumbovih otkrića u Novom svetu, 1492. godine, koje su tamošnji stanovnici nazivali *mahyz*. Kukuruz se danas proizvodi na svakom kontinentu, izuzev Antarktiku. Zbog visoke produktivnosti predstavlja ekonomski veoma značajnu cerealiju, važan i jeftin izvor

energije u ishani životinja, kao i izvor skroba i šećera koji se primenjuju u prehrambenim i industrijskim proizvodima (Johnson, 2000; Lookhart, 2000; McKevith, 2004).

Kukuruz je visoka jednogodišnja diploidna biljka koja, kao i ostale cerealije, pripada familiji trava (*Poaceae*). Zrno se nalazi na klipu, a svako se sastoji iz: omotača zrna – perikarpa, koji je bogat celulozom; aleuronskog sloja – bogatog proteinima i mineralnim materijama; endosperma - bogatog skrobom, koji je obmotan proteinskim matriksom i predstavlja rezervoar nutrijenata; i klice, iz koje se razvija nova biljka. Klica čini čak 11% s.m. zrna kukuruza, što je mnogo veći udeo u odnosu na ostale cerealije (Arendt i Zannini, 2013). Kukuruz ima najveće zrno od svih cerealija (Johnson, 2000; Lookhart, 2000).

Iako postoje stotine različitih sorti, samo nekoliko tipova kukuruza se uzgajaju u većim količinama. Različiti tipovi odlikuju se različitim sastavom, kako u kvalitativnom - tako i u kvantitativnom smislu. Takođe, imaju različite udele brašnog i staklastog endosperma, kao i zeina (Johnson, 2000; Lookhart, 2000; Singh Sandhu et al., 2007; Arendt i Zannini, 2013). Pored razlika u endospermu, mogu da se razlikuju i u boji perikarpa, pri čemu neki mogu biti tipične žute boje, dok drugi mogu biti beli, crveni ili plavi. Pojedine sorte karakteriše visok sadržaj proteina, dok druge karakteriše visok sadržaj lipida. Hibridi sa visokim sadržajem lipida koriste se u ishrani domaćih životinja, jer obezbeđuju visok unos energije. Međutim, ne koriste se u mlevenju i proizvodnji brašna, zbog povećanog rizika od lipidne oksidacije i užegnuća, što skraćuje rok upotrebe ovih proizvoda. Iako postoji odbojnost mnogih potrošača, naročito u Evropi, prema genetičkim modifikacijama kukuruza i razvoju transgenih sorti, neki veruju da su ovakve sorte potpuno bezbedne i praktično neophodne, kako bi se zadovoljile prehrambene i industrijske potrebe konstantno rastuće ljudske populacije (Johnson, 2000; Lookhart, 2000).

Hemijski sastav zrna kukuruza, udeo skroba, kao i odnos amiloze i amilopektina, udeo proteina i aminokiselinski sastav proteina, u velikoj meri zavise od hibrida, a u novije vreme i od genetičkih modifikacija (Johnson, 2000; Lookhart, 2000). Tipično zrno kukuruza se u proseku sastoji iz 70-75% skroba, 8-10% proteina, 4-5% lipida, 1-3% šećera i 1-4% pepela, a bogato je i fitosterolima (Arendt i Zannini, 2013).

Nekada je kukuruz bio isključivo korišćen u ishrani životinja, a danas je njegova primena proširena na širok spektar prehrambenih proizvoda, koji se konzumiraju širom sveta. Među njima su brašno i pekarski proizvodi, hleb, kolači, biskviti, kornfleks, kokice, palačinke, palenta, tortilje i drugi (Johnson, 2000). Kako kukuruz ne sadrži funkcionalni gluten, kukuruzno brašno se u proizvodnji hleba obično meša sa pšeničnim brašnom. Odsustvo gliadinske frakcije i prisustvo lako svarljivih ugljenih hidrata čine kukuruz jednom od pogodnih sirovina za proizvodnju brašna za proizvode namenjene ljudima obolelim od celijske bolesti (Chanvrier et al., 2005; Arendt i Zannini, 2013).

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je predstavljao važan usev još u Neolitskom i Bronzanom dobu, a to predstavlja i danas. Kroz istoriju se koristio kako u proizvodnji piva, tako i u ishrani ljudi i životinja. Po ukupnoj svetskoj proizvodnji na četvrtom je

mestu, iza pšenice, kukuruza i pirinča (Hockett, 2000; Arendt i Zannini, 2013). Kao i ostale cerealije pripada porodici trava *Poaceae*, odnosno *Gramineae*. Vrstu *H. vulgare* čine dve podvrste *H. vulgare* subsp. *vulgare* – kultivisani ječam i *H. vulgare* subsp. *spontaneous* – divlji ječam. Pored njih uzgaja se i golozrni ječam, *H. vulgare* var. *nudum*, kod koga se ljuska lako uklanja i koji se koristi kao sastojak različitih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću.

Zrno ječma je svetlo žute boje, većih dimenzija i šiljatijeg oblika u odnosu na pšenicu. Međutim, u zavisnosti od sadržaja antocijanina u omotaču, boja može da bude i ljubičasta, plava ili crna. Zbog antioksidativnih svojstava ovi tipovi ječma primenjuju se u formulacijama funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Arendt i Zannini, 2013).

Najbolje uspeva u hladnim i suvim uslovima. Zbog mogućeg razvoja različitih fitopatogena ne uspeva dobro u jako vlažnim i toplim uslovima. Ukoliko na određenom području dobro uspevaju i pšenica i ječam, pšenica se obično uzgaja za ishranu ljudi, a ječam za ishranu životinja i proizvodnju slada. Otpornost na hladnoću nije tako izražena kao kod raži ili pšenice, ali je bolja u odnosu na ovas. Ječam je najotporniji na sušu od svih cerealija (Hockett, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

Jari ječam treba da se seje što ranije u proleće zbog najvećeg prinosa, osim u slučaju pojave mrazeva u tom periodu. Ozimi ječam ne bi trebalo da se seje u ranu jesen zbog potencijalnih problema sa biljnim vašima i bolestima (Hockett, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

Zrno ječma bogato je skrobom i šećerima, sadrži relativno male količine proteina i veoma male količine masti. Ljuska se sastoji većinom iz lignina, pentozana, hemiceluloze i celuloze. Sadrži i silicijum, kojeg naročito mnogo ima u osju. Polifenoli su prisutni u perikarpu i aleuronskom sloju. Aleuronski sloj sadrži i proteine, fitinsku kiselinu i minerale, a ćelijski zidovi su bogati arabinoksilanom. Subaleuronski sloj ima relativno malo skroba, ali je bogat proteinima i enzimima, poput β -amilaze. Ćelijski zid endosperma sadrži oko 75% β -glukana, a ostatak čine arabinoksilani. Klica se sastoji od celuloze, lipida, prostih šećera (saharoze i rafinoze) i proteina. Sadrži i minerale, fitin i fenolne komponente, od kojih je najzastupljenija ferulna kiselina (Hockett, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

Danas se mala količina ječma koristi u ishrani čoveka, i to najčešće u obliku brašna za proizvodnju hleba, peciva, testenina, u obliku različitih kaša i kao supstituent kafe. Može se reći da se većinom koristi u ishrani domaćih životinja, a naročito svinja, u proizvodnji slada i piva, a nekada i u proizvodnji alkoholnih pića, poput viskija, džina i vodke (McKevith, 2004; Brennan i Cleary, 2005; Arendt i Zannini, 2013). S obzirom na široku mogućnost primene u ljudskoj ishrani, može se oceniti da je ječam nedovoljno iskorišćena cerealija. U poslednje vreme se povećava zainteresovanost za uključivanje ječma u ljudsku ishranu, jer se velika pažnja poklanja primeni dijetetskih vlakana, a naročito β -glukana ječma, u formulaciji prehrambenih proizvoda sa funkcionalnim svojstvima. Smatra se da ima viši sadržaj β -glukana u zrnu, u odnosu na druge cerealije. Jedini konkurent u ovom smislu je zrno ovasa. (Wood, 1997; Charalampopoulos et al., 2002; Brennan i Cleary, 2005; Havrlentová i Kraic, 2006; Arendt i Zannini, 2013). Često

se dodaje kao funkcionalna komponenta pekarskim proizvodima, kako bi se dobili proizvodi sa dodatom vrednošću zbog zdravstvenih benefita koje β -glukan nesumnjivo pruža. Takav β -glukan se najčešće izoluje upravo iz zrna ječma. Jedan od glavnih limitirajućih faktora industrijske upotrebe β -glukana je cena ekstrakcije ovog vlakna iz zrna. S tim u vezi, dodatak izolovanog β -glukana kao funkcionalnog sastojka se uglavnom izbegava, zbog mnogo jeftinije primene ječmenog i ovsenog brašna u formulaciji prehrambenih proizvoda (Shelton, 2000; Charalampopoulos et al., 2002; Brennan i Cleary, 2005).

Neki autori su utvrdili značajno viši antioksidativni kapacitet ječma u odnosu na ovas i pšenicu, čak oko 6 puta, iako je sadržaj fenolnih komponenata viši oko 2 puta. Smatra se da je uzrok toga flavanol katehin, koji je karakterističan za zrno ječma i koji ima antioksidativni kapacitet značajno viši od mnogih fenolnih jedinjenja (Mikulajová et al., 2007). Mnoge studije ocenjuju ječam kao potencijalnu sirovinu u proizvodnji zdrave hrane (Ragae et al., 2006; Arendt i Zannini, 2013).

Ovas kao i druge cerealije pripada porodici trava, *Poaceae (Gramineae)* (Arendt i Zannini, 2013). Postoji mnogo različitih sorti ovasa, a najčešće se uzgaja jari ili beli heksaploidni ovas (*Avena sativa* L.). Ovaj tip ovasa je jednogodišnja trava, ima sličnu strukturu kao i ostale cerealije i uzgaja se u hladnijim područjima. Šesta je cerealija po obimu proizvodnje, nakon pšenice, kukuruza, pirinča, ječma i sirka (McMullen, 2000; Arendt i Zannini, 2013). Ovas uspeva na različitim tipovima zemljišta, na kiselom, na baznom zemljištu, a otporan je i na visok sadržaj mangana (Arendt i Zannini, 2013).

Ljuska sačinjava oko 30-40% zrna ovasa i sastoji se od celuloze i hemiceluloze, uz manje količine lignina. Zrno se, tipično za cerealije, sastoji od klice koje je bogata proteinima i lipidima, endosperma bogatim skrobom i β -glukanom i omotača zrna, u kome su skoncentrisani vitamini, minerali, fitati i antioksidansi. Klica čini oko 3%, omotač oko 40%, a skrobni endosperm oko 60% zrna (Arendt i Zannini, 2013).

Kao što je poznato, intolerancija na gluten može da izazove celijačnu bolest, što dovodi do zapaljenja tankog creva i loše apsorpcije nutrijenata pri varenju. U ishrani obolelih izbegavaju se proizvodi od pšenice, raži, ječma, spelte, ovasa, i svih njihovih hibrida. Međutim, pojedine studije ukazuju na to da ovas nema štetno dejstvo u ishrani ljudi obolelih od celijakije (Kasarda i D'Ovidio, 1999; Janatuinen et al., 2002; Størsrud et al., 2003; Butt et al., 2008).

Ovas se najčešće uzgaja za ishranu stoke, a samo mali udeo ukupne proizvodnje koristi se u ljudskoj ishrani (Størsrud i sar., 2003). Istraživanja nutritivnih atributa ovasa, u smislu pozitivnog dejstva na ljude sa simptomima dijabetesa i povišenim nivoima holesterola u krvi, dovela su do razvoja sorti sa povišenim sadržajem β -glukana (McMullen, 2000; Charalampopoulos et al., 2002). Rezultati nekih studija sugerišu da se konzumiranjem integralnih cerealija, a naročito ovasa, može uticati na smanjenje krvnog pritiska. Međutim, nije dokazano da ova pojava nužno ima veze sa povećanim unosom β -glukana (Wood, 2007). Administracija za hranu i lekove (FDA) u SAD objavila je 1997.

godine tvrdnju da ishrana bogata dijetetskim vlaknima zrna ovsa, a u vidu različitih proizvoda od integralnog brašna, može da utiče na smanjenje rizika od razvoja kardiovaskularnih oboljenja (US FDA, 1997; Havrlentová i Kraic, 2006; Arendt i Zannini, 2013).

Stoga se može reći da je ovas prirodna funkcionalna hrana. Ovas je dobar izvor rastvorljivih vlakana, esencijalnih aminokiselina, nezasićenih masnih kiselina (oleinske, linolne i linoleinske), vitamina (naročito B1), minerala (fosfora i gvožđa), i različitih fitohemikalija. Ovas je i izvor mnogih komponenata koje ispoljavaju antioksidativno dejstvo. Među njima su tokoli (vitamin E), fitinska kiselina, fenolne komponente, avenantramidi (fenolni antioksidansi karakteristični isključivo za zrno ovsa) i steroli (Arendt i Zannini, 2013).

Iako se konzumira u značajno manjim količinama u odnosu na, na primer, pšenicu i pirinač, ovas je veoma važna komponenta ishrane, jer se uglavnom koristi u obliku celog zrna. Time se u prehrambenim proizvodima zadržavaju antioksidativna svojstva ove cerealije (Peterson, 2001).

Kako postoje pretpostavke da je uključivanje ovsa u ishranu povezano sa različitim zdravstvenim benefitima, postoje sve veći zahtevi za širenjem asortimana prehrambenih proizvoda od ovsa (McMullen, 2000). U ljudskoj ishrani najčešće se koristi u vidu hrane za odojčad, muslija za doručak, hleba, biskvita i keksa. Zbog sadržaja β -glukana i odsustva glutena, ili njegovog prisustva u jako maloj meri, teško je dobiti pekarske proizvode odgovarajuće zapremine i teksture. U proizvodnji se zbog toga uglavnom meša sa pšenicom. U poslednje vreme je razvojem tehnologije proizvodnje dobijen bezglutenski proizvod – ovseni hleb, sa 51% do čak 100% ovsa. Koristi se i u proizvodnji piva, ali najčešće kao dodatak ječmu (Arendt i Zannini, 2013).

Raž se smatra mlađom cerealijom u odnosu na većinu drugih. Kultivisana raž (*Secale cereale* L.) najverovatnije vodi poreklo od divlje raži mediteranskog regiona - *Secale montanum*. Neki agronomi i oplemenjivači tvrde da je *Secale anatolicum* iz jugozapadne Azije njen pravi predak. Raž pripada porodici trava i rodu *Secale*, a danas se jedino diploidni *Secale cereale* L. uzgaja u velikim količinama (Klaus, 2000).

Raž kao botanička vrsta genetski je bliska pšenici i ječmu, i smatra se da imaju zajedničko poreklo. U ukupnoj proizvodnji cerealija na svetu, raž se proizvodi manje od 1%. Međutim, posle pšenice, raž je cerealija najvažnija u proizvodnji hleba (Arendt i Zannini, 2013).

Raž se uglavnom seje u jesen, poput ozime pšenice (Arendt i Zannini, 2013). Karakteristična je za hladnije predele i klime sa malo vlage. Može da podnese niske temperature mnogo bolje od drugih cerealija, pa je glavna hlebna cerealija u najsevernijim delovima sveta. Može da se adaptira na kvalitet skoro svakog zemljišta, bez obzira na malu plodnost, visoke temperature i sušu, a čak i u takvim uslovima daje relativno visoke i stabilne prinose (Klaus, 2000; McKevith, 2004; Ragaei i sar., 2006; Arendt i Zannini, 2013). Raž može da se uzgaja na kiselom zemljištu, toleriše visoke

nivoa aluminijuma, može da se uzgaja iznad Arktičkog kruga u Skandinaviji, blizu Antarktičkog kruga u Čileu, kao i na nadmorskim visinama od 4300 metara, na Himalajima (Arendt i Zannini, 2013). Raž se, međutim, većinom uzgaja u Evropi, pri čemu se najveći deo kultivisane površine nalazi u Rusiji, a potom i u ostalim severnim zemljama. Zanimljivo je da u SAD i Kanadi ne postoje standardi za određivanje identiteta ražanog brašna (Klaus, 2000).

Endosperm čini 86,5% zrna raži, perikarp 10%, a klica (embrio i skutelum) 3,5% zrna. Spoljašnji slojevi zrna, a naročito aleuronski sloj, bogati su vitaminima, mineralima i fitatima, endosperm je bogat skrobom i proteinima, a klica lipidima i proteinima. U odnosu na pšenicu raž sadrži manje skroba i proteina, a više dijetetskih vlakana i slobodnih šećera. Zbog povećanog sadržaja vlakana i visokog sadržaja vitamina i minerala, raž može uspešno da se primenjuje u formulacijama funkcionalne hrane. Raž, dakle, formira gluten i nije pogodna u ishrani obolelih od celijakije, ali se može reći da sadrži proteine boljeg kvaliteta u odnosu na pšenicu, u smislu boljeg odnosa esencijalnih aminokiselina (Arendt i Zannini, 2013).

Tritikale (*Triticosecale* Wittmack) je prva cerealija koju je stvorio čovek ukrštajući pšenicu i raž. Ova veštačka vrsta ima vrlo kratku istoriju - nešto više od sto godina (Ma i Gustafson, 2008; Arendt i Zannini, 2013).

U 2009. godini čak 78% ukupne proizvodnje tritikalea može se pripisati Nemačkoj i Poljskoj, zbog bolje tolerancije tritikalea prema klimatskim uslovima ovih severnih zemalja u odnosu na pšenicu (Arendt i Zannini, 2013). Pod određenim uslovima, tritikale može dati više prinose u odnosu na obe roditeljske vrste (Arendt i Zannini, 2013).

Tritikale u sebi sadrži A i B genome durum pšenice i R genom raži. Kreiran je sa ciljem da se ukombinuju visok prinos i dobar kvalitet pšenice sa otpornošću na bolesti i toleranciju na spoljašnje faktore, uključujući i niske temperature, koje su karakteristike raži. Može da se uzgaja na zemljištu lošeg kvaliteta, dajući pri tome mnogo bolje prinose od pšenice (Varughese et al., 1987; Rakha et al., 2011; Arendt i Zannini, 2013). Zrno tritikalea je veće u odnosu na roditeljske vrste i ima veću težinu. Morfološki i po hemijskom sastavu je sličnije pšenici nego raži, s obzirom da dva genoma preuzima od pšenice, a jedan od raži (Darvey i Naeem, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

Tritikale se najčešće koristi kao stočna hrana, ali u nešto manjoj meri i u ishrani čoveka, na primer u formulaciji hleba, kao zamena za meku pšenicu u biskvitima, keksu i kolačima (Varughese et al., 1987; McKeivith, 2004; Rakha et al., 2011). Brašno tritikalea se može koristiti u većoj količini u proizvodnji pekarskih proizvoda, ukoliko se meša sa pšeničnim brašnom (Varughese et al., 1987). Međutim, ukoliko se koristi u proizvodnji hleba, pažnja se mora posvetiti formulaciji, s obzirom da tritikale sadrži manje glutena nego pšenica, pa samostalno ne predstavlja dobru sirovinu (McKeivith, 2004; Arendt i Zannini, 2013). U eksperimentima gde su pravljene različite vekne hleba sa različitim odnosima pšeničnog brašna i brašna tritikalea, pokazano je da se u zavisnosti od sorte u formulaciji uspešno može koristiti 50% do 60% brašna tritikalea (Darvey i Naeem,

2000; Arendt i Zannini, 2013). Dobar kvalitet hleba dobija se i mešavinama brašna tritikalea i ražanog brašna. Za to je tritikale pogodan, jer ima viši sadržaj lizina, viši sadržaj ukupnih proteina, kao i kvalitetniji mineralni sastav u odnosu na pšenicu (Arendt i Zannini, 2013).

S obzirom na činjenicu da je otporan usev, visokih prinosa i dobrog nutritivnog sastava, postoji verovanje da će tritikale imati značajan uticaj na suzbijanje gladi u svetu u budućnosti. Međutim, tritikale se i dalje ne uzgaja u velikim količinama zbog antinutritivnih osobina koje ispoljava pri ishrani stoke (usled visokog sadržaja dijetetskih vlakana u poređenju sa pšenicom) (Rakha et al., 2011). Međutim, upotreba tritikalea u ljudskoj ishrani se povećava, jer je fleksibilan na varijabilnost spoljašnjih uslova, pokazuje veću otpornost prema različitim bolestima i štetocinima u odnosu na svoje najbliže botaničke rođake, a nutritivnog je sastava koji odgovara ishrani čoveka. Pri kultivaciji mogu da se upotrebljavaju slične agrotehničke mere, kao i kod uzgoja pšenice i drugih cerealija. Ovo olakšava uvođenje tritikalea i širenje njegove proizvodnje. Tritikale je, sa izuzetkom raži, tolerantniji u odnosu na ostale cerealije na kiselost zemljišta, sadržaj aluminijuma, sadržaj mangana, različite vidove abiotičkog stresa, poput ekstremnih suša, ekstremnih temperatura, saliniteta zemljišta, smanjen sadržaj elemenata u tragovima, kao i povećan sadržaj toksičnih elemenata (Darvey i Naeem, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

Spelta zajedno sa još dve alternativne, kultivisane vrste pšenice, ajnkorn (*Triticum monococcum* L.) i emer (*Triticum dicoccum* L.), predstavlja jednu od najstarijih, takoreći, antičkih cerealija Evrope (Cubadda i Marconi, 2002; Gawlik-Dziki et al., 2012). Interesovanje za speltu i pekarske proizvode od brašna spelte raste iz godine u godinu, zbog sve većih potreba za nekonvencionalnom, ekološkom, jeftinom, zdravijom i specijalnom hranom (McKevith, 2004; Ruibal-Mendieta et al., 2004; An et al., 2005; Ruibal-Mendieta et al., 2005; Arendt i Zannini, 2013; Jankovic et al., 2015; Bönick et al., 2017).

Spelta (*Triticum spelta* L.) kao heksaploidna cerealija ustvari predstavlja podvrstu heksaploidne hlebne pšenice (*Triticum aestivum* L.) i zajedno sa njom pripada rodu *Triticum*. Međutim, ponekad se u literaturi smatra zasebnom vrstom, više zbog upotrebe nego drugačije genetike. Kao podvrsta pšenice, spelta se ponekad označava sa *T. aestivum* ssp. *spelta*, a hlebna pšenica kao *T. aestivum* ssp. *aestivum*. Kao i hlebna pšenica nosi AABBDD genome. Od nje se najviše razlikuje po prisustvu specifične ljuske, koja čini 21-32% zrna (Kasarda i D'Ovidio, 1999; Shewry, 2002; Escarnot et al., 2012). Dakle, za razliku od svog bliskog rođaka – pšenice, zrno spelte pre mlevenja u brašno i konzumiranja u ljudskoj ishrani mora da prođe kroz skup proces uklanjanja ljuske (Ruibal-Mendieta et al., 2005; Escarnot et al., 2012; Jankovic et al., 2015).

Iako se smatra da spelta ima veći sadržaj glutenskih proteina u zrnu u odnosu na pšenicu (45% do 55%), neki autori tvrde da proizvode od njenog brašna mogu da konzumiraju osobe alergične na gluten, jer glutenski protein spelte ne izaziva alergijske reakcije (Jankovic et al., 2015). Pojedini, takođe, tvrde da je spelta lakše svarljiva od pšenice, da

se odlikuje visokom nutritivnom vrednošću i povoljnim medicinskim svojstvima, te se s toga preporučuje u ishrani svih grupa potrošača (Ikanović et al., 2016). Drugi, međutim, tvrde da iste proteinske sekvence pšenice, koje su odgovorne za pojavu celijačne bolesti, postoje i kod spelte. Stoga spelta ne može biti prikladna za ishranu ljudi sa ovim poremećajem. Utvrđeno je da gliadin α -tipa pšenice i spelte pokazuje 98,5% homologije, tako da je sigurno da spelta ispoljava isti stepen toksičnosti za ovu grupu pacijenata (Kasarda i D'Ovidio, 1999). Takođe, velika genetička sličnost ukazuje na činjenicu da je mala verovatnoća da se pšenica i spelta razlikuju u pogledu nutritivnih svojstava. Tvrdnje da spelta predstavlja pogodnu sirovinu u ishrani ljudi obolelih od celijakije mogu da budu veoma opasne i da izazovu ozbiljne posledice po zdravlje obolelih (Ranhotra et al., 1995; Ranhotra et al., 1996; Shewry, 2000).

Spelta može da se uzgaja na predelima, na kojima druge cerealije ne uspevaju, zbog nepogodnog zemljišta i klimatskih uslova. Daje dobre prinose na vlažnom, hladnom zemljištu i velikim nadmorskim visinama. Takođe, zbog morfoloških karakteristika otporna je na štetočine i bolesti. Ona ne zahteva intenzivnu kultivaciju, hemijsku zaštitu i primenu azotnih đubriva, pa je pogodna za organsku proizvodnju. Međutim, prema hemijskom sastavu i karakteristikama brašna, spelta ne pokazuje nikakve prednosti u odnosu na brašno konvencionalne pšenice. Kao najveća prednost primene spelte u pekarskoj industriji navodi se mogućnost ekološkog uzgoja (Skrabanja et al., 2001; Pelillo et al., 2010; Gawlik-Dziki et al., 2012; Escarnot et al., 2012; Arendt i Zannini, 2013).

Hleb je najvažniji proizvod spelte, a ukoliko se pšenično brašno supstituiše speltinim, moguće je proizvesti i druge pekarske proizvode. Kvalitetne testenine mogu biti proizvedene od speltinog brašna, ukoliko je povoljan sadržaj proteina u zrnu (Cubadda i Marconi, 2002; Arendt i Zannini, 2013; Ikanović et al., 2016). Postoje dokazi da su komercijalno dostupna brašna spelte uglavnom mešana sa drugim, jeftinijim sastojcima. Polimerazna lančana reakcija (PCR) i elektroforeza gliadina (sastojka glutena) su do sada primenjivane tehnike u utvrđivanju autentičnosti speltinog brašna i njegovoj diskriminaciji od brašna pšenice. Međutim, biljne vrste sličnog sastava genoma, kao što su heksaploidna pšenica i spelta, kao i tetraploidna durum pšenica i emer, ispoljavaju veoma velike sličnosti i u gliadinskim frakcijama. S druge strane, kao dobar parametar za razlikovanje speltinog brašna predlaže se razlika u sastavu masnih kiselina (Ruibal-Mendieta et al., 2005).

Hleb proizveden od spelte ima nešto niži sadržaj skroba, a viši sadržaj proteina, u odnosu na hleb proizveden od konvencionalne pšenice. Istraživanja su pokazala da ovakav hleb ne pruža nikakve pogodnosti za obolele od dijabetesa. Međutim, zbog lakše svarljivosti skroba spelte može imati pogodan učinak kod individua kod kojih je neophodna nadoknada glikogena u mišićima (na primer nakon većih fizičkih napora), kao i kod osoba sa osetljivim gastrointestinalnim traktom (Skrabanja et al., 2001).

II-4. Pseudocerealijske

Danas, na početku trećeg milenijuma, samo tri botaničke vrste cerealijske: pšenica, pirinač i kukuruz dominiraju svetskim tržištem, čineći oko 75% ukupne poljoprivredne proizvodnje. Smatra se da uključivanje tako uskog spektra sorti cerealijske u svakodnevnu ishranu može da ima ozbiljne efekte po zdravlje čoveka, naročito zbog sve većeg nedostatka mikronutrijenata u ishrani. Pored toga, alergije i intolerancije na hranu i njene komponente sve su češća pojava, a pšenica i njeni proizvodi već sasvim sigurno predstavljaju problem u ovom smislu. Definitivno je dokazano da uključivanje šireg spektra biljnih proizvoda u ishranu ima brojne prednosti, jer se time obezbeđuje unos raznovrsnih funkcionalnih komponentata sa poželjnim fiziološkim efektima, poput antioksidativnog dejstva i snižavanja nivoa holesterola u serumu. Čovek je kroz istoriju uzgajao brojne biljke, koje je koristio za ishranu, kako prave cerealijske, tako i drugačije useve, poput pseudocerealijske. Pseudocerealijske su dikotiledone biljne vrste, koje botanički nisu srodne monokotiledonim pravim cerealijskama, poput pšenice, ječma i pirinča, ali daju slično zrno i imaju krajnju upotrebu kao i prave cerealijske. Sve potiču iz nepovoljnih agro-ekoloških uslova, pa se u takvim mogu i uzgajati. Najveći problem u primeni ovih biljnih vrsta u ishrani predstavlja proizvodnja prehrambenih proizvoda, koji ne bi imali toliko različit ukus u odnosu na proizvode od konvencionalnih cerealijske, na koje su potrošači navikli dugogodišnjim konzumiranjem. Dodatno, one ne sadrže gluten, protein koji je odgovoran i neophodan za dobijanje testa i hleba visokog kvaliteta (Belton i Taylor, 2002).

Jedan od glavnih razloga za rastući interes prema pseudocerealijskama, poput amarantusa i heljde, jeste njihov odličan nutritivni sastav. Naime, pored toga što su važni izvori energije zbog visokog sadržaja skroba, ove pseudocerealijske predstavljaju i odličan izvor dijetetskih vlakana, kvalitetnih proteina povoljnog aminokiselinskog sastava i lipida bogatih nezasićenim masnim kiselinama. Sadrže i adekvatne količine važnih mikronutrijenata, poput minerala i vitamina, kao i bioaktivnih komponentata: saponina, fitosterola, skvalena, fagopiritola i polifenola (Alvarez-Jubete et al., 2010b).

Zbog sve većeg porasta obolelih od celijačne bolesti, intolerancije na gluten i drugih alergijskih reakcija, raste i potreba za širenjem asortimana bezglutenskih prehrambenih proizvoda. Celijačna bolest je doživotna intolerancija na prolaminsku frakciju pšenice (gliadin), raži (sekalin), ječma (hordein) i najverovatnije ovsu (avenin) (Codex Alimentarius Commission, 2000; Gallagher et al., 2004). Svetska zdravstvena organizacija (WHO) i Američka administracija za hranu i lekove (FDA) definišu gluten kao *proteinsku frakciju pšenice, raži, ječma, ovsu i njihovih hibrida (poput tritikalea), koja nije rastvorljiva u vodi i 0,5 M natrijum-hloridu, i na koju su pojedine individue intolerantne*. Prolamini su glutenska frakcija koja može da se ekstrahuje rastvorom 40-70%-etanola u vodi. Sadržaj prolamina u glutenu je oko 50%. Međutim, u govoru se ipak ustalila fraza *intolerancija na gluten* (Codex Alimentarius Commission, 1997).

Prilikom ingestije glutena kod obolelih od celijačne bolesti dolazi do zapaljenja tankog creva, što dovodi do poremećaja u apsorpciji nekoliko važnih nutrijenata, poput gvožđa, folne kiseline, kalcijuma i liposolubilnih vitamina. Smatra se da je celijačno oboljenje rezultat tri faktora: genetičke predispozicije, spoljašnjih uticaja i imunološki izazvanog zapaljenja, što sve zajedno dovodi do oštećenja mukoze tankog creva. Jedini efikasan način lečenja je doživotno i striktno pridržavanje bezglutenskog načina ishrane, što dovodi do isceljenja oštećenja prouzrokovanih ovom bolešću (Gallagher et al., 2004).

Prehrambeni proizvodi koji se moraju izbegavati u bezglutenskom režimu ishrane obuhvataju: (i) hleb, cerealije i druge prehrambene proizvode dobijene od pšenice (svih vrsta iz roda *Triticum*, poput spelte, kamuta i durum pšenice), raži, tritikalea, ječma i ovsa, kao i svih sporednih produkata ovih cerealija i njihovih hibrida; (ii) procesuiranu hranu koja sadrži proizvode od pšenice i glutena, poput zgušnjivača i punilaca (hot-dog, prelive za salate, gotove supe, prerađen sir, razni kremovi); i (iii) lekove kod kojih gluten ulazi u sastav kapsula i tableta (Codex Alimentarius Commission, 2000; Gallagher et al., 2004).

Amarantus (*Amaranthus* spp., grčki *večit*, *večni*) vodi poreklo iz Južne Amerike - Ekvadora, Perua i Bolivije. Čak i astronauti *NASA*-e koristili su amarantus kao deo svoje ishrane u svemiru. Zbog odličnog nutritivnog sastava predstavlja pogodnu alternativnu sirovinu proširenog spektra proizvoda u ljudskoj ishrani. Međutim, i dalje su neophodni intenzivni radovi na oplemenjivanju ove biljke. Takođe, neophodna su i dalja istraživanja na polju tehnologije, kako bi se dobili proizvodi prihvatljivi od strane potrošača u industrijalizovanim zemljama (Berghofer i Schoenlechner, 2002; Arendt i Zannini, 2013).

Zbog povoljnih agronomskih, nutritivnih i funkcionalnih karakteristika, u poslednjih nekoliko decenija raste interesovanje za primenu amarantusa u ishrani. Može se reći da je amarantus bogatiji proteinima i lipidima, a sadrži manje skroba u odnosu na klasične cerealije. Zrno amarantusa bogato je i fitohemikalijama (sekundarnim metabolicima), poput rutina, nikotiflorina i izokvercetina, koje imaju pozitivno dejstvo na zdravlja čoveka, a ne sadrži gluten, pa se može koristiti u ishrani obolelih od celijakije. Takođe, biljka je otporna, prilagodljiva, jednostavna i zahvalna za uzgoj (Arendt i Zannini, 2013).

U botaničkom smislu amarantus pripada familiji dikotiledonih biljaka *Amaranthaceae*, koja obuhvata više od 60 vrsta, od kojih su većina korovi. Mogu da rastu u širinu i u visinu, a postoje kako niske, tako i sorte koje narastu i do 4 metra visine. U smislu kultivacije ova biljka nije zahtevna, pa uspeva kako na bogatom i plodnom, tako i na siromašnom zemljištu, otporna je na sušu i može da podnese nedostatak vode bez uvenuća, a gaji se i na nadmorskim visinama od 3500 metara. Ukoliko se uporedi prosečni prinos amarantusa i pšenice, može se zaključiti da amarantus daje odlične prinose, pogotovo ako se uzme u obzir da je do sada mnogo više rađeno na oplemenjivanju i unapređenju kvaliteta pšenice (Berghofer i Schoenlechner, 2002; Arendt i Zannini, 2013).

Tri botaničke vrste amarantusa su najrasprostranjenije: *A. hypochondriacus* (Meksiko), *A. cruentus* (Gvatemala) i *A. caudatus* (Peru i u ostale zemlje u Andima). Od ovih vrsta *A. hypochondriacus* se najšire i najdetaljnije ispituje.

Zrno amarantusa liči na zrno kvinoje, jer poseduje centralni perisperm, okružen klicom i ostacima endosperma. Skladišni proteini nalaze se u klici, a ćelije skroba su smeštene u perisperm (Shewry, 2002; Alvarez-Jubete et al., 2010a). Omotač zrna amarantusa je veoma gladak i tanak, pa za razliku od druge dve pseudocerealije – heljde i kvinoje, nije neophodno uklanjati ga. To znači da se zrno u većini slučajeva može koristiti direktno (Berghofer i Schoenlechner, 2002; Arendt i Zannini, 2013). Boja zrna varira od mlečno bele, do žute, zlatne, crvene, braon ili crne, što zavisi od sadržaja pigmenta betacijanina (Berghofer i Schoenlechner, 2002; Arendt i Zannini, 2013). Zrna amarantusa su veoma mala, 1-1,5 mm u prečniku, oblika sočiva i teže 0,6-1,3 mg po zrnu. Struktura zrna se, kao i kod kvinoje, znatno razlikuje u odnosu na cerealije. Klica je cirkularnog oblika i okružuje perisperm, te čini veliki udeo zrna, oko 25% težine. Perisperm je bogat skrobom. Udeo ljuske u zrnu (omotača i klice zajedno) je mnogo veći nego kod konvencionalnih cerealija (Alvarez-Jubete et al., 2010a; Arendt i Zannini, 2013).

Brašno amarantusa se može koristiti u proizvodnji različitih vrsta hleba, poput čapatija i tortilja, ali ne i hleba s kvascem, jer zbog nedostatka glutena nema sposobnost zadržavanja gasova (Arendt i Zannini, 2013). Kako ne sadrži gluten, pogodan je za ishranu obolelih od celijakije (Bruni et al., 2001; Berghofer i Schoenlechner, 2002). Prema sadašnjim tehnološkim dostignućima, može se dodati pšeničnom brašnu bez promene kvaliteta proizvoda do 20%, sa ciljem proizvodnje hleba i testenina. Povećanim dodatkom zrna amarantusa dobijaju se testenine previše meke teksture i hleb manje zapremine. Zbog dobrih nutritivnih osobina, često se dodaje kukuruznom brašnu, jer se time dobija kombinacija idealno izbalansiranog aminokiselinskog sastava (Berghofer i Schoenlechner, 2002; Arendt i Zannini, 2013). Međutim, neki autori tvrde da je moguće dodati i 30-40% sirovog brašna, a pojedini čak i 60-70% brašna amarantusa, u formulacijama pekarskih proizvoda (Arendt i Zannini, 2013).

Sadržaj lipida u zrnu amarantusa viši je nego kod cerealija i iznosi 6-9%. Prema nekim autorima sadržaj lipida u amarantusu je 2 do 3 puta veći u odnosu na heljdu i konvencionalne cerealije (Alvarez-Jubete et al., 2009; Alvarez-Jubete et al., 2010a). Skvalen je u biljnom svetu naročito zastupljen u ulju amarantusa (6-8%). Neosapunjiva frakcija ulja amarantusa većinski se sastoji od skvalena. (Bruni et al., 2001; Berghofer i Schoenlechner, 2002; He i Corke, 2003; Tikekar et al., 2008). Čak se smatra da je amarantus najbogatiji izvor skvalena među biljkama (Tikekar et al., 2008).

Heljda. Kao ni amarantus, heljda nije cerealija, ali se vrlo često poistovećuje sa njima, kako zbog načina kultivacije, tako i zbog primene. Koristi se i kao hrana i kao lek u narodnoj medicini (Kim et al., 2004). To je jednogodišnja biljka, koja pripada familiji *Polygonaceae* i tipično raste 0,6-1,5 metara u visinu. Cvetovi heljde su bele ili belo-roze boje (Arendt i Zannini, 2013).

Za ljudsku upotrebu uzgajaju se dva tipa heljde: konvencionalna heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench) i tatarska heljda (*Fagopyrum tataricum* L.). Na širem geografskom području uzgaja se konvencionalna, dok se uzgoj tatarske heljde uglavnom ograničava na predele sa lošijim klimatskim uslovima, jer je otporna na mraz. U Evropi predstavlja jedan od najvažnijih alternativnih useva, jer je pogodna za ekološki uzgoj bez primene veštačkih đubriva i pesticida (Bonafaccia et al., 2003; Alvarez-Jubete et al., 2010a; Arendt i Zannini, 2013). Smatra se da uzgoj heljde potiče iz Kine, čak 1000 godina pre nove ere, a sada se najčešće uzgaja na severnoj hemisferi - u Rusiji, Ukrajini i Kazahstanu. Tatarska heljda se uglavnom konzumira tamo gde se i kultiviše, pa ne dospeva na svetsko tržište i nema veći komercijalni značaj (Arendt i Zannini, 2013).

Zrno heljde je blago trouglastog oblika, dužine 4-9 mm. Zrno tatarske heljde je manje (4-5 mm) i zaobljenije u odnosu na klasičnu (Biacs et al., 2002; Alvarez-Jubete et al., 2010a). Trouglasto zrno može biti braonsive do braoncrne boje (Arendt i Zannini, 2013). Zrno heljde sastoji se od omotača - perikarpa, spermoderma, endosperma i klice. Rezerve skroba nalaze se kao i kod cerealija u endospermu, kroz koji se prožima klica sa svoja dva kotiledona. Klica je bogata proteinima, a endosperm je bogat skrobom. Okružen je aleuronskim slojem, koji je bogat proteinima (Shewry, 2002; Alvarez-Jubete et al., 2010a; Arendt i Zannini, 2013).

Kultivacija heljde značajna je i u aleopatiji, zbog prirodne kontrole rasta korova, bez primene hemijskih sredstava. Naime, pokazalo se da supstance koje luči koren heljde stimulišu rast ovsa, a suzbijaju rast korova (Kalinova et al., 2007).

Sve veći zahtevi za prehrambenim proizvodima od heljde potiču od njenog pozitivnog dejstva na zdravlje čoveka. Zrno heljde se može koristiti u ishrani u celom ili samlevenom obliku. Heljda je veoma pogodna za suplementaciju cerealija u formulacijama različitih proizvoda, a naročito za supstituciju pšeničnog brašna. Nutritivna vrednost heljde superiornija je u odnosu na pšenicu i pirinač. Skoro svi delovi biljke mogu imati veoma širok spektar upotrebe (Biacs et al., 2002; Alvarez-Jubete et al., 2010a). U proizvodnji prehrambenih proizvoda koristi se konvencionalna heljda, jer tatarska ima veoma gorak ukus, ali se i ona može koristiti u formulaciji pojedinih proizvoda medicinske hrane. Boja heljdinog brašna tamnija je u odnosu na brašno pšenice, zbog povećanog sadržaja dijetetskih vlakana i zbog toga što mlevenjem semena ljuska ne može u potpunosti da se ukloni. Proteini brašna heljde ne sadrže gluten, pa je od čistog heljdinog brašna teško proizvesti testo koje ima pogodnu elastičnost i plastičnost. Međutim, istraživanja sprovedena na institutu *Central Food Research* u Mađarskoj pokazuju da je moguće proizvesti hleb od isključivo heljdinog brašna, tamnije boje, mekane sredine i pogodne zapremine. U proizvodnji konditorskih proizvoda, poput keksa, biskvita i kolača, nedostatak glutena i reološki parametri heljdinog brašna ne predstavljaju problem. Bez obzira na navedene činjenice, zbog karakterističnog ukusa, ne prave se proizvodi od čistog heljdinog brašna, već samo u smešama sa drugim brašnima, poput pšeničnog, kukuruznog i ovsenog. Smatra se da heljda i proizvodi od heljdinog brašna utiču na sniženje masnoća, holesterola i šećera u krvi, kao i prevenciju hipertenzije, ateroskleroze i dijabetesa. Tvrdi se i da utiču na redukciju telesne težine,

povećanje imuniteta i razvoj inteligencije kod dece (Biacs et al., 2002; Takahama i Hirota, 2010; Kazeem i Davies, 2016). Mešanjem brašna heljde sa brašnima cerealija, koja obično sadrže nedovoljne količine esencijalnog lizina, dobija se uravnotežen aminokiselinski sastav (Arendt i Zannini, 2013). Pretpostavlja se da unos heljde u organizam može da ima i prebiotsko dejstvo, tako što podstiče rast mezofilnih aerobnih bakterija i bakterija mlečne kiseline, *Bifidobacterium* i *Enterobacterium*, a smanjuje sadržaj patogena (Prestamo et al., 2003).

Zrno heljde može da se čuva relativno dugo, bez značajnijih hemijskih promena. Ova osobina pripisuje se visokom sadržaju nekoliko prirodnih antioksidanasa, uključujući tokoferole, fenolne kiseline i flavonoide, koji stabilizuju procese u zrnju tokom skladištenja (Biacs et al., 2002).

II-5. Liposolubilni i hidrosolubilni profili cerealija i pseudocerealija

II-5.1. Sastav i sadržaj lipida

Pšenica. Sadržaj lipida u zrnu pšenice kreće se između 2 i 4%. Klica sadrži čak 30% ukupnih lipida, koji su bogati nezasićenim masnim kiselinama. Lipidi čine oko 8% aleuronskog sloja i oko 1,5% endosperma. Lipidi pšenice sastoje se većinom iz nepolarnih lipida (oko 60-70%), a u manjoj količini su prisutni glikolipidi (oko 20-25%) i fosfolipidi (oko 10-15%). Najzastupljenije su linolna (50-65%), palmitinska (17-24%), oleinska (10-15%), linoleinska (1,9-5,3%) i stearinska kiselina (1-2%) (Posner, 2000; Escarnot et al., 2012; Arendt i Zannini, 2013).

Sitosterol sačinjava 49-64% ukupnih sterola. Drugi desmetilsteroli prisutni u većim količinama su kampesterol (13-20%), stigmasterol, $\Delta 5$ - i $\Delta 7$ -avenasterol (3,1% i 2,3%) i holesterol od nezasićenih, a sitostanol i kampestanol od zasićenih. Može se reći da je pšenica relativno bogata stanolima. Ergosterol takođe može biti detektovan, ali pretpostavlja se da potiče od fungalne kontaminacije (Ruibal-Mendieta et al., 2004a; Piironen i Lampi, 2004; Nurmi et al., 2008; Iafelice et al., 2009).

Kukuruz. Zrno kukuruza bogatije je lipidima u odnosu na većinu drugih cerealija, izuzev ovsa, koji takođe sadrži relativno visok udeo lipida u zrnu. Lipidi kukuruza su bogati nezasićenim masnim kiselinama, ali su veoma stabilni zbog visokog sadržaja prirodnih antioksidanasa i niskog sadržaja linoleinske kiseline (Arendt i Zannini, 2013). Zrno kukuruza sadrži od 2% do 6% lipida skoncentrisanih u klici. Najzastupljenija je nepolarna frakcija, koja se sastoji od masnih kiselina i triglicerida bogatih linolnom (preko 50%) i oleinskom kiselinom (oko 25%), dok ostatak čine palmitinska, stearinska i linoleinska kiselina. Međutim, dugogodišnjim ukrštanjem dobijene su sorte kukuruza sa visokim sadržajem lipida, od čak 33 do 60% (Preciado-Ortiz et al., 2013). Aleuronski sloj je takođe bogat trigliceridima, uz mali sadržaj slobodnih masnih kiselina i steril-estara (Arendt i Zannini, 2013).

Kukuruz je biljka kod koje se mnogo radilo, a i dalje se radi, na genetičkim modifikacijama. Analize su pokazale da izogene i transgene sorte kukuruza imaju isti profil masnih kiselina, ali se razlikuju po njihovoj zastupljenosti. Koncentracije masnih kiselina dužeg lanca, poput C25:0, C26:0, C27:0 i C28:0 više su kod izogenih sorti, dok su koncentracije masnih kiselina kraćeg lanca, poput C6:0, C8:0, C9:0, C10:0 i C12:0 više kod transgenih sorti kukuruza (Jiménez et al., 2009).

Najzastupljeniji slobodni fitosteroli su sitosterol (59,6-70,8%) i kampesterol, dok zasićenih formi (kampestanol i sitostanol) ima u manjim koncentracijama, oko 8,5%. Međutim, može se reći da je zrno kukuruza relativno bogato stanolima. Holesterol je detektovan u izuzetno niskim koncentracijama (Piironen i Lampi, 2004; Esche et al., 2013).

Ječam. U poređenju sa zrnom kukuruza i ovasa sadržaj lipida zrna ječma relativno je nizak, 2-4%, pri čemu je oko 30% locirano u klici, a ostatak u endospermu (a naročito aleuronskom sloju). Trigliceridi sačinjavaju oko 78% ukupnih lipida ječma, pri čemu je palmitinska najvažnija zasićena (21,4-28,7%), a oleinska (10,4-16,9%), linolna (52,4-58,3%) i linoleinska (4,5-7,3%) najvažnije nezasićene masne kiseline. Najviši je sadržaj linolne kiseline (Hockett, 2000; Ragae, 2006; Arendt i Zannini, 2013).

Zrno ječma pored toga sadrži i digliceride, slobodne sterole i estre sterola, kao i ugljovodonike (Hockett, 2000). Sitosterol čini 49-64% ukupnih sterola. Stanola u zrnju ječma ima u veoma malim količinama (Piironen i Lampi, 2004).

Ovas. Različiti autori navode veoma različite rezultate, ali može se uopšteno reći da je ukupan sadržaj lipida zrna ovasa između 2% i 11%. Lipidi ovasa mogu se podeliti na trigliceride, fosfolipide, glikolipide, slobodne masne kiseline i sterole, pri čemu su trigliceridi definitivno najzastupljeniji. Sve studije prijavljuju sadržaj pet najvažnijih masnih kiselina u zrnju ovasa, koje zajedno sačinjavaju preko 95% ukupnih masnih kiselina: palmitinska 13-26%, stearinska 1-3%, oleinska 22-47%, linolna 25-52% i linoleinska 1-3%. Druge masne kiseline detektovane u pojedinim studijama i pojedinim sortama ovasa uljučuju laurinsku, palmitoleinsku, arahidinsku kiselinu (<0,1%), seriju nezasićenih masnih kiselina sa 20 ugljenikovih atoma u molekulu od C20:1 do C20:5 (0,5–3% ukupno), kao i tragove lignocerinske i nervonske kiseline (Zhou et al., 1999; Arendt i Zannini, 2013).

Po visokom sadržaju lipidnih komponenata ovas predstavlja jedinstvenu cerealiju – sadrži više lipida od svih drugih. Skrob ovasa, za razliku od skroba pšenice i kukuruza, sadrži veće količine lipida kompleksirane sa amilozom. Ovo razlikuje ovas od ostalih cerealija, gde većina lipida nije vezana i može biti lako ekstrahovana primenom nepolarnih rastvarača (McMullen, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

U zrnju ovasa β -sitosterol čini 49-64% ukupnih sterola. Takođe, prisutni su i Δ 5- i Δ 7-avenasterol (oko 21% i 13%). Stanola u zrnju ovasa ima u veoma malim količinama (Peterson, 2001; Piironen i Lampi, 2004). U pojedinim studijama takođe su detektovani i Δ 7-stigmasten-3 β -ol (6,4%), holesterol (5,8%), kampesterol (5%) i Δ 7-holesten-3 β -ol (2,8%) (Arendt i Zannini, 2013).

Raž. Ukupan sadržaj lipida u zrnju raži vrlo je nizak, 1,5-2%, i ne razlikuje se od zrna pšenice, tritikalea i ječma. Linolna kiselina je najzastupljenija masna kiselina u zrnju raži (55,6%). Raž je sadrži u nešto većim količinama u odnosu na druge cerealije, a po sadržaju je prate palmitinska (16,5%), oleinska (15,6%), linoleinska (10,4%), eikozenska (1,3%) i stearinska kiselina (0,6%) (Klaus, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

U zrnu raži sitosterol čini 49-64% ukupnih sterola. Drugi desmetilsteroli prisutni u značajnim količinama su kampesterol, stigmasterol, stigmastadienol, Δ 5- i Δ 7-avenasterol, kao i zasićeni sitostanol i kampestanol. Može se reći da je zrno raži, kao i zrno pšenice, relativno bogato stanolima (Piironen i Lampi, 2004; Nystrom et al., 2007). Ukupan sadržaj sterola raži viši je u odnosu na zrno pšenice, pa to isto važi i za njihove mlinske frakcije (Nystrom et al., 2007).

Tritikale. Ukupan sadržaj lipida integralnog brašna tritikalea je između 1,1 i 2,4%. Masno-kiselinski profil ne razlikuje se od profila zrna pšenice i raži. Najveće razlike uočene su u višem sadržaju palmitinske kiseline i nižem sadržaju oleinske kiseline (Arendt i Zannini, 2013).

Spelta. Neki autori navode više, a neki niže vrednosti ukupnih lipida u zrnu spelte u odnosu na pšenicu (Cubadda i Marconi, 2002; Ruibal-Mendieta et al., 2005; Escarnot et al., 2012). Međutim, većina studija ipak ukazuje na to da je spelta bogatija lipidima u odnosu na hlebnu pšenicu (Abdel-Aal et al., 1995; Ranhotra et al., 1995; Grela, 1996; Piergiovanni et al., 1996; Ranhotra et al., 1996; Ruibal-Mendieta et al., 2002; Ruibal-Mendieta et al., 2005). Najzastupljenije masne kiseline su zajedničke za zrno spelte i zrno pšenice (Grela, 1996; Ruibal-Mendieta et al., 2002; Ruibal-Mendieta et al., 2004b). Linolna kiselina predstavlja najzastupljeniju masnu kiselinu (55%), a u većoj količini prisutne su i oleinska (20,4%), palmitinska (18,5%) i linoleinska kiselina (3%). Smatra se da je sadržaj oleinske kiseline u lipidima spelte viši u odnosu na hlebnu pšenicu i tritikale (Cubadda i Marconi, 2002; Ruibal-Mendieta et al., 2005; Escarnot et al., 2012). Nasuprot tome, sadržaj linolne i linoleinske kiseline je niži.

Spelta ima sličan sastav i sadržaj sterola kao i hlebna pšenica. Sadrži β -sitosterol (49%), kampesterol (14%), Δ 5- i Δ 7-avenasterol, stigmasterol i holesterol (od nezasićenih), a sitostanol i kampestanol (od zasićenih). Ergosterol je takođe detektovan u zrnu spelte, ali pretpostavlja se da potiče od fungalne kontaminacije (Rozenberg et al., 2003; Ruibal-Mendieta et al., 2004a; Nurmi et al., 2008; Escarnot et al., 2012).

Amarantus. Sadržaj lipida u zrnu amarantusa viši je nego u zrnu cerealija i iznosi 6-9%. Prema nekim autorima sadržaj lipida u amarantusu je čak 2 do 3 puta veći u odnosu na heljdu i klasične cerealije (Alvarez-Jubete et al., 2009; Alvarez-Jubete et al., 2010a). Lipidi amarantusa karakterišu se visokim sadržajem nezasićenih masnih kiselina, uz naročito visok sadržaj linolne kiseline. Linolna čini preko 50% masnih kiselina i predstavlja najzastupljeniju masnu kiselinu. Sledeća je oleinska (više od 25%), palmitinska (oko 20%) i linoleinska (oko 1%) (Jahaniaval et al., 2000; Gamel et al., 2007; Pina-Rodriguez i Akoh 2009).

Najzastupljeniji fitosterol je hondrilasterol. (Bruni et al., 2001; Berghofer i Schoenlechner, 2002; Alvarez-Jubete et al., 2009; Pina-Rodriguez i Akoh, 2009; Alvarez-Jubete et al., 2010a; Arendt i Zannini, 2013). Prema drugim autorima, najzastupljeniji je klerosterol (42%) (León-Camacho et al., 2001; Ogrodowska et al., 2014; Arendt i Zannini, 2013).

Neosapunjiva frakcija lipida amarantusa sadrži i skvalen. Amaranus ima mnogo veći sadržaj skvalena u odnosu na, na primer, pšenicu, gde je on praktično zanemarljiv (Bruni et al., 2001; Berghofer i Schoenlechner, 2002; He i Corke, 2003; Alvarez-Jubete et al., 2010a).

Heljda. Sadržaj lipida u brašnu heljde je oko 2%. Preovlađuju nezasićene masne kiseline: oleinska, linolna, linoleinska i eikozenska kiselina. Oleinska i linolna su zastupljene u približno jednakim udelima, oko 35% (Bonafaccia et al., 2003; Alvarez-Jubete et al., 2009; Alvarez-Jubete et al., 2010a). Pored njih prisutne su i lignocerinska, stearinska, behenska i arahidinska kiselina. Lipidi heljde skoncentrisani su u klici (6,5%), dok endosperm sadrži samo 0,4% lipida (Arendt i Zannini, 2013). Sa više od 80% nezasićenih u ukupnim masnim kiselinama i sa relativno visokim sadržajem esencijalne linolne kiseline (Horbowicz i Obendorf, 1992), smatra se da je sa aspekta lipidnog profila heljda nutritivno superiornija u odnosu na konvencionalne cerealije (Steadman et al., 2001).

Od fitosterola u zrnu heljde najzastupljeniji su β -sitosterol i kampesterol (Alvarez-Jubete et al., 2010a).

II-5.2. Sastav i sadržaj prostih šećera

Pšenica. Slobodnih šećera u zrnu pšenice ima oko 2-3% (Escarnot et al., 2012). Prema Arendt i Zannini (2013) sadržaj prostih šećera je 7% (Arendt i Zannini, 2013). Sastoje se iz monosaharida (glukoze, fruktoze i galaktoze), disaharida (saharoze i maltoze) i trisaharida (glukodifruktoze i rafinoze). Najzastupljeniji su saharoza (0,57 – 0,80%), rafinoza (0,54 – 0,70%), fruktoza (0,02 – 0,04%) i glukoza (0,02 – 0,03%). Takođe, u manjim količinama su detektovani i stahioza, fruktozilrafinoza, ksiloza i arabinoza (Shelton, 2000).

Kukuruz. U zrnu kukuruza identifikovani su različiti šećeri: saharoza, glukoza, maltoza, fruktoza, galaktoza, celobioza, riboza, manoza i ksiloza. Slobodni monosaharidi – fruktoza i glukoza, zastupljeni su u skoro jednakim količinama. Saharoza predstavlja najvažniji disaharid u zrnu kukuruza. Sadržaj saharoze smanjuje se pri sazrevanju, pa tako zrelo zrno sadrži samo oko 2% šećera na suhu materiju zrna. Pored saharoze, zastupljena je i maltoza ali u manjoj količini, oko 0,4% s.m. Trisaharida (rafinoza, maltotrioza) i viših oligosaharida (maltooligosaharida) ima u veoma malim količinama (Johnson, 2000; Shelton, 2000).

Ječam. Nekoliko monosaharida je detektovano u zrnu ječma: arabinoza, ksiloza, fukoza, riboza, deoksiriboza, glukoza, fruktoza, galaktoza i manoza. Saharoza je najvažniji šećer u tkivima ječma. Glukoza i fruktoza se nalaze u slobodnom i u vezanom obliku, dok su ostali monosaharidi polimerizovani i vezani u oligosaharide, polisaharide, glikozide, glikolipide i glikoproteine (Shelton, 2000).

Ovas. Ukupni sadržaj slobodnih rastvorljivih šećera ovasa je 1,4%. Sadrži saharozu (0,64%), rafinozu (0,19%), fruktozu (0,09%), glukozu (0,05%), glukodifruktozu (0,04%), maltozu u tragovima, a u pojedinim slučajevima je detektovano i prisustvo stahioze (0,08%) (Shelton, 2000).

Raž. Zrno raži sadrži 3,2% ukupno rastvorljivih šećera, od kojih su najzastupljeniji saharoza (1,9%), rafinoza (0,4%), fruktoza (0,1%) i glukozu (0,08%) (Wood, 1997; Shelton, 2000). Može se reći da zrno raži sadrži nešto veće količine rastvorljivih šećera u odnosu na zrno pšenice, pri čemu preovlađuje saharoza (1,31%) (Klaus, 2000; Shelton, 2000; Arendt i Zannini, 2013).

Spelta. Slobodnih rastvorljivih šećera u zrnu spelte ima oko 2-3% (Escarnot et al., 2012).

Amarantus. Skrob amarantusa je bio predmet istraživanja mnogih studija (Pal et al., 2002; Choi et al., 2004; Kong et al., 2008), međutim, nema mnogo studija o rastvorljivim ugljenim hidratima nižih molekulskih masa, prisutnih u zrnu amarantusa. U zrnu su detektovane samo male količine mono- i disaharida. Dominantna je saharoza, a detektovani su i glukozu, galaktoza, fruktoza, maltoza, rafinoza, stahioza i inozitol (Arendt i Zannini, 2013).

Heljda. Prema literaturnim podacima, najzastupljeniji slobodni šećeri zrna heljde su saharoza i rafinoza, dok su ramnoza, fruktoza, glukozu i maltoza detektovani u samo malim količinama (Kim et al., 2004). Heljda sadrži 1-6% rastvorljivih ugljenih hidrata, koji su pretežno locirani u klici. Horbowicz et al. (1998) tvrde da klica zrna heljde ima jedinstvena svojstva jer se u njoj, umesto uobičajene rafinoze i njenih derivata – oligosaharida, akumuliraju i šećerni alkoholi. Heljda takođe sadrži i fagopiritole, za koje se smatra da imaju pozitivno dejstvo na zdravlje čoveka (Kim et al., 2001; Wijngaard i Arendt, 2006). Izomer *D-hiro*-inozitol se u heljdi nalazi u relativno visokim koncentracijama, pri čemu slobodnog ima manje, a većina se nalazi vezana u vidu galaktozil derivata – fagopiritola. Čak 71% fagopiritola je skoncentrisano u klici i oni su specifični sastojci heljdinog zrna, i nekoliko drugih biljaka (Arendt i Zannini, 2013).

II-6. Sistem GC-MS

Sistem GC-MS predstavlja kombinaciju tehnike razdvajanja supstanci u gasovitom stanju – gasne hromatografije (GC), i najsavremenije tehnike detekcije razdvojenih analita – masene spektrometrije (MS).

II-6.1. Gasna hromatografija

Po IUPAC-ovoj definiciji *gasna hromatografija je tehnika razdvajanja u kojoj je mobilna faza gas*. Gasna hromatografija se uvek izvodi u koloni (McNaught i Wilkinson, 1997). U instrumentalnoj analitičkoj hemiji postoji samo nekoliko tehnika koje su efikasne kao hromatografija u određivanju različitih analita u kompleksnim uzorcima. „Moć“ hromatografije potiče od njene sposobnosti da razdvoji smešu na komponente, odnosno analite, a potom da utvrdi njihov identitet i koncentraciju. Uopšteno, svaki tip hromatografije se sastoji iz dva osnovna koraka: same hromatografije, odnosno, razdvajanja individualnih komponenata, detekcije i identifikacije svake razdvojene komponente. Gasna hromatografija obuhvata procese injektovanja uzorka u instrument, prevođenja rastvarača i analita u gasovito stanje, i razdvajanja smeše komponenata, u idealnom slučaju, na individualne komponente. Maseni spektrometar (MS) je uobičajen detektor u savremenoj gasnoj i tečnoj hromatografiji. Ova izuzetno moćna kombinacija tehnika je rezultat udruženih mogućnosti razdvajanja komponenata, s jedne strane, i identifikacije jonskih fragmenata, s druge strane. Potvrdne, konfirmatorne tehnike su one koje obezbeđuju visoku sigurnost pri identifikaciji analita. S druge strane, mnoge druge pojedinačne tehnike i detektori imaju sugestivni karakter, što znači da analitičar nikada nije apsolutno siguran u identitet samog analita. Jedini faktor identifikacije komponenata kod ovakvih hromatografskih sistema je vreme njihove elucije iz kolone. Masena spektrometrija i nuklearna magnetna rezonanca (NMR) su dva primera konfirmatornih tehnika u hemiji (Dunivannt & Ginsbach, 2011).

Kapilarna gasna hromatografija danas predstavlja najvažniju analitičku metodu u organskoj hemijskoj analizi za određivanje individualnih supstanci u kompleksnim smešama. Odlikuje se visokom efikasnošću i produktivnošću kod rutinskih analiza (Hübschmann, 2009).

Osnovni delovi svakog gasnog hromatografa uključuju: izvor gasa kao mobilne faze, injektor koji služi da dostavi uzorak u kolonu, sama kolona u kojoj se odigrava razdvajanje, termostat kolone, kao i detektor i računar, koji registruju prisustvo supstanci u eluentu i snimaju hromatogram (Niessen, 2001; Eiceman, 2006). Autosempler ili uređaj za automatsko uzorkovanje je deo savremenih gasnih hromatografa, koji se sastoji od robotske ruke i automatski uzima ispitivani uzorak iz određene vijale, a potom ga unosi u injektor gasnog hromatografa. Prednost autosemplera nad manuelnim uzorkovanjem je u ponovljivosti i optimizaciji vremena, što je jedan od bitnih faktora za

određivanje prirode ispitivanog uzorka i njegovih komponenata (McMaster, 2008). Da bi se analizirale tečnosti i čvrste materije, moraju se prevesti u gasovito stanje, a potom i održavati u tom stanju tokom cele GC analize. Stoga je većina gasnih hromatografa opremljena pećima, kako bi se temperatura kolone održala negde između 40 i 350°C. Savremeni gasni hromatografi opremljeni su pećima koje omogućavaju programiranje temperature, pa samim tim i razdvajanje supstanci različitih vrednosti napona pare u jednoj analizi. Sa povećanjem temperature kolone u peći povećava se i brzina analize, a smanjuje efikasnost razdvajanja. Optimalna temperatura je, ustvari, kompromis dužine trajanja analize i stepena razdvojenosti komponenata. Većina savremenih metoda podrazumeva korišćenje temperaturnog programa, pomoću kog se povećava temperatura u toku analize i time skraćuje njeno ukupno vreme (Eiceman, 2006). Danas se u GC-MS analizi primenjuju kapilarne kolone, koje imaju veoma mali unutrašnji prečnik, reda veličine od nekoliko desetih delova milimetra i dužine 25, 60, pa i do 150 m (McMaster, 2008). U praksi, za direktno povezivanje sa masenim spektrometrom koriste se isključivo kolone koje imaju unutrašnji prečnik do 0,32 mm (Hübschmann, 2009). Sloj unutrašnjeg filma izrađen je od materijala koji može biti nepolaran, polaran ili umereno polaran (Rotzsche, 1991). Da bi stacionarna faza bila efikasna, ona mora intereagovati sa komponentama od interesa iz analizirane smeše, služeći se pritom principom *slično se u sličnom rastvara* (Rotzsche, 1991; McNair & Miller, 1998). Nepolaran sloj se koristi za razdvajanje nepolarnih organskih molekula. Takva je većina lakoisparljivih organskih materija (Rotzsche, 1991). Kolone sa tankim filmovima daju uske pikove na hromatogramima, a pri korišćenju na visokim temperaturama neće doći do značajnijeg curenja kolone (McMaster, 2008; Hübschmann, 2009). Kao gas nosač trenutno se najčešće koristi helijum, zbog svojih osobina opšte inertnosti i nezapaljivosti (Niessen, 2001).

II-6.2. Masena spektrometrija

Nijedan drugi detektor ne može da obezbedi takvo bogatstvo informacija (Eiceman, 2006).

Maseni spektrometri identifikuju i kvantifikuju molekule direktnom detekcijom jonskih vrsta (Hübschmann, 2009). Referentne supstance se koriste da bi se identifikovala nepoznata komponenta poređenjem retencionog vremena (u hromatografiji) i načina fragmentacije jona (u masenoj spektrometriji). Sa današnjim, savremenim, kompjuterskim bibliotekama masenih spektara, koje sadrže različite karakteristične jonske fragmentacije veoma velikog broja supstanci, analitičar ima opciju da ne koristi referentni standard. Ovo je naročito važno ukoliko referentna supstanca nije dostupna ili je, na primer, veoma skupa. U nekim slučajevima, a pogotovo pri niskim koncentracijama analita, pri identifikaciji mogu da se dobiju samo približni rezultati (Dunivannt i Ginsbach, 2011). Nepristrasna, objektivna i visoko selektivna detekcija određenih masa ili strukturnih fragmentacija čine masenu spektrometriju danas, više nego ikad, neophodnom analitičkom tehnikom kojom se postiže najveća tačnost u

identifikaciji komponenata. Masena spektrometrija u sprezi sa gasnom ili tečnom hromatografijom postigla je veoma veliki uspeh u analitičkoj instrumentaciji, obuhvatajući čitavo bogatstvo aplikacija, od dnevnih rutinskih kontrola, do konfirmatornih, potvrđnih analiza sa pravnim akcentom. U poslednje vreme težište se pomera sa LC-MS prema GC-MS tehnici zbog praktičnosti elektronsko-jonizacione tehnike u poređenju sa elektrosprej tehnikama, koje se obično primenjuju u LC-MS sistemu i kod kojih se često javljaju efekti supresije jona (Hübschmann, 2009). Maseni spektri nastaju razdvajanjem jona, dobijenih od molekula, prema odnosu njihove mase prema naelektrisanju, m/z . Najveći broj jona poseduje jedinično naelektrisanje, $z = 1$, pa je vrednost m/z obično jednaka molekulskoj (jonskoj) masi. Zbog toga se odnos m/z često naziva i samo *masa*.

Najvažniji delovi aparature su: sistem za unošenje uzoraka (veza GC-MS), jonski izvor, maseni analizator, detektor i procesor za obradu podataka. Danas su za obradu podataka dostupni visokorazvijeni i sofisticirani kompjuterski sistemi (Niessen, 2001). Da bi formirani joni na svom putu od jonskog izvora do detektora izbegli sudare sa drugim česticama, sistem se nalazi pod visokim vakuumom. Nekontrolisani sudari mogli bi da izazovu dalje reakcije jona, pri čemu bi interferencije bile velike, a maseni spektri neadekvatni (Niessen, 2001; McMaster, 2008). Svrha jonskog izvora je da obezbedi energiju, koja je dovoljna da jonizuje molekule analita, na dovoljno visokoj temperaturi, koja će sprečiti kondenzaciju analita (Grob i Barry, 2004). Elektronska jonizacija je standardni proces u većini GC-MS instrumenata. U svim komercijalnim uređajima danas se primenjuje energija elektrona od 70 eV. Elektronska jonizacija ovako velike energije prouzrokuje nastanak velikog broja jona, pa se molekulski jon, koji je slabog inteziteta, teško identifikuje. Međutim, ostali joni daju dodatne podatke o strukturi samog molekula. Maseni spektri svih komercijalno dostupnih biblioteka masenih spektara dobijeni su primenom ove energije jonizacije, što omogućava identifikaciju nepoznatih eluirajućih komponenata (Kitson et al., 1996; Niessen, 2001; McMaster, 2008; Hübschmann, 2009). Maseni analizator razdvaja nastale jone na osnovu vrednosti njihovog m/z odnosa. Maseni odnos se skenira, uzrokujući razdvajanje jona u prostornom ili vremenskom domenu. Kvadrupolni (Q) maseni analizator sastoji se od četiri cilindra, koji su orjentisani paralelno, a u preseku sačinjavaju kvadrat. Potencijali radiofrekvencije i jednosmerne struje se dovode na cilindre, omogućavajući jonima sa određenim m/z vrednostima stabilnu putanju i prolaz do detektora. Prednosti kvadrupola su njegova velika brzina skeniranja i niži troškovi. Upravo zbog toga je ovo najčešće korišćen analizator u GC-MS sistemima (Niessen, 2001; Grob i Barry, 2004). Kada se jonske vrste razdvoje u masenom analizatoru, potrebno ih je kvalitativno i kantitativno odrediti. Detekcija se najčešće izvodi električnim putem, tako što se meri abundanca – ukupna jonska struja. Kada su abundance male jačine (10^{-9} – 10^{-6} A), koriste se razni jednosmerni električni pojačivači, fotomultiplikatori, elektronski multiplikatori i dinamički kondenzatori (McMaster, 2008).

II-6.3. Primena GC-MS sistema u određivanju autentičnosti

Brojni literaturni podaci svedoče o primerima uspešne primene tehnike gasne hromatografije sa meseno-spektrometrijskom detekcijom uz multivarijantnu obradu podataka u određivanju autentičnosti različitih uzoraka. U tom smislu vršeno je određivanje geografskog porekla, botaničke vrste i varijeteta, načina prerade i falsifikovanja različitih proizvoda. Primeri uspešnog određivanja autentičnosti primenom GC-MS sistema dati su u tabeli 3.

Prvi put je u naučnoj literaturi opisana metoda primene sistema gasne hromatografije sa maseno-spektrometrijskom detekcijom u kombinaciji sa multivarijantnom analizom kod određivanja autentičnosti brašna cerealija (pšenice i spelte) i pseudocerealija (heljde i amarantusa), kao i finalnih pekarskih proizvoda (hleba) u referencama Ačanski i Vujić (2014a), Ačanski et al. (2015a) i Psodorov et al. (2015a).

Tabela 3. Primena različitih GC-MS metoda kombinovanih sa multivarijantnom analizom podataka u određivanju autentičnosti različitih uzoraka

Tip uzorka	Analizirane komponente	Literatura
Različita jestiva biljna ulja i masti	Profil n-alkana Metil-estri masnih kiselina	Fang et al., 2013; Troya et al., 2015; Xinhui et al., 2016
Ulje badema	Isparljivi aldehidi	Beltrán et al., 2011
Kafa	Isparljive i semi-ispaljive komponente (pirazin, piridin, pirol, furan, ketoni, aldehidi)	Risticovic et al., 2008
Med	Ispaljive komponente Slobodne aminokiseline	De Lima Morais da Silva et al., 2017; Silva et al., 2017; Azevedo et al., 2017
Maslinovo ulje	Različite aromatične komponente Metil-estri masnih kiselina	Escuderos, 2011; Pouliarekou et al., 2011; Fang et al., 2013
Mesni proizvodi	Ispaljive komponente (2, 3-oktandion, toluen, terpeni, alkani, alkeni, ketoni)	Sivadier et al., 2008
Proizvodi od voća	γ -dekalakton, δ -dekalakton	Cagliero et al., 2012

Tabela 3. Nastavak

Tip uzorka	Analizirane komponente	Literatura
Organski sok od pomorandže	Isparljive komponente	Cuevas et al., 2017
Sok od jabuke	Isparljive komponente	Guo et al., 2012
Proizvodi sa aromom jagode	Isparljive aromatične komponente	Schipilliti et al., 2011
Esencijalno ulje limuna	Različite isparljive komponente	Schipilliti et al., 2012
Kokosovo ulje	Metil-estri masnih kiselina Holesterol	Xu et al., 2015
Esencijalno ulje i komercijalni proizvodi cveta kamilice	Nepolarne komponente: isparljivi estri i oksidi Polarne komponente: fenoli	Wang et al., 2014
Pčelinji vosak	Ugljovodonici, olefini i monoestri	Maia i Nunes, 2013
Umetnička dela od voska	Ugljovodonici, alkoholi, ω -1-dioli, masne kiseline, ω -1-hidroksi kiseline	Bonaduce i Colombini, 2004; Regert et al., 2005
Varijetei Oolong čaja	Isparljive komponente (alkani, alkeni, aldehidi, ketoni, alkoholi, estri, oksidi)	Lin et al., 2013
Zeleni čaj	Pirolizovani metaboliti Organski ekstrakti Isparljive komponente	Pongsuwan et al., 2008; Jumtee et al., 2009; jumtee et al., 2011
Pečurke	Isparljive komponente	Melheiro et al., 2013
Belo i crno vino	Isparljive komponente	Ziółkowska et al., 2016
Brašno cerealijska (pšenica i spelta) i pseudocerealijska (heljda i amarantus)	Lipidne i ugljenohidratne komponente	Ačanski i Vujić, 2014a; Ačanski et al., 2015a
Hleb od mešanog brašna (pšenično i heljdno brašno)	Lipidne i ugljenohidratne komponente	Psodorov et al., 2015a

II-7. Multivarijantna analiza podataka

Već duže vreme se govori o značaju, velikom doprinosu i daljem razvoju kompjuterski podržane multivarijantne obrade i analize podataka u istraživanjima u prehrambenoj tehnologiji i industriji. Naime, ovakav način analize podataka otvara nove perspektive, kako u naučnom tako i u praktičnom smislu. Analiza podataka je od velike važnosti u svetu nauke, jer pruža uvid u nove i drugačije istraživačke pristupe, tako što omogućava interpretaciju dobijenih rezultata na unapređen i konstruktivniji način. Međutim, sama analiza podataka nikako ne predstavlja zamenu za hemijske, biohemijske, fizičke, biološke i druge analize, koje se tradicionalno primenjuju u ispitivanjima prehrambenih proizvoda. Svakako, ona ima kapacitet da značajno poboljša pomenute fundamentalne metode, pružajući mogućnost unapređenja dobijenih rezultata. Bolje interpretirani rezultati istraživanja mogu imati veliki uticaj na razvoj prehrambenih tehnologija u industrijskoj praksi (Skulberg, 1983).

Temeljno razrađene i u praksi nedvosmisleno dokazane univarijantne statističke metode ponekad mogu da pruže obmanjujuće rezultate i previde važne informacije u skupovima veoma kompleksnih podataka, jer su razvijene za obradu univarijantnih podataka. Danas se rutinske analize izvode primenom hromatografa, spektrometara i drugih sofisticiranih analitičkih instrumenata, koji imaju mogućnost određivanja brojnih parametara karakterističnih za pojedini uzorak. Struktura ovakvog seta podataka zahteva primenu multivarijantnih statističkih procedura. Ovakav razvoj stimuliše i sveprisutnost personalnih kompjutera u životu savremenog čoveka (Gower, 1983).

Na hiljade različitih komonenata mogu se identifikovati u različitim uzorcima prehrambenih proizvoda, iako se vrlo često samo nekoliko koristi u cilju određivanja autentičnosti. To znači da svaki objekat, odnosno uzorak prehrambenog proizvoda zauzima jedinstven položaj u apstraktnom n -dimenzionalnom hiperprostoru. Ovakav koncept vrlo je teško interpretirati i analizirati, jer već skup podataka sa više od tri osobine može lako da predstavlja problem. Multivarijantna analiza se, dakle, može definisati kao umeće ekstrahovanja hemijski relevantnih informacija iz mnoštva podataka koji se dobijaju različitim hemijskim eksperimentima, koristeći pri tome statistička i matematička sredstva. To je indirektan pristup izučavanju uticaja multivarijantnih faktora, odnosno varijabli, i skrivenih zavisnosti i veza u veoma kompleksnim setovima podataka. Može da se primenjuje i rutinski u pripremi i primeni modela multivarijantne klasifikacije (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002).

Nezavisno od tipa same multivarijantne procedure, sve one mogu da budu svrstane u dve osnovne grupe. Prvu čine deskriptivne, istraživačke (tzv. *non-supervised*) koje podrazumevaju da ne postoji nikakva unapred utvrđena hipoteza klasifikacije i definicije

ispitivanih objekata, odnosno uzoraka. Ovakve procedure analiziraju dobijene informacije i istražuju čitave sklopove podataka sa ciljem otkrivanja potencijalnih veza među njima. Primeri ovakvih procedura su: faktorska analiza (*factor analysis*), analiza osnovnih komponenata (*principal component analysis*), klaster analiza (*cluster analysis*), analiza osnovnih koordinata (*principal coordinate analysis, multidimensional scaling*), kanonska korelacija (*canonical correlation*), korespondentna analiza (*correspondence analysis*) i mnoge druge. Konfirmatorne procedure (tzv. *supervised*) čine drugu grupu i imaju za cilj proveru *a priori* hipoteze ili predstavljaju različite modele zavisnosti, koji se mogu podvesti pod uopšteni koncept regresije. Ovde se ubrajaju: diskriminantna analiza (*discriminant analysis*), multivarijantna analiza varijanse (*MANOVA – multivariate analysis of variance*) i druge (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002).

U ovoj disertaciji primenjene su deskriptivne, istraživačke procedure na *a priori* po botaničkom poretku poznate uzorke sa ciljem kreiranja modela klasifikacije, što je cilj druge grupe, pa se može reći da opisan pristup predstavlja svojevrsnu kombinaciju navedene dve grupe multivarijantnih analitičkih procedura (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002).

II-7.1. Istraživačke multivarijantne procedure

Istraživačke multivarijantne analitičke procedure podataka (*Exploratory data analysis - EDA*) su procedure bez nadzora, tzv. *unsupervised*, i igraju važnu ulogu u izbegavanju donošenja pogrešnih, očiglednih zaključaka. One imaju za cilj da izoluju što više korisnih informacija iz mnoštva različitih hemijskih i fizičkih analitičkih podataka, jer percepcija, kao ni iskustvo istraživača i analitičara, nisu dovoljni da istaknu bitne informacije i zaključke. One, dakle, imaju mogućnost da detektuju skrivene veze u kompleksnim setovima podataka, tako što ih redukuju i svode na manji broj informacija, koje je lakše interpretirati. One otkrivaju prirodni šablon grupisanja među analiziranim podacima i ukazuju na varijable koje imaju nasnažniji uticaj na formiranje ovakvih šablona (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002).

II-7.1.1. Klaster analiza

Klaster, odnosno, hijerarhijska klaster analiza (*Cluster analysis – CA; Hierarchical cluster analysis – HCA*) podrazumeva algoritme klasifikacije, koji su dizajnirani kako bi se dobile informacije sadržane u kompleksnim sklopovima podataka, kako bi se razumele sličnosti i razlike između objekata, odnosno uzoraka, i izdvojile one kategorije u kojima se grupišu slični uzorci. Pri formiranju klastera koriste se različite vrste distanci, kao mera različitosti između ispitivanih varijabli. Nakon što se nekoliko objekata poveže u jednu grupu, određuje se stepen distance između novih klastera. Ova procedura se vrši pravilima povezivanja ili amalgamacije, koja određuju da li su dva

klastera dovoljno slična da bi bila zajedno povezana. Postoji nekoliko tipova ovih pravila, od kojih su najznačajniji i u ovom radu ispitani sledeći:

1. Pojedinačno povezivanje (*Single linkage*) je određeno distancom dva najbliža objekta u različitim klasterima. Rezultujući klasteri imaju formu dugih lanaca.
2. Potpuno povezivanje (*Complete Linkage*) je određeno najudaljenijom distancom između bilo koja dva objekta u različitim klasterima. Ova metoda amalgamacije pokazuje dobre performanse kod prirodno različitih objekata, ali je nepodobna ako postoje izraženije sličnosti između ispitivanih varijabli, tj. ukoliko su klasteri izdužene forme.
3. Vardova metoda (*Ward's method*) je drugačija u odnosu na sve ostale metode, jer koristi pristup analize varijanse, kako bi utvrdila meru distance između klastera. Ova metoda se smatra veoma efikasnom, iako često formira klasterne manjih formata.

Odabir samog tipa povezivanja prilikom izvođenja klaster analize značajno utiče na dobijene rezultate (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002; Rencher, 2002; Lavine i Davidson, 2006; Varmuza i Filzmoser, 2008; Ares, 2014).

II-7.1.2. Faktorska i analiza osnovnih komponenta

Faktorska analiza (*Factor analysis - FA*) podrazumeva tehnike modelovanja kompleksnih podataka, pri čemu se analiza osnovnih komponenta najčešće primenjuje pri određivanju autentičnosti. Analiza osnovnih komponenta (*Principal component analysis – PCA*) je jednostavna za interpretaciju i daje objašnjenje maksimalne varijabilnosti inicijalne distribucije. Osnovni cilj primene analize osnovnih komponenta je dobijanje izvesnog broja neprimetnih i teško uočljivih faktora iz originalnog seta primetnih i lako uočljivih varijabli, kao što su hromatografski pikovi, kako bi se smanjila i pojednostavila kompleksna matrica sirovih podataka, pri čemu se zadržava većina originalnih informacija. Prilikom izvođenja analize produkuje se nekoliko linearnih kombinacija uočljivih varijabli, koje su poznate kao ajgenvektori (*eigenvectors*). Proces uključuje odabir grupe originalnih varijabli, formiranje matrice korelacija, određivanje broja ajgenvektora koji se uzimaju u obzir, kao i njihovu rotaciju u cilju bolje interpretacije rezultata i, na kraju, donošenje zaključaka. Grafičko predstavljanje je vrlo važno za vizualizaciju i bolje poimanje ostvarenih rezultata. Tačke predstavljene dobijenim PCA dijagramom, koje su geometrijski bliske jedna drugoj ukazuju na međusobnu sličnost ispitivanih uzoraka, na koje se te tačke odnose. Orijentacija vektora koji opisuje određenu varijablu u faktorskom prostoru predstavlja rastuću vrednost ove varijable. Ugao između određenih varijabli ukazuje na stepen korelacije među njima, pri čemu manji uglovi sugerišu na to da među datim varijablama postoji veći stepen korelacije. Trodimenzionalni PCA dijagram je naročito informativan, jer pruža mogućnost posmatranja odnosa između analiziranih uzoraka u proširenoj perspektivi. Ukoliko se PCA primenjuje u klasifikaciji uzoraka koji pripadaju većem broju

kategorija, njihovo grupisanje odgovara pripadajućim poznatim kategorijama. Najviša vrednost ajgenvektora, a time i varijanse se uvek odnose na prvu osnovnu komponentu. Svaka sledeća osnovna komponenta nosi nižu vrednost varijanse (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002; Rencher, 2002; Gemperline, 2006; Varmuza i Filzmoser, 2008; Grane i Jach, 2014).

II-7.1.3. Analiza osnovnih koordinata

Analiza osnovnih koordinata (*Principal coordinate analysis, Multidimensional scaling*) je alternativa za faktorsku analizu i analizu osnovnih komponentata u slučaju kada je cilj analize određivanje autentičnosti prehrambenih proizvoda na osnovu zapaženih distanci (sličnosti i razlika kao kod klaster analize) između ispitivanih objekata. To nije egzaktna procedura, jer predstavlja način efikasnog preuređivanja objekata. Faktorska analiza zahteva normalnu raspodelu multivarijantnog seta podataka, a kod analize osnovnih koordinata to nije neophodno. Analizom osnovnih koordinata se često dobijaju rezultati koji su lakši za interpretaciju, jer se kod faktorske analize često dobija više faktora. Analiza osnovnih koordinata može da se primeni na bilo koju vrstu distance, dok je kod faktorske analize neophodno prethodno formiranje matrice korelacija (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002; Derndorfer i Baierl, 2014).

II-8. Pravni aspekt autentičnosti

II-8.1. Nacionalne regulative

Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa

„Sl. list SRJ“, br. 52/95 i „Sl. list SCG“, br. 56/2003 – dr. pravilnik, 4/2004 – dr. pravilnik i „Sl. glasnik RS“, br. 43/2013 – dr. Pravilnik, 68/2016 - dr. pravilnik

Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa je stupio na snagu 19. avgusta 2016. godine, a počće da se primenjuje 1. januara 2018. godine. U pomenutom Pravilniku definišu se pekarski proizvodi, sirovine koje se primenjuju u njihovoj proizvodnji, kao i podela pekarskih proizvoda u zavisnosti od primenjene formulacije.

Pravilnik tačno definiše minimalni udeo brašna pojedinačne biljne vrste, cerealijske ili pseudocerealijske, u formulaciji određenog pekarskog proizvoda, ukoliko se on deklarise kao proizvod od te biljne vrste. Pravilnik definiše i mešani hleb, kao i minimalni udeo brašna određene cerealijske i pseudocerealijske u svakoj specifičnoj vrsti mešanog hleba (<http://www.slglasnik.com/>; http://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik_o_kvalitetu_zita_mlinskih_i_pekarskih_proizvoda_i_testenina.html).

Detalji ovog Pravilnika dati su u Prilogu 1, na strani II.

Pravilnik o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa

„Sl. list SFRJ“, br. 74/88

Pravilnik o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa definiše analitičke metode za: (i) Dokazivanje prisustva brašna drugih žita u pšeničnom brašnu mikroskopskim ispitivanjem; (ii) Dokazivanje i određivanje udela kukuruznog brašna u pšeničnom brašnu; i (iii) Dokazivanje prisustva sojinog brašna u pšeničnom brašnu (<http://www.slglasnik.com/>;

http://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik_o_kvalitetu_zita_mlinskih_i_pekarskih_proizvoda_i_testenina.html).

U Pravilniku nisu navedene metode određivanja autentičnosti, koje se odnose na finalne pekarske proizvode.

Detalji ovog Pravilnika, kao i predložene analitičke procedure, dati su u Prilogu, na strani XXXII.

II-8.2. Međunarodne regulative

American Association of Cereal Chemists (AACC)

Međunarodno priznate metode AACC

AACCI Metoda 06-10.01

Mešavina ražanog i pšeničnog brašna

Smeša pšeničnog i ražanog brašna često se upotrebljava u pekarstvu. Određivanje sadržaja ražanog brašna je vrlo važno, jer proteini raži povećavaju lepljivost testa. Ova metoda, poznata kao trifruktozanska metoda, ima mogućnost određivanja udela ražanog brašna u smeši sa pšeničnim.

AACCI Metoda 06-11.01

Brašno soje

Ova metoda ima mogućnost kvalitativnog određivanja prisustva sojinog brašna u termički netretiranim proizvodima i testeninama od žitarica (<https://www.aaccnet.org/Pages/default.aspx>).

International Association for Cereal Science and Technology (ICC)

Metoda 143; 1995

Identifikacija genotipa pšenice primenom elektroforeze

Ova međunarodno priznata metoda omogućava identifikaciju specifičnog genotipa pšenice u obliku brašna ili semoline, separacijom gliadinskih proteina primenom poliakrilamid-gel elektroforeze (PAGE) uz pufer aluminijum-laktat, na pH 3,1. Proteinski sastav i sadržaj zrna pšenice je genetički određen i smatra se da na njega ne utiču spoljašnji faktori, poput lokacije ili godine uzgoja. Takođe, sastav i sadržaj proteina različitih genotipova pšenice ostaje stabilan kroz nekoliko biljnih generacija, te se stoga smatra da predstavlja pogodan parametar u identifikaciji specifičnog genotipa ove biljne vrste. Ukoliko se utvrde proteinski profili svih genotipova pšenice specifičnih za

određeni region, primenom ove metode može se odrediti proteinski profil nepoznatog uzorka pšenice, a time i njegov genotip. Ovakva praksa je u opštoj upotrebi u mnogim zemljama (<https://www.icc.or.at/>).

Direktive EU

Među direktivama Evropske Komisije preporučuju se naučni članci koji se odnose na savremeno određivanje autentičnosti hrane (<https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/advanced-testing-methods-help-food-authentication>; Cubero-Leon et al., 2014; <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/articles-journals/preface-food-chemistry-special-issue-food-authenticity-traceability>; Preface in Food Chemistry, 2010), kao i upotrebu sertifikovanih referentnih materijala u određivanju autentičnosti različitih prehrambenih proizvoda izdate od strane Evropske Komisije.

(<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/brochures-leaflets/certified-reference-materials-food-authenticity>; Certified reference materials for food authenticity, 2016).

Međutim, u dokumentaciji o analiziranim sirovinama i proizvodima prehrambene industrije nisu pronađeni podaci o metodama određivanja autentičnosti brašna različitih biljnih vrsta cerealijskih i pseudocerealijskih u smeši i u finalnim pekarskim proizvodima, niti je u dopisu sa predstavnicima ove organizacije dobijen pozitivan odgovor o postojanju takvih zvaničnih metoda.

Codex Alimentarius Commission

CODEX STAN 234-1999

Preporučene metode analize i uzorkovanja

Prema metodama Komisije *Codex Alimentarius*, u brašnu različitih biljnih vrsta cerealijskih, poput pšenice, kukuruza, prosa i sirka, preporučuje se određivanje sadržaja vlage, pepela, masnih kiselina, proteina, dijetetskih vlakana i granulacije brašna. Među preporučenim metodama nisu navedene metode za određivanje autentičnosti, ni brašna, ni finalnih pekarskih proizvoda (Codex Alimentarius International Food Standards, 1999).

III

Eksperimentalni

deo

III-1. Priprema uzoraka brašna

Uzorci različitih botaničkih vrsta cerealijskih (strnih žita i kukuruza) analizirani u ovoj doktorskoj disertaciji, tabela 4, dobijeni su sa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Svi sakupljeni uzorci su uzgajani na istom eksperimentalnom polju, zbog čega se u daljoj analizi eliminiše dejstvo okoline na određivanje autentičnosti i razlikovanje botaničkih vrsta analiziranih uzoraka, poput različitog kvaliteta zemljišta i različitih klimatskih uslova. Uzorci organske spelte i pseudocerealijske (heljde i amarantusa), tabela 4, dobijeni su sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu.

Uzorci brašna dobijeni su mlevenjem sakupljenih uzoraka semena cerealijskih i pseudocerealijskih na laboratorijskom mlinu (Knifettec 1095, Slovačka). Dobijeno mlivo je imalo sledeće karakteristike: čestice prečnika $> 500 \mu\text{m}$, 0–10%; čestice > 210 ali $< 500 \mu\text{m}$, 25–40%, i čestice $< 210 \mu\text{m}$, 75–50%.

Tabela 4. Analizirane sorte različitih botaničkih vrsta cerealijskih i pseudocerealijskih

Botanička vrsta	Sorta
Kukuruz <i>Zea mays</i> L.	Različite hibridne sorte: NS 5, NS 7, NS 9, NS 10, NS 11, NS 12, NS 13, NS 14, NS 17, NS 20, NS 21, NS 22, NS 23, NS 24, NS 26, NS 27, NS 28
Pšenica <i>Triticum aestivum</i> L.	Ozima: Renesansa, Rapsodija, Evropa 90, Pema, Milijana Jara: Nataša, Venera Durum: Durumko, NS Dur
Ječam <i>Hordeum vulgare</i> L.	Ozimi pivski: Novosadski 525, NS Pinon, NS Zitos, NS-565 Ozimi stočni: Atlas, Somborac, Rudnik, Nonius Jari: NS Marko, Mile Golozrni: Golijat
Ovas <i>Avena sativa</i> L.	Jari: Dunav Ozimi: Jadar Golozrni: Sedef
Tritikale <i>Triticosecale</i> Wittm.	NS Karnak, NS Trifun
Raž <i>Secale cereale</i> L.	NS Savo
Spelta <i>Triticum spelta</i> L.	Austrija, Eko-10, Nirvana
Amarantus <i>Amaranthus</i> L.	2A, 16A, 31A
Heljda <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.	Godijeva, Bambi, Darja, Francuska, Prekumurska, Češka, Čebelica, Novosadska, Spacinska

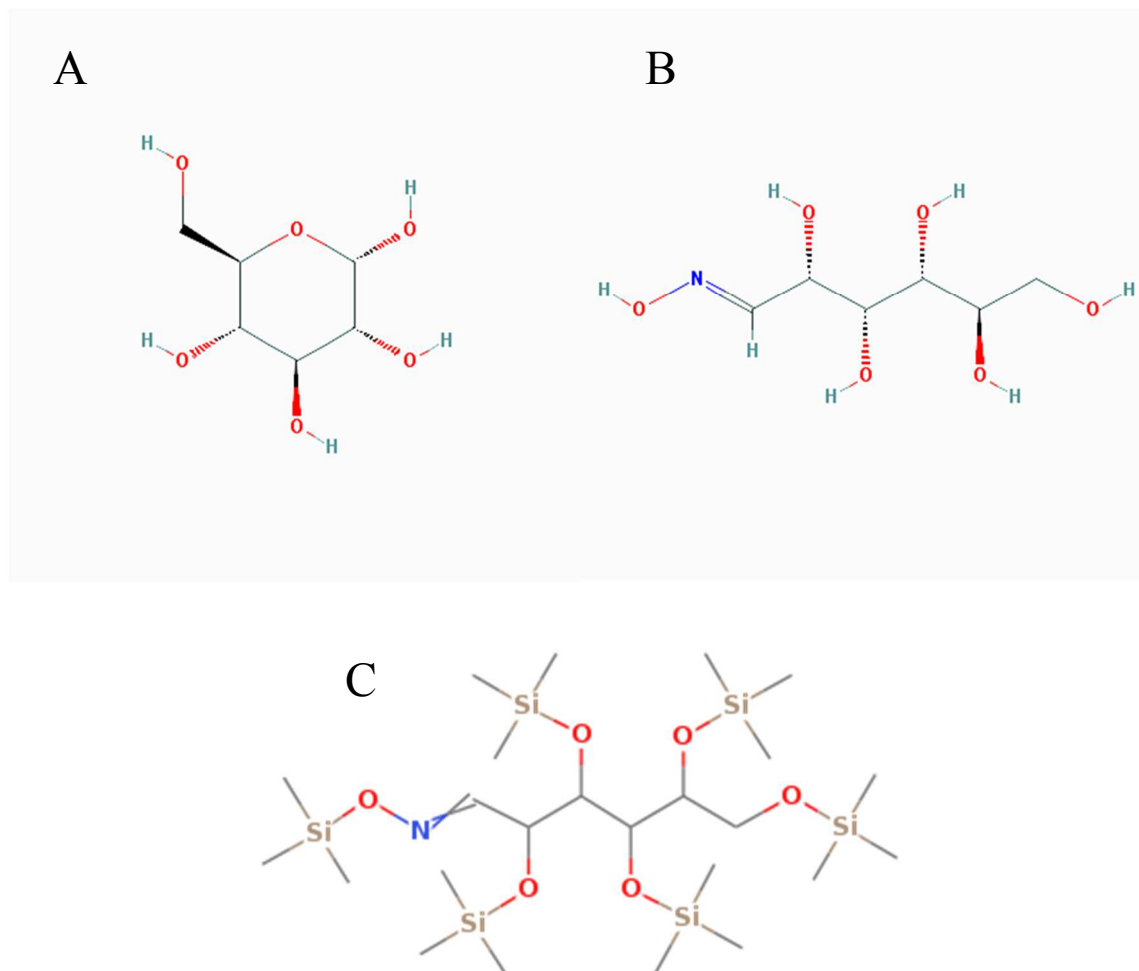
III-1.1. Ekstrakcija i derivatizacija uzoraka brašna

Po 0,50 g svakog uzorka brašna, usuto je u kivetu za centrifugiranje od 12 ml i zatim je dodato 5 ml *n*-heksana. Liposolubilne materije su ekstrahovane heksanom na Vortex mešalici u trajanju od 2 minute. Bistri supernatanti su razdvojeni od brašna centrifugiranjem pri 2000 obrtaja u minuti (rpm) ($721.6 \times g$; radijus centrifuge 160,5 mm), u trajanju od 5 minuta. Zapremine od 3 ml bistrih supernatanta liposolubilnih (heksanskih) ekstrakata usute su u staklene čaše zapremine 10 ml i osušene u struji azota. Suvi ostaci rastvoreni su u 400 μ l metilen-hlorida, a potom je dodato 100 μ l 0,2 M rastvora reagensa TMSH (trimetilsulfonijum-hidroksid; Macherey-Nagel, Bethlehem, Pennsylvania, SAD). Triacilgliceroli su transesterifikovani u odgovarajuće ispraljive metil-estre masnih kiselina u injektoru gasnog hromatografa, na 250°C (www.mn-net.com/tabid/10234/default.aspx).

Procedura obezmaščivanja heksanom je ponovljena tri puta. Heksanski ekstrakti su sakupljeni i odbačeni. Na obezmaščene i na vazduhu osušene uzorke brašna dodato je 5 ml 96%-tnog etanola (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD). Ekstrakcija je izvedena na Vortex mešalici u trajanju od 2 minute. Bistri supernatanti su razdvojeni od brašna centrifugiranjem pri 2000 rpm ($721.6 \times g$, radijus centrifuge 160,5 mm), u trajanju od 5 minuta. Po 2 ml bistrih supernatanta hidrosolubilnih (etanolnih) ekstrakata izdvojeno je i dodato je 50 μ l 10%-tnog rastvora natrijum-hidroksida u etanolu i 50 μ l 10%-tnog rastvora hidroksilamin-hidrohlorida. Na taj način su u etanolnim rastvorima dobijeni oksimi ekstrahovanih prostih šećera. Uzorci su osušeni u struji azota. Suvi ostaci rastvoreni su u 400 μ l metilen-hlorida. Derivatizacija dobijenih oksima prostih šećera u odgovarajuće trimetilsilil-etre izvršena je sa 100 μ l reagensa BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamid; Macherey-Nagel, Bethlehem, Pennsylvania, SAD) (Knapp, 1974; Peterson, 1974).

U prvom segmentu istraživanja hidrosolubilnih ekstrakata na GC-MS sistemu analizirani su trimetilsilil-derivati ekstrahovanih prosetih šećera (TMS-derivati). Međutim, kako se ovi derivati odlikuju postojanjem mnoštva izomera po prostom šećeru, a time i mnoštvom pikova koji eluiraju na dobijenim hromatogramima, u drugom segmentu su u GC-MS analizi korišćeni novi derivati, trimetilsilil-oksimi prostih šećera (TMSO-derivati). Time se dobijaju jednostavniji hromatogrami, a njihova analiza postaje brža i jednostavnija. Takođe, u svrhu derivatizacije oksima prostih šećera u isparljive trimetilsilil-derivate, ispitane su mogućnosti drugog reagensa za derivatizaciju, bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA), koji se u literaturi opisuje kao efikasniji u odnosu na trimetilsilil-imidazol (TMSI) (Gordon, 1990). Prema literaturi, trimetilsilil-oksimski derivati prostih ugljenih hidrata vrlo su pogodni u hromatografskoj analizi kompleksnog biljanog materijala, kao što su ekstrakti brašna cerealijska i pseudocerealijska. Mogu se primeniti u derivatizaciji aldoza i ketoza, pri čemu se dobijaju jednostavniji hromatogrami, jer svaki derivat na hromatogramu eluira u vidu maksimalno dva hromatografska pika, u vidu *syn* (*E*)- i *anti* (*Z*)-izomera svakog eluirajućeg redukujućeg šećera, i u vidu samo jednog hromatografskog pika svakog eluirajućeg neredukujućeg

šećera (Bradbury, 1990; Ruiz-Matute et al., 2011). Primer derivatizacije prostog šećera u odgovarajući oksim, u prvom stupnju, a potom u trimetilsilil-derivat dobijenog oksima u drugom stupnju derivatizacije, prikazan je na slici 2.



Slika 2. (A) Molekul α -D-glukoze u piranoznom obliku; (B) Molekul oksima glukoze – glukozoksim (O-glukoza); (C) Molekul trimetilsilil-oksima glukoze (TMSO-glukoza) (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

III-2. Priprema uzoraka hleba

Uzorci hleba za analizu proizvedeni su mešanjem pšeničnog brašna i brašna heljde u različitim i kontrolisanim odnosima. U proizvodnji sedam uzoraka hleba za analizu korišćene su sledeće sirovine: integralno brašno heljde (sadržaj pepela 2,1%, sadržaj vlage 9,7%; Tehnohemija, Novi Sad, Srbija), pšenično brašno T-500 (sadržaj pepela 0,52%, sadržaj vlage 1,5%; DEM, Kulpin, Srbija), kvasac, so i poboljšivači za hlebno testo (natrijum bikarbonat, dinatrijum dihidrogen pirofosfat, monokalcijum fosfat; Centroproizvod, Beograd, Srbija).

Osnovne karakteristike integralnog brašna heljde i pšeničnog brašna T-500, koji su korišćeni u proizvodnji hleba, prikazane su u tabeli 5.

Tabela 5. Indikatori kvaliteta integralnog brašna heljde i pšeničnog brašna T-500, koji su korišćeni u proizvodnji hleba

Indikatori kvaliteta	Heljdino brašno	Pšenično brašno T-500
Sadržaj vlage (%)	12,80	12,20
Mineralne materije (% s.m.)	2,44	0,49
Sirovi protein (% s.m.)	13,70	10,70
Masnoće (% s.m.)	2,60	0,95
Skrob (% s.m.)	63,0	73,20
Ukupna dijetalna vlakna (% s.m.)	9,06	0,50
Stepen kiselosti	3,20	2,50

U tabeli su prikazane srednje vrednosti rezultata merenja (n=3). U analizi su korišćene standardne procedure (Đaković, 1997; Kaluđerski i Filipović, 1998)

Tehnološki postupak proizvodnje pšeničnog hleba sa dodatkom brašna heljde sastojao se iz četiri faze:

Prva faza je homogenizacija i močenje integralnog heljdinog brašna toplom vodom. Obrada toplom vodom se obavlja zbog bolje hidratacije čestica integralnog heljdinog brašna, koje sadrži različite veličine čestica od npr. 35 μm do 450 μm . Priprema integralnog heljdinog brašna obavlja se pri sledećim uslovima: toplom vodom ($t = 70\text{-}85^\circ\text{C}$) prelije se pripremljena količina integralnog heljdinog brašna i sačeka se da se masa ohladi do temperature od oko 35-40 $^\circ\text{C}$. Odnos tople vode i heljdinog brašna je 1:1.

Ova faza je veoma važna, jer omogućava prevazilaženje nedostataka kod teksturnih svojstava hleba, koji sadrži integralno heljdino brašno. Ako brašno nije preliveno toplom vodom, iritiraće grlo prilikom gutanja hleba (*dere* sluzokožu grla).

Druga faza je izbor konzistencije testa (priprema *mekog* testa) i oblikovanje testanih komada u specijalne silikonske kalupe, po sirovinskom sastavu prikazanom u tabeli 6.

Tabela 6. Sirovinski sastav testa za pšenični hleb sa dodatkom brašna heljde

Vrsta sirovine	Učešće u testu (%)
Integralno heljdino brašno	0; 20; 40; 50; 60; 80 i 100
Pšenično brašno T-500	100; 80; 60; 50; 40; 20 i 0
Kvasac	3,0
So	2,0
Poboljšivač za hlebno testo	0,3
Voda	Do optimalne konzistencije

Odmerena količina brašna T-500 i navlažena masa heljdinog integralnog brašna (računa se voda dodata za prelivanje) sipa se u posudu za zames, doda se 2% kuhinjske soli, 3% formovanog kvasca i 0,3% poboljšivača za hleb (komercijalni praškasti aditiv za hleb). Testo se formira u dvobrzinskoj spiralnoj mesilici u vremenu od 12 (4+8) minuta. Temperatura testa nakon zamesa kreće se u rasponu 28-32°C, a fermentacija testa u masi traje oko 40 minuta.

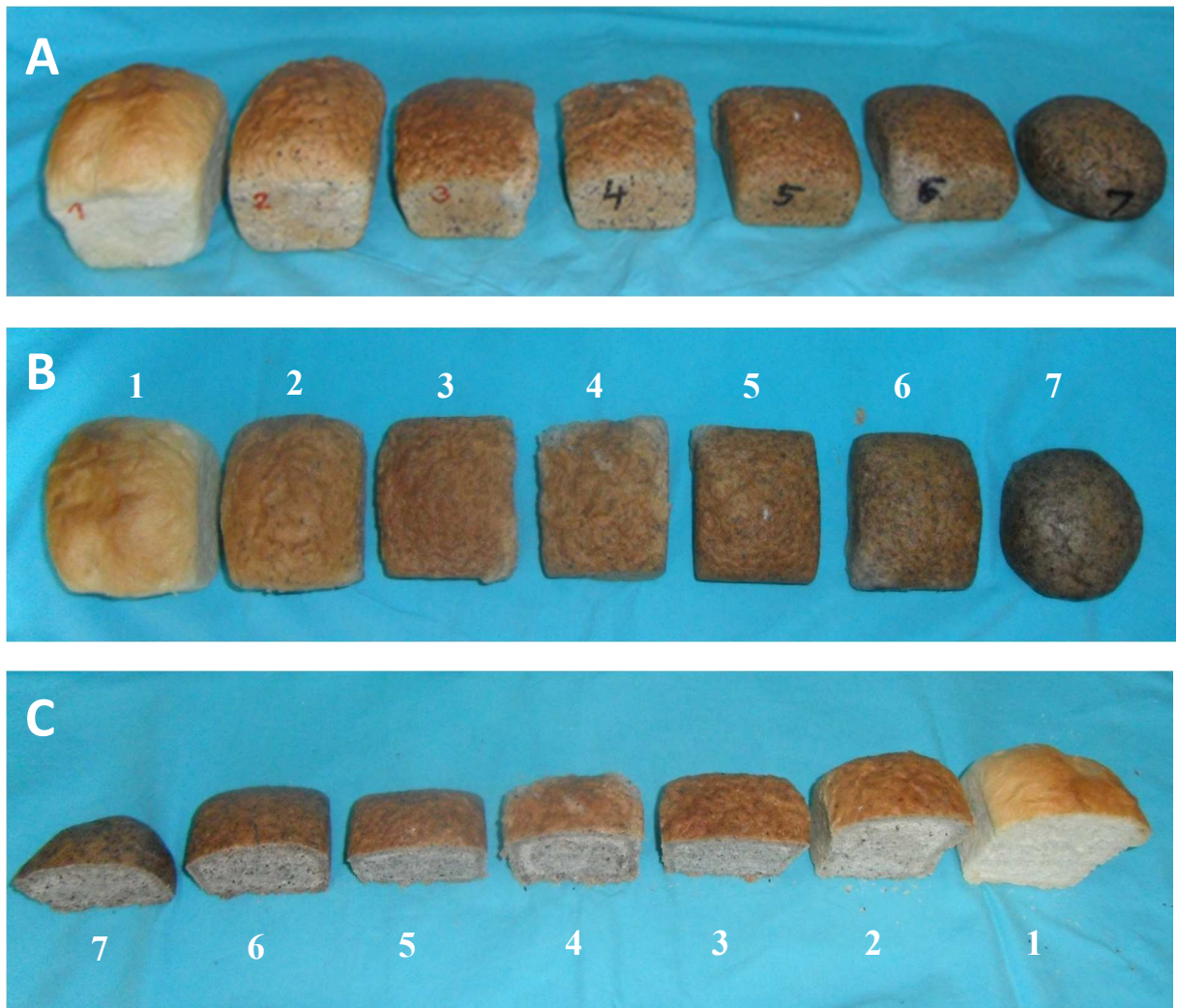
Formiranje testanih komada obavlja se ručnim deljenjem testa na željenu masu do 100 grama po komadu i oblikovanjem u pripremljene silikonske kalupe.

Treća faza je završna fermentacija, koja se obavlja u fermentacionoj komori na optimalnoj temperaturi (32-36°C) i pri optimalnoj vlažnosti vazduha od preko 85%. Vreme završne fermentacije zavisi od biohemijskog procesa narastanja testa, a takođe i od udela heljdinog brašna u smeši i u proseku se kreće oko 35 minuta.

Četvrta faza je pečenje fermentisanih testanih komada, koje se obavlja u etažnoj peći na temperaturi od 215-230°C u vremenu od 14 do 18 minuta.

Hleb se izvadi iz kalupa i hladi na temperaturi radne prostorije do postizanja temperature u središnjem delu od oko 40°C.

Fotografisani kontrolni uzorci proizvedenog hleba (sa strane, od gore i u preseku) prikazani su na slici 3. Uzorci hleba na fotografiji imaju oznake 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7, a udeo heljdinog brašna se kreće od 0%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80% do 100%, slika 3.



Slika 3. Analizirani uzorci pšeničnog hleba sa dodatkom brašna heljde, fotografisani: (A) sa strane; (B) od gore; (C) u preseku. Uzorci hleba na fotografiji imaju oznake 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7, a udeo heljdinog brašna se kreće od 0%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80% do 100%

III-2.1. Ekstrakcija i derivatizacija uzoraka hleba

Po 6,0 g kore i sredine svakog proizvedenog uzorka hleba je izmrvljeno, usitnjeno i prenešeno u kivete za centrifugiranje od 12 ml i dodato je po 4 ml *n*-heksana. Lipidne komponente iz uzoraka kora i sredina hleba su ekstrahovane heksanom na Vortex mešalici u trajanju od 2 minute. Bistri supernatanti su razdvojeni od kora i sredina hleba centrifugiranjem pri 2000 rpm ($721.6\times g$; radijus centrifuge 160,5 mm), u trajanju od 5 minuta. Zapremine od 3 ml bistrih supernatanta liposolubilnih (heksanskih) ekstrakata usute su u staklene čaše zapremine 10 ml i osušene u struji azota. Suvi ostaci rastvoreni su u 400 μ l metilen-hlorida, a potom je dodato 100 μ l 0,2 M rastvora reagensa TMSH (trimetilsulfonijum-hidroksid; Macherey-Nagel, Bethlehem, Pennsylvania, SAD). Triacilgliceroli su transesterifikovani u odgovarajuće ispraljive metil-estre masnih

kiselina u injektoru gasnog hromatografa, na 250 °C (<http://www.mn-net.com/tabid/10234/default.aspx>).

Procedura obezmašćivanja heksanom je ponovljena tri puta. Heksanski ekstrakti su sakupljeni i odbačeni. Obezmašćeni uzorci su osušeni na vazduhu, na sobnoj temperaturi, a potom je dodato 10 ml 96%-tnog etanola (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD). Ugljenohidratne komponente iz uzoraka kora i sredina hleba su ekstrahovane etanolom na Vortex mešalici u trajanju od 2 minute. Bistri supernatanti su razdvojeni od kora i sredina hleba centrifugiranjem pri 2000 rpm ($721.6 \times g$, radijus centrifuge 160,5 mm), u trajanju od 5 minuta. Po 5 ml bistrih supernatanta hidrosolubilnih (etanolnih) ekstrakata osušeno je u struji azota. Suvi ostaci rastvoreni su u 100 μ l piridina, a derivatizacija ekstrahovanih prostih šećera u odgovarajuće trimetilsilil-etre izvršena je sa 100 μ l reagensa BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamid, Macherey-Nagel, Bethlehem, Pennsylvania, SAD) (Knapp, 1979).

III-3. Parametri GC-MS analize

Pripremljeni derivatizovani ekstrakti uzoraka brašna i hleba analizirani su na gasnom hromatografu 7890 povezanim sa masenim spektrometrom 5975 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD). Identični eksperimentalni uslovi su primenjeni pri analizi liposolubilnih i hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna svih ispitivanih cerealija, pseudocerealija, i kora i sredina hleba.

- Zapremina od 1 μ l svakog ispitivanog uzorka injektovana je uz split-odnos od 1:50.
- Temperatura injektora je podešena na 250°C.
- Korišćena je hromatografska kolona DB-5ms (30 m dužine, 0,25 mm unutrašnjeg prečnika i debljine sloja stacionarne faze 25 μ m).
- Stacionarna faza: 5%-fenil-95%-dimetilarilensiloksan.
- Mobilna faza: helijum, pri protoku od 0,8 ml/min.
- Primenjen je sledeći temperaturni program: 50-130°C pri 30°C/min i 130-300°C pri 10°C/min.
- U cilju fragmentacije korišćena je jonizacija elektronima energije 70 eV.
- Maseni spektri snimani su u SCAN modu, od 30 do 500 m/z .
- Sa hromatograma ukupne jonske struje (TIC) izolovani su jonski hromatogrami: 74 m/z (u slučaju liposolubilnih ekstrakata) i 73 m/z u kombinaciji sa bar jednim od sledećih jona: 204 m/z , 217 m/z i 361 m/z (u slučaju hidrosolubilnih ekstrakata).

III-4. Analiza hromatograma

Dobijeni hromatogrami svih ispitivanih uzoraka brašna cerealijska i pseudocerealijska, kao i uzoraka proizvedenog hleba analizirani su primenom *MSD Productivity ChemStation* programa (Agilent Technologies, SAD).

Eluirajuće komponente identifikovane su poređenjem karakterističnih fragmentacionih spektara sa *Wiley275* i *NIST08* bibliotekama masenih spektara uz *Probability Based Matching (PBM)* algoritam, odnosno algoritam najveće verovatnoće podudaranja spektara.

III-4.1. Kreiranje numeričkih matrica u TIC modu

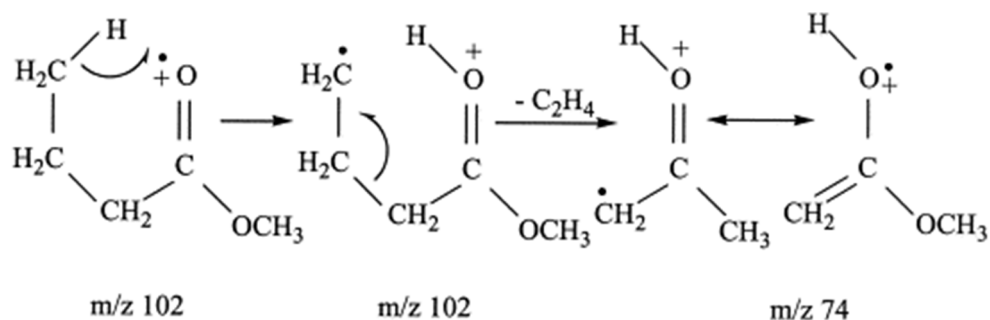
Na hromatogramima ukupne jonske struje (TIC) liposolubilnih ekstrakata detektovane su eluirajuće lipidne komponente: metil-estri masnih kiselina i neosapunjive materije (različiti tokohromanoli, fitosteroli i skvalen). Na hromatogramima ukupne jonske struje (TIC) hidrosolubilnih ekstrakata detektovane su eluirajuće ugljenohidratne komponente: monosaharidi, disaharidi, šećerni alkoholi, kao i pojedina aromatična jedinjenja.

Površine hromatografskih pikova ovih komponenata su integrisane i njihove vrednosti iskorišćene za kreiranje numeričkih matrica ispitivanih uzoraka.

III-4.2. Kreiranje numeričkih matrica u IC modu

Alternativni način primene masenog spektrometra, kao veoma osetljivog i selektivnog detektora, je odabir jednog ili nekoliko odabranih jona iz poznatog fragmentacionog spektra analiziranih komponenata. Odabirom selektovanog jona sa hromatograma jonske struje izoluje se jonski hromatogram (IC). Selektivnost ovakvog načina rada se povećava sa brojem odabranih karakterističnih jona, ali prema literaturi, odabir dva do tri specifična jona je sasvim dovoljan (Gerhardt, 1990).

Sa hromatograma ukupne jonske struje (TIC) liposolubilnih heksanskih ekstrakata izdvojeni su samo signali fragmentnog jona $74\ m/z$, takozvanog jona *McLafferty*-jevog premeštanja, koji je karakterističan za metil-estre masnih i karboksilnih kiselina, uopšte (McLafferty, 1959; McLafferty i Tureček, 1993; Takayama, 1995; Gross, 2011). *McLafferty*-jevo premeštanje definiše se kao transfer vodonika iz γ -položaja na atom povezan dvostrukom vezom kroz šestočlano prelazno stanje uz raskidanje veze u β -položaju. To je karakteristična pojava u masenoj spektrometriji metil-estara masnih i karboksilnih kiselina elektronskom jonizacijom (Takayama, 1995). Nastanak karakterističnog fragmentnog jona *McLafferty*-jevog premeštanja od $74\ m/z$ prikazan je na slici, na primeru metil-estra buterne kiseline.



Slika 4. Primer nastanka karakterističnog fragmentnog jona $74\ m/z$ elektronskom jonizacijom metil-estra buterne kiseline (Nibbering, 2004)

Slika I u Prilogu 2, strana ii, predstavlja maseni spektar sa karakterističnim jonom $74\ m/z$ relativno visokog intenziteta. Prikazani spektar predstavlja spektar pika na $R_t = 12.927$ min, odnosno pika palmitinske kiseline, koji eluira na TIC hromatogramu liposolubilnog ekstrakta uzorka brašna spelte, genotipa Austrija (S1).

Slika II u Prilogu 2, strana iii, predstavlja hromatogram ukupne jonske struje (TIC, slika II-A) i hromatogram monitoringa selektovanog *McLafferty*-jevog jona od $74\ m/z$ (IC, slika II-B) liposolubilnog ekstrakta uzorka brašna spelte, genotipa Austrija. Opšte je poznato da pikovi zasićenih masnih kiselina pokazuju najveći intenzitet ovog jona, a on opada sa povećanjem dvostrukih veza u molekulu (na piku linolne kiseline je mali, izraženiji je na piku oleinske, a najizraženiji je na piku palmitinske kiseline). Kada se pik jona mase $74\ m/z$ poklapa sa pikom na TIC hromatogramu, bibliotečkim proveravanjem kompletnog spektra na datom retencionom vremenu utvrdi se da li on predstavlja pik metil-estra neke masne kiseline. Ukoliko je to slučaj, pik ove lipidne komponente uzima se u obzir pri daljoj obradi podataka.

Sa hromatograma ukupne jonske struje (TIC) hidrosolubilnih ekstrakata izdvojeni su signali jona $73\ m/z$, karakterističnog za sve trimetilsilil-derivate, $204\ m/z$ i $217\ m/z$, koji su najizraženiji u fragmentima trimetilsilil-derivata monosaharida (piranoznog i furanoznog prstena, respektivno) (Karady i Pines, 1970) i jona $361\ m/z$, najizraženijeg u fragmentima trimetilsilil-derivata disaharida (Füzfai et al., 2008). Joni $73\ m/z$, $204\ m/z$ i $217\ m/z$ karakteristični su i za pojedina aromatična jedinjenja (Psodorov et al., 2015a).

Slika III u Prilogu 2, strana iv, prikazuje primere masenih spektara pojedinih šećera u uzorcima brašna različitih genotipova cerealija: pšenice (Rapsodija W2), kukuruza (hibrid NS 17 - C9) i ječma (NS Zitos B3). Sa slike III se uočavaju karakteristični obrasci fragmentacije pikova koji predstavljaju molekul heksapiranoze ($R_t = 16.081$ min), pentafuranoze ($R_t = 11.381$ min) i molekul disaharida ($R_t = 18.930$ min), koji eluiraju na hromatogramima hidrosolubilnih ekstrakata nasumično odabranih uzoraka brašna različitih genotipova cerealija: pšenice (Rapsodija W2), kukuruza (hibrid NS 17 - C9) i ječma (NS Zitos B3).

Slika IV-A u Prilogu 2, strana v, predstavlja preklapljene jonske hromatograme hidrosolubilnog ekstrakta uzorka brašna C1 nasumično odabranog hibrida kukuruza (NS 5), na kome se uočavaju karakteristični fragmentni joni prostih šećera. Slika IV-B

prikazuje i uvećan deo jonskog hromatograma sa primerom detektovanog pika prostog šećera, na kome se preklapaju pikovi čak svih karakterističnih jona 73 m/z , 204 m/z , 217 m/z i 361 m/z i koji je, stoga, uzet u obzir za dalju analizu podataka.

U cilju multivarijante obrade u obzir su uzete isključivo automatski integrisane površine onih pikova na TIC hromatogramima, koji sadrže kombinaciju jona 73 m/z , karakterističnog za sve trimetil-silil derivate, sa barem jednim od odabranih karakterističnih fragmentnih jona prostih šećera (204 m/z , 217 m/z i 361 m/z). Pikovi koji sadrže fragmentni jon 204 m/z predstavljaju monosaharid piranoznog prstena; pikovi koji sadrže jon 217 m/z monosaharid furanoznog prstena, a pikovi sa karakterističnim jonom od 361 m/z molekule disaharida.

Identifikacijom pikova koji sadrže samo signale ovih odabranih jona potvrđeno je njihovo lipidno, odnosno, ugljenohidratno poreklo. Površine selektovanih pikova od interesa su integrisane i njihove vrednosti iskorišćene za kreiranje numeričkih matrica ispitivanih uzoraka.

III-4.3. Kreiranje binarnih matrica

U pojedinim slučajevima se sakupljeni podaci, koji mogu biti izraženi u različitim fizičkim veličinama i dobijeni najrazličitijim fizičkim i hemijskim analitičkim postupcima, značajno razlikuju u numeričkim vrednostima i njihovom redu veličina. U takvim slučajevima neophodna je prethodna obrada podataka, kako bi se obezbedili jednaki individualni doprinosi svih varijabli na ishod, odnosno kako bi se sprečio neravnomeran uticaj različitih varijabli na krajnji rezultat (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002). U opisanom radu predtretmanu nisu podvrgnuti oni rezultati, koji su dobijeni pri istom analitičkom postupku, na istom modelu GC-MS uređaja, u istom vremenskom periodu i pri istom modu akvizicije podataka. Međutim, u slučaju kada su multivarijantnoj obradi podvrgnuti analitički podaci uzoraka koji su analizirani u različitim vremenskim periodima (uzorci brašna svih genotipova spelte, heljde i amarantusa), na različitim modelima GC-MS instrumenata i pri različitom modu akvizicije podataka, primenjen je binarni sistem predtretmana dobijenih numeričkih matrica. Cilj primene binarnog sistema je da se u analizu uključe uzorci brašna ispitivani u ranijim analizama (Ačanski i Vujić, 2014a; Ačanski et al., 2015b). Na ovaj način je ispitana mogućnost multivarijantne analize GC-MS binarnog sistema podataka velikog broja uzoraka veoma različitog botaničkog porekla. Na hromatogramima ukupne jonske struje (TIC) liposolubilnih ekstrakata detektovane su eluirajuće lipidne komponente: metil-estri masnih kiselina i neosapunjive materije - različiti tokohromanoli, fitosteroli i skvalen. Na hromatogramima ukupne jonske struje (TIC) hidrosolubilnih ekstrakata detektovane su eluirajuće ugljenohidratne komponente: monosaharidi, disaharidi, šećerni alkoholi, kao i pojedina aromatična jedinjenja. Apsolutno prisustvo svih eluirajućih liposolubilnih i hidrosolubilnih komponenata od značaja u svim ispitivanim uzorcima brašna cerealija i pseudocerealija označeno je kodom „1“, a njihovo apsolutno odsustvo kodom „0“. Ukoliko je pojedina lipidna ili ugljenohidratna komponenta bila prisutna u

više od 50% genotipova iste botaničke vrste cerealije ili pseudocerealije, onda je ona označena kodom „1/0“, a kodom „0/1“ ukoliko je ona prisutna u manje od 50% uzoraka genotipova iste botaničke vrste. Ovakav sistem obeležavanja primenjen je u tabelama lipidnih i ugljenohidratnih profila uzoraka brašna. Međutim, kreirane binarne matrice korišćene u daljoj multivarijantnoj obradi podataka sadržale su isključivo apsolutne vrednosti „1“ i „0“. Ukoliko je pojedina lipidna ili ugljenohidratna komponenta bila prisutna ili odsutna u svim slučajevima, odnosno, u svim uzorcima genotipova svih ispitivanih botaničkih vrsta, ona je isključena iz dalje obrade podataka, jer ne predstavlja osnovu za uspešnu diferencijaciju analiziranih cerealija i pseudocerealija prema biljnoj vrsti.

III-5. Multivarijantna analiza GC-MS podataka

U svrhu multivarijantne analize kreiranih numeričkih i binarnih matrica primenjeni su statistički programi PAST, verzije 2.17 i 3.16 (Hammer et al., 2001), kao i softverski paket STATISTICA 10.0 (Hill i Lewicki, 2007). U ovoj studiji ispitane su mogućnosti istraživačkih tehnika u multivarijantnoj obradi dobijenih podataka. Hijerarhijska klaster analiza (HCA) i analiza osnovnih koordinata (PCO) primenjene su sa ciljem klasifikacije analiziranih objekata u grupe. Analiza osnovnih komponenata (PCA) je primenjena kako sa ciljem klasifikacije uzoraka, tako i sa ciljem ispitivanja mogućih korelacija između ispitivanih parametara. Prilikom klasifikacije analiziranih objekata primenom hijerarhijske klaster analize i analize osnovnih koordinata ispitane su performanse različitih algoritama i različitih indeksa sličnosti, pri standardno korišćenoj vrednosti eksponenta transformacije ($c = 2$) (Varmuza i Filzmoser, 2008; Lee i Yang, 2009; Abdi i Williams, 2010; Ares, 2014; Derndorfer i Baierl, 2014; Grane i Jach, 2014).

III-6. Mikroskopija

III-6.1. Analiza svetlosnim mikroskopom

Skrobne granule uzoraka brašna svake botaničke vrste cerealija (pšenica, ječam, raž, tritikale, ovas i kukuruz) analizirane su primenom svetlosnog mikroskopa. Uzorci su pripremljeni prema modifikovanoj metodi iz Kaluđerski i Filipović (1998).

Po 2,0 g svakog uzorka brašna odmereno je na tehničkoj vagi i prenešeno u staklenu čašu od 50 ml. Da bi se formiralo gusto testo, dodato je nekoliko kapi destilovane vode uz mešanje staklenim štapićem. Ispiranjem dobijenog testa destilovanom vodom sakupljene su skrobne granule u drugoj staklenoj čaši, zapremine 100 ml. Suspenzije skrobnih granula analiziranih uzoraka cerealija ostavljene su 24 sata u frižideru, na 4°C, u cilju precipitacije.

Istaložene granule skroba su potom analizirane primenom svetlosnog mikroskopa (Leika Imaging Systems, Kembridž, Velika Britanija), pod uvećanjem od 400 puta. Mikrografi skrobnih granula dobijeni su korišćenjem programa *Zoom Browser EX* (Canon, Tokio, Japan) i korišćeni su za merenje srednjih vrednosti njihovih prečnika.

III-6.2. Analiza elektronskim mikroskopom

Skrobne granule po jednog uzorka brašna svake botaničke vrste cerealija (pšenica, ječam, raž, tritikale, ovas i kukuruz) analizirane su primenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM). Uzorci za analizu pripremljeni su prema sopstvenoj metodi.

Po 2,0 g svakog uzorka brašna odmereno je na tehničkoj vagi i prenešeno u staklenu čašu od 50 ml. Kako bi se formiralo gusto testo, dodato je nekoliko kapi destilovane vode uz mešanje staklenim štapićem. Ispiranjem dobijenog testa destilovanom vodom sakupljene su skrobne granule u drugoj staklenoj čaši, zapremine 100 ml. Suspenzije skrobnih granula analiziranih uzoraka cerealija ostavljene su 24 sata u frižideru, na 4°C, u cilju precipitacije. Bistri supernatanti su odstranjeni, a precipitati skrobnih granula sa dna staklenih čaša presuti u epruvete, u cilju dodatne precipitacije u toku naredna 24 sata, na 4°C. Gornji, bistri delovi su ponovo odstranjeni, a gusti talozi sa dna epruvete iskorišćeni za dalju analizu.

Istaložene granule skroba su potom analizirane primenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa JSM-6460LV (JEOL, Peabody, MA, SAD) pod uvećanjem od 500 i 1000 puta, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

IV

**Rezultati i
diskusija**

IV-A

Analiza brašna

IV-A-1.

**Kvalitativni profili
uzoraka brašna**

IV-A-1.1. Profili liposolubilnih ekstrakata brašna

GC-MS sistem predstavlja najčešće primenjivani analitički sistem u karakterizaciji lipidnih matriksa. Međutim, podrazumeva se da analizi uzoraka prethode izvesni postupci pripreme i derivatizacije (Di Stefano et al., 2012). Detektovane derivatizovane komponente liposolubilnih ekstrakata uzoraka brašna biljnih vrsta cerealija i pseudocerealija ispitivanih u ovoj doktorskoj disertaciji su: masne kiseline različitih dužina lanaca - u vidu odgovarajućih metil-estara, α -izomer tokoferola, skvalen i različiti fitosteroli. Masena spektrometrija se pokazala kao pogodna tehnika za identifikaciju lipidnih komponenata, dajući pri tome veoma visoke vrednosti podudaranja sa fragmentacionim spektrima datih jedinjenja iz korišćenih biblioteka masenih spektara. U tabeli 7 prikazane su detektovane komponente liposolubilnih ekstrakata brašna, analiziranih botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija, prikazanih u tabeli 4. Svakoj navedenoj komponenti u tabeli 7, navedeno je retenciono vreme (R_t), skraćeni naziv, kao i zastupljenost u uzorcima brašna analiziranih biljnih vrsta. U Poglavlju II-5.1., na strani 29, dati su podaci o lipidnom sastavu botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija.

Posmatranjem hromatograma ukupne jonske struje liposolubilnih ekstrakata svih ispitivanih uzoraka brašna cerealija i pseudocerealija, datih u Prilogu 2 (slike XIII - XXI, strane ix - xiv), vizuelno se uočavaju tri dela. Prvi deo hromatograma obuhvata metil-estre masnih kiselina sa 12 - 15 ugljenikovih atoma u molekulu. Te komponente su prisutne u manjim količinama. Drugi deo hromatograma obuhvata metil-estre dominantnih masnih kiselina, zasićenih i nezasićenih, sa 16 - 18 ugljenikovih atoma u molekulu. U trećem delu hromatograma su metil-estri masnih kiselina sa više od 18 ugljenikovih atoma u molekulu (19-26), koji su takođe prisutni u manjoj meri. U pojedinim uzorcima brašna ispitivanih cerealija i pseudocerealija detektovane su i neke od sledećih neosapunjivih materija: α -izomer tokoferola, skvalen, kampesterol, stigmasterol, γ -sitosterol i etilholestanol. Neosapunjive materije se vizuelno uočavaju u trećem delu hromatograma.

Tabela 7. Retenciona vremena (R_t), nazivi detektovanih komponenata, skraćenice detektovanih komponenata i njihovo prisustvo/odsustvo u liposolubilnim ekstraktima brašna, ispitivanih botaničkih vrsta cerealijskih i pseudocerealijskih

R_t	Jedinjenje	Skraćenica	C	W	R	T	O	B	S	A	H
8.34	Dodekanska (laurinska) kiselina, metil-estar	C12:0	● ^a	●	●	●	●	●	× ^b	×	×
10.19	Tetradekanska (miristinska) kiselina, metil-estar	C14:0	●	●	●	●	●	●	●	●	×
11.23	Pentadekanska (pentadecilinska) kiselina, metil-estar	C15:0	●	●	●	●	●	●	×	●	×
12.04	9-Heksadecenska (palmitoleinska) kiselina, metil-estar	C16:1	●	●	●	●	●	●	×	×	×
12.25	Heksadecanska (palmitinska) kiselina, metil-estar	C16:0	●	●	●	●	●	●	●	●	●
13.19	Heptadecanska (margarinska) kiselina, metil-estar	C17:0	●	●	●	●	●	●	●	●	×
13.92	9,12-Oktadekadienska (linolna) kiselina, metil-estar	C18:2	●	●	●	●	●	●	●	●	●
13.96	9-Oktadecenska (oleinska) kiselina, metil-estar	C18:1	●	●	●	●	●	●	●	●	●
14.12	Oktadecanska (stearinska) kiselina, metil-estar	C18:0	●	●	●	●	●	●	●	●	●
14.86	10-Nonadecenska kiselina, metil-estar	C19:1	○ ^c	×	×	×	×	×	×	×	×
15.04	Nonadecanska (nonadecilinska) kiselina, metil-estar	C19:0	●	×	×	×	×	×	×	●	×
15.67	11-Eikozenoinska (gondoinska) kiselina, metil-estar	C20:1	●	●	●	●	●	●	×	×	●
15.87	Eikozanska (arahidinska) kiselina, metil-estar	C20:0	●	○	×	×	×	×	×	●	●
16.69	Heneikozanska (heneikozilinska) kiselina, metil-estar	C21:0	○	×	×	×	×	○	●	×	×
16.90	12-Hidroksi-9-oktadecenska (ricinoleinska) kiselina, metil-estar	RA	×	○	●	●	●	○	×	×	×

Tabela 7. Nastavak

R_t	Jedinjenje	Skraćenica	C	W	R	T	O	B	S	A	H
17.23	9,10-Dihidroksistearinska ili 13-Dokozenska (eruka, erukinska) kiselina, metil-estar	DHSA	×	×	×	×	●	○	×	×	×
17.48	Dokozanska (behenska) kiselina, metil-estar	C22:0	●	●	●	●	●	●	●	●	●
18.28	Trikozanska (trikožilna) kiselina, metil-estar	C23:0	×	○	×	×	×	×	×	●	×
19.17	Tetrakozanska (lignocerinska) kiselina, metil-estar	C24:0	●	●	●	●	●	●	●	●	●
20.01	Kampesterol	CA	○	×	×	×	×	×	×	×	×
20.21	Pentakozanska (pentakozilinska) kiselina, metil-estar	C25:0	●	×	×	×	×	×	×	●	×
20.27	Skvalen	SQ	○	×	×	×	×	×	○	●	×
20.88	Stigmasterol	ST	○	×	×	×	×	×	×	×	×
21.14	γ -Sitosterol	γ SI	×	×	×	×	×	×	×	●	×
21.22	α -Tokoferol	α T	×	●	×	×	×	×	×	×	×
21.32	Etilholestanol	ECH	×	×	×	×	×	×	×	●	×
21.45	Heksakozanska (ceratinska) kiselina, metil-estar	C26:0	●	●	●	○	●	○	○	●	×

● Lipidna komponenta detektovana u svakom analiziranom genotipu u okviru određene biljne vrste.

× Lipidna komponenta koja nije detektovana ni u jednom analiziranom genotipu u okviru određene biljne vrste.

○ Lipidna komponenta detektovana u pojedinim genotipovima u okviru određene biljne vrste.

Korišćene kraćenice: C – kukuruz, W – hlebna pšenica, R – raž, T – tritikale, O – ovas, B – ječam, S – spelta, A – amarantus, H – heljda.

Podaci za speltu, amarantus i heljdu preuzeti su iz reference Ačanski et al., 2015b.

IV-A-1.2. Profili hidrosolubilnih ekstrakata brašna

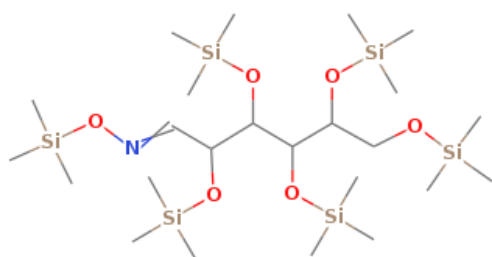
Literatura i u ovom slučaju navodi da, iako zahtevaju derivatizaciju, monosaharidi i oligosaharidi nižih molekulskih masa najčešće se analiziraju primenom GC-MS sistema (Di Stefano et al., 2012). Detektovane komponente ugljenih hidrata nižih molekulskih masa (prostih šećera), hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna analiziranih biljnih vrsta cerealija i pseudocerealija, tabela 8, uključuju jedan poliol sa 4 ugljenikova atoma – eritritol, različite pentitole i pentoze, heksitole i heksoze, kao i neke disaharide, među kojima je najzastupljenija saharoza. Prosti, rastvorljivi šećeri imaju vrlo slične molekulske strukture i odlikuju se postojanjem velikog broja strukturnih i optičkih izomera, pa su molekulske fragmentacije njihovih derivata veoma slične. Primeri sličnosti trimetilsilil-oksima nekih od detektovanih prostih šećera (aloze, galaktoze, glukoze i manoze), dati su na slici 5. Ovo umnogome otežava tačnu identifikaciju eluirajuće šećerne komponente primenom masene spektrometrije, jer se na ovaj način dobijaju približno jednake vrednosti podudaranja masenog spektra analizirane komponente, sa više bibliotečkih primera masenih spektara.

U tabeli 8 prikazane su sve detektovane ugljenohidratne komponente hidrosolubilnih ekstrakata brašna analiziranih botaničkih vrsta cerealija (strnih žita i prosolikog žita), kao i zastupljenost detektovanih komponentata u uzorcima brašna analiziranih biljnih vrsta*.

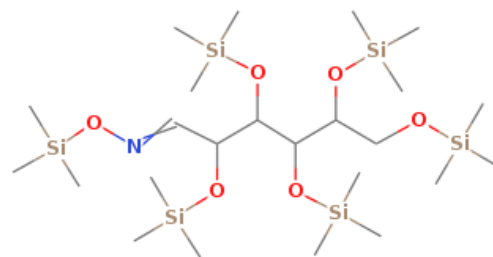
Posmatranjem hromatograma ukupne jonske struje hidrosolubilnih ekstrakata svih ispitivanih uzoraka brašna cerealija i pseudocerealija, datih u Prilogu 2 (slike VI, VIII, X, XII i XIII, na stranama vi - x), vizuelno se uočavaju tri dela. Prvi deo hromatograma obuhvata šećere i alkohole sa 4 i 5 ugljenikovih atoma u molekulu. Drugi deo hromatograma čine različite heksoze i njihovi alkoholi –heksitoli. U trećem delu svih hromatograma nalaze se odgovarajući disaharidi.

U Poglavlju II-5.2., na strani 32, dati su podaci o sastavu prostih, rastvorljivih šećera botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija.

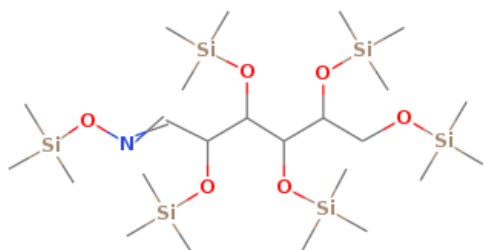
* Usled primene različitih reagenasa za derivatizaciju u analizi šećernih komponentata, uzorci brašna cerealije spelte i pseudocerealija (heljde i amarantusa), analizirani u ranijim istraživanjima, nisu uključeni u tabelu 8 (Ačanski i Vujić, 2014a).



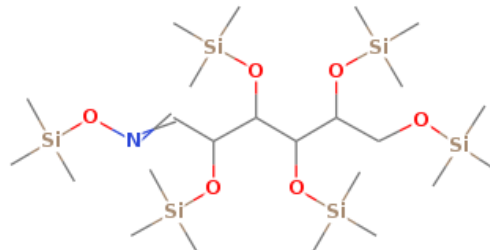
Aloza



Galaktoza



Glukoza



Manoza

Slika 5. Prikaz dvodimenzionalne projekcije identičnih struktura trimetilsilil-oksimskih derivata 4 različita monosaharida detektovana u ovoj studiji: aloze, galaktoze, glukoze i manoze. (NIST Chemistry WebBook, SRD 69, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>)

Tabela 8. Retenciona vremena (R_t), nazivi detektovanih komponenata i njihovo prisustvo/odsustvo u hidrosolubilnim ekstraktima brašna, ispitivanih botaničkih vrsta cerealijsa

R_t	Jedinjenje	C	W	R	T	O	B
8.05	Eritritol, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	×	×	×	×	×
10.40	Ksilitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-	●	●	●	●	●	●
10.80	Arabinitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-	●	×	×	×	×	×
11.30	D-Arabinoza, tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	●	●	●	●	●
11.38	D-Arabinska kiselina, 2,3,5-tris-O-(trimetilsilil)-	●	×	×	×	×	×
12.10	D-Glukoza, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-	●	×	×	×	×	×
12.20	D-Manoza, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	×	×	×	×	×
12.61	D-Manitol, 1,2,3,4,5,6-heksakis-O-(trimetilsilil)-	×	●	●	●	○	●
12.69	D-Glucitol, 1,2,3,4,5,6-heksakis-O-(trimetilsilil)-	×	●	●	●	●	●
12.80	Ksilitol, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	×	●	●	●	●	●
13.02	D-Glukoza, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-	○	×	×	×	×	×
13.25	D-Glucitol, 1,2,3,4,5,6-heksakis-O-(trimetilsilil)-	●	●	●	●	●	●
16.09	D-Glukoza, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-	×	●	●	●	●	●

Tabela 8. Nastavak.

R_i	Jedinjenje	C	W	R	T	O	B
17.61	D-Manoza, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	●	×	×	×	×	×
17.84	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	●	●	●	●	●
18.38	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	●	●	●	●	●
18.52	Gvajakol- β -D-glukopiranozid--O-(trimetilsilil)-	×	○	×	×	●	○
18.57	D-Turanoza, 2,3,4,2,3,4,6-heptakis-(trimetilsilil)-	×	○	×	×	●	○
18.80	Melibioza, 2,3,4,6,1,2,3,4-oktakis-(trimetilsilil)-	×	●	×	●	●	○
18.92	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	●	●	●	●	●
20.85	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	○	×	●	●	○
21.39	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	●	○	×	●	●	○

● Ugljenohidratna komponenta detektovana u svakom analiziranom genotipu u okviru određene biljne vrste.

× Ugljenohidratna komponenta koja nije detektovana ni u jednom analiziranom genotipu u okviru određene biljne vrste.

○ Ugljenohidratna komponenta detektovana pojedinim genotipovima u okviru određene biljne vrste.

Korišćene kraćenice: C – kukuruz, W – hlebna pšenica, R – raž, T – tritikale, O – ovas, B – ječam

IV-A-2.

**Homogenost
uzoraka brašna**

IV-A-2.1. Homogenost genotipova heljde

Analizirani su masno-kiselinski profili liposolubilnih ekstrakata i ugljenohidratni profili hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna, dobijenih od 9 domaćih genotipova heljde: Godijeva (H1), Bambi (H2), Darja (H3), Francuska (H4), Prekumurska (H5), Češka (H6), Čebelica (H7), Novosadska (H8) i Spacinska (H9). Poređenjem liposolubilnih i hidrosolubilnih profila utvrđen je stepen sličnosti između analiziranih uzoraka, kao i mogućnost njihovog razlikovanja (Ačanski et al., 2015a; Pastor et al., 2015a).

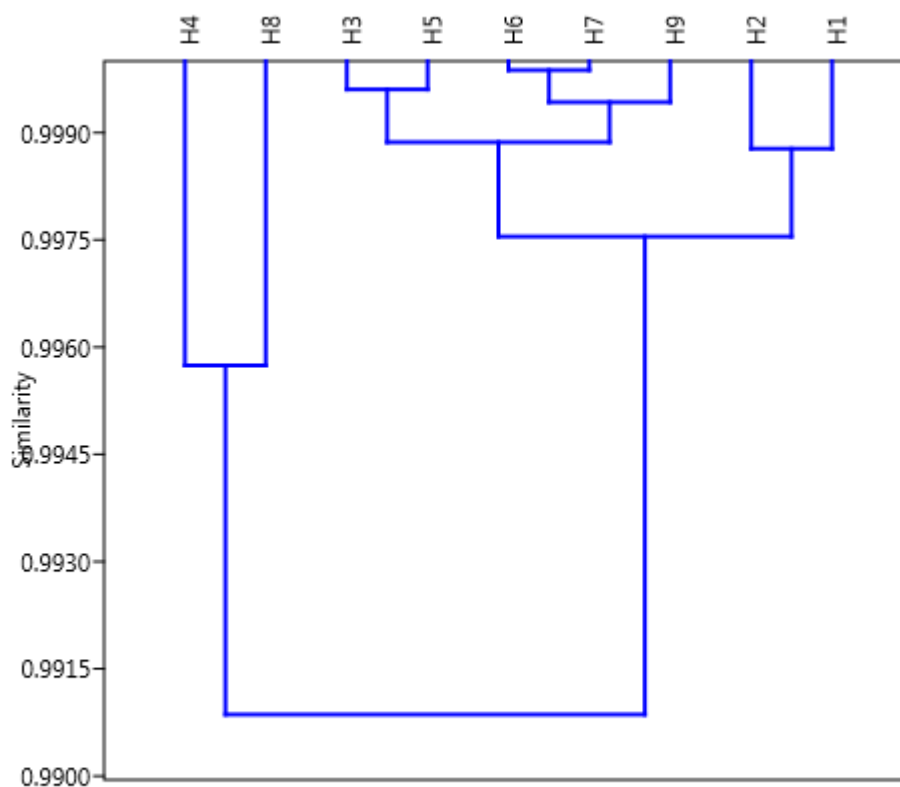
IV-A-2.1.1. Homogenost liposolubilnih profila brašna heljde

Slika V u Prilogu 2, strana vi, prikazuje preklapljene hromatograme ukupne jonske struje (TIC) liposolubilnih komponenata uzoraka brašna, svih 9 analiziranih genotipova heljde. Detektovane lipidne komponente prikazane su u tabeli 7, na strani 65.

Profili masnih kiselina identični su u analiziranim uzorcima brašna svih 9 genotipova heljde. Kao što je već rečeno, hromatogrami liposolubilnih ekstrakata (slika V u Prilogu 2) se vizuelno mogu podeliti na tri dela. Prvom delu hromatograma pripadaju metil-estri minornih masnih kiselina sa manje od 16 ugljenikovih atoma u molekulu, koje ispitivani uzorci heljde ne sadrže. Drugi deo hromatograma obuhvata metil-estre najzastupljenijih masnih kiselina sa 16 do 18 ugljenikovih atoma u molekulu. To su heksadekanska (palmitinska), 9,12-oktadekadienska (linolna), 9-oktadecenska (oleinska) i oktadekanska (stearinska) kiselina. Treći deo hromatograma obuhvata metil-estre zasićenih i nezasićenih masnih kiselina sa više od 18 ugljenikovih atoma u molekulu, koji su u analiziranim uzorcima brašna heljde takođe prisutni u manjim količinama. U liposolubilnim ekstraktima heljde nisu detektovane neosapunjive materije.

Površine lipidnih komponenata metil-estara svih masnih kiselina su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Korišćen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Correlation*.

Dobijeni dendrogram korelacije masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 9 genotipova heljde, prikazan je na slici 6.



Slika 6. Dendrogram korelacije masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 9 genotipova heljde

Na x-osi dendrograma na slici 6, prikazano je rastojanje između analiziranih objekata – genotipova heljde. Koeficijent korelacije nalazi se na y-osi dendrograma i prikazuje njihovu sličnost. Očitavanjem vrednosti sa y-ose uočava se veoma visok stepen sličnosti između lipidnih profila uzoraka brašna analiziranih genotipova heljde ($y > 0,9900$). Može se uočiti da se uzorci brašna genotipova Francuska – H4 i Novosadska – H8 grupišu u klaster koji se odvaja od klastera ostalih genotipova, ali je stepen sličnosti između ova dva klastera i dalje u okviru veoma visokih vrednosti.

IV-A-2.1.2. Homogenost hidrosolubilnih profila brašna heljde

Slika VI u Prilogu 2, strana vi, prikazuje preklapljene hromatograme ukupne jonske struje hidrosolubilnih komponenata uzoraka brašna svih analiziranih genotipova heljde. Može se uočiti da su TIC hromatogrami svih 9 analiziranih uzoraka međusobno veoma slični. Detektovane ugljenohidratne komponente prikazane su u tabeli 9.

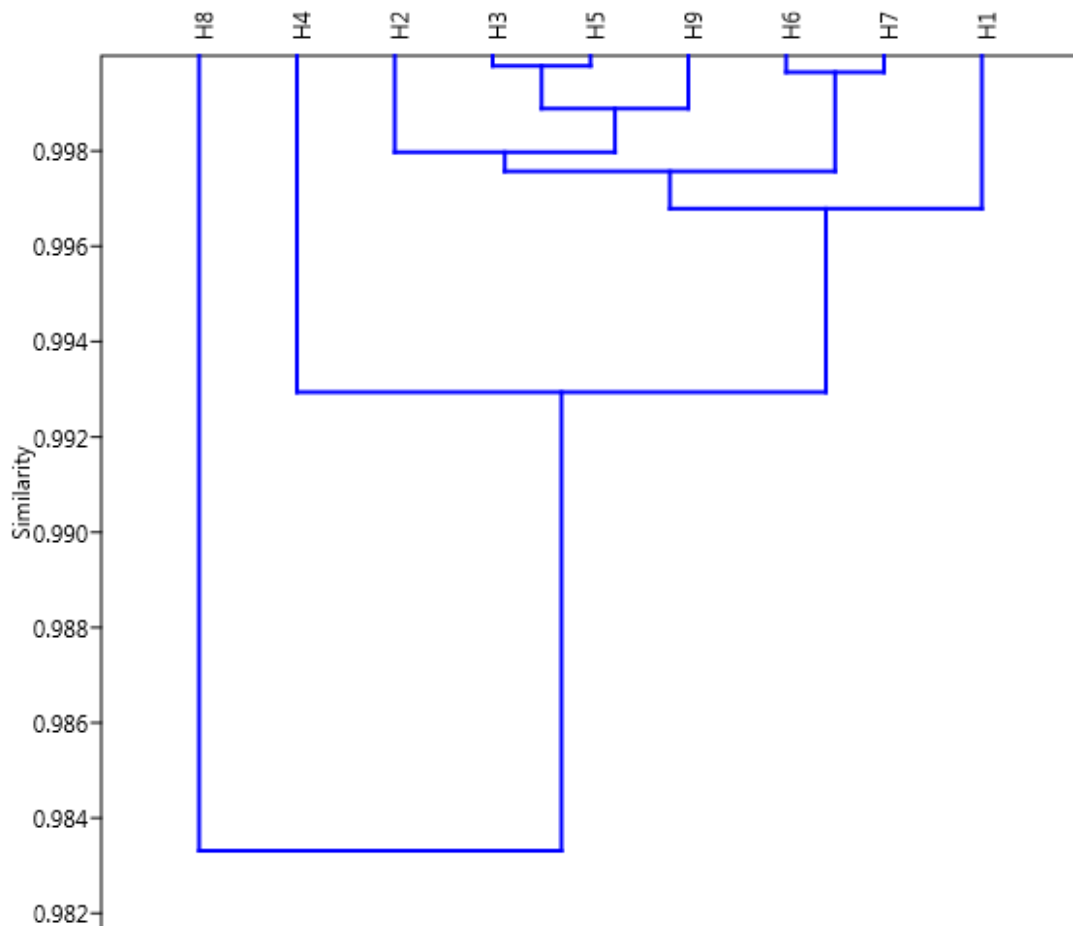
Tabela 9. Retenciona vremena i nazivi detektovanih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna, analiziranih genotipova heljde

R_t	Naziv komponente
8.23	Eritritol, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimetilsilil)-
9.32	Arabinitol-1,2,3,4,5,-pentakis-O-(trimetilsilil)-
10.51	Ksilitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-
10.72	Ribitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-
11.57	D-Arabinoza, tetrakis-O-(trimetilsilil)-
11.72	Sorboza, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-
11.80	D-Galaktoza, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)- piranozni oblik
12.00	D-Galaktoza, 1,2,3,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)- furanozni oblik
12.07	2-Deoksi-galaktoza, tetrakis-(trimetilsilil)-
12.14	D-Manoza, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-pentakis(trimetilsilil)
12.41	Taloza, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-
12.50	D-Manoza, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-
12.59	D-Galaktoza, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-
12.93	D-Glucitol, 1,2,3,4,5,6-heksakis-O-(trimetilsilil)-
13.13	Inozitol, 1,2,3,4,5,6-heksakis-O-(trimetilsilil)-, alo-
13.33	D-Glukoza, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-
13.83	Inozitol, 1,2,3,4,5,6-heksakis-O-(trimetilsilil)-, silo-
14.21	D-Aloza, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-
14.44	Inozitol, 1,2,3,4,5,6-heksakis-O-(trimetilsilil)-, mio-
18.09	D-Fruktoza, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-
19.00	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil-2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-
20.72	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil-2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-
21.15	Melibioza, oktakis-(trimetilsilil)-
21.52	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil-2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-
25.93	Maltoza, oktakis-(trimetilsilil)-

Posmatranjem dobijenih hromatograma ukupne jonske struje sa slike VI u Prilogu 2, na strani vi, mogu se uočiti tri značajne oblasti trimetilsilil-derivata ugljenih hidrata. Kao što je već rečeno, prvu oblast čine trimetilili-etri pentoza i alkohola pentitola, drugu trimetilsilil-etri heksoza i heksitola, a treću oblast nekoliko disaharida. Na hromatogramu na slici VI, od 18.00 do 22.00 min uočavaju se trimetilsilil-estri masnih kiselina, zaostali nakon nepotpunog obezmašćivanja. Interesantno je da je sadržaj masnih kiselina značajno veći u odnosu na sadržaj rastvorljivih ugljenih hidrata nižih molekulskih masa.

Površine ugljenohidratnih komponenata su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Korišćen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Correlation*.

Dobijeni dendrogram korelacije šećernih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna 9 genotipova heljde, prikazan je na slici 7.



Slika 7. Dendrogram korelacije šećernih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna 9 genotipova heljde

Sa dendrograma se može uočiti veoma velika sličnost hidrosolubilnih profila uzoraka brašna svih analiziranih genotipova heljde ($y > 0,982$). Takođe, i ovde se uočava se da se uzorci heljde genotipova Francuska - H4 i Novosadska - H8 nešto razlikuju u odnosu na uzorke ostalih analiziranih genotipova, ali je stepen sličnosti među njima i dalje u okviru veoma visokih vrednosti.

Svi analizirani genotipovi heljde pokazuju približan stepen sličnosti liposolubilnih i hidrosolubilnih profila.

IV-A-2.2. Homogenost genotipova ječma

Analizirani su lipidni profili heksanskih ekstrakata i ugljenohidratni profili etanolnih ekstrakata uzoraka brašna, dobijenih od domaćih genotipova ječma: 3 uzorka ozimog pivskog ječma (Novosadski 525 - B1, NS Pinon - B2, NS Zitos - B3), 3 uzorka ozimog stočnog ječma (Atlas - B4, Somborac - B5, Rudnik - B6), 1 uzorak jarog ječma (NS Marko - B7) i 1 uzorak golozrnog ječma (Golijat - B8). Poređenjem liposolubilnih i hidrosolubilnih profila utvrđen je stepen sličnosti između analiziranih uzoraka, kao i mogućnost njihovog razlikovanja (Pastor et al., 2015b).

IV-A-2.2.1. Homogenost liposolubilnih profila brašna ječma

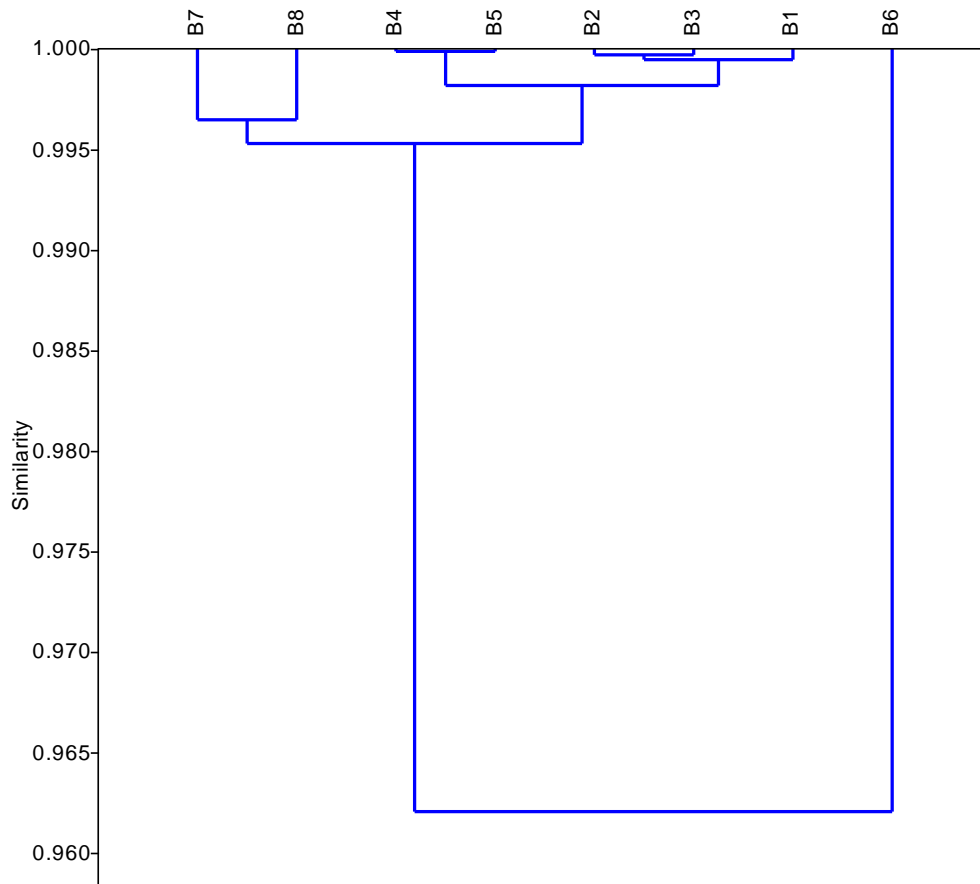
Slika VII u Prilogu 2, strana vii, prikazuje preklopljene hromatograme ukupne jonske struje liposolubilnih komponenata uzoraka brašna svih analiziranih genotipova ječma. Detektovane masne kiseline prikazane su u tabeli 7, na strani 65.

Na hromatogramu sa slike VII u Prilogu 2, vizuelno se uočavaju tri dela. U prvom delu hromatograma, nalaze se metil-estri minornih masnih kiselina sa manje od 16 ugljenikovih atoma u molekulu. Drugi deo hromatograma obuhvata metil-estre najzastupljenijih masnih kiselina, sa 16 do 18 ugljenikovih atoma u molekulu. To su heksadekanska (palmitinska), 9,12-oktadekadienska (linolna), 9-oktadecenska (oleinska) i oktadekanska (stearinska) kiselina. Treći deo hromatograma obuhvata metil-estre zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, sa više od 18 ugljenikovih atoma u molekulu, koji su u analiziranim uzorcima brašna ječma prisutni u manjim količinama. U liposolubilnim ekstraktima ječma nisu detektovane neosapunjive materije.

Površine lipidnih komponenata su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Korišćen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Correlation*, jer se primenom datih parametara na analizirane uzorke dobija najviša vrednost kofenetičkog koeficijenta korelacije (0,9951).

Dobijeni dendrogram korelacije masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna osam genotipova ječma, prikazan je na slici 8. Na x-osi prikazana je mera rastojanja između analiziranih objekata – genotipova ječma. Očitavanjem vrednosti sa y-ose, uočava se visok stepen sličnosti između masno-kiselinskih profila analiziranih uzoraka brašna osam genotipova ječma ($y > 0,960$). Uzorci brašna grupišu se u tri klastera analiziranih genotipova: (1) B1, B2, B3; (2) B4, B5; (3) B7, B8, ali je stepen sličnosti između tih izdiferenciranih grupa i dalje veoma

visok. Stepen sličnosti uzorka brašna genotipa ozimog stočnog ječma - B6 sa ostalim analiziranim genotipovima je visok ($y \sim 0,960$), iako po profilu liposolubilnih komponenata od njih blago odstupa.



Slika 8. Dendrogram korelacije masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 8 genotipova ječma

IV-A-2.2.2. Homogenost hidrosolubilnih profila brašna ječma

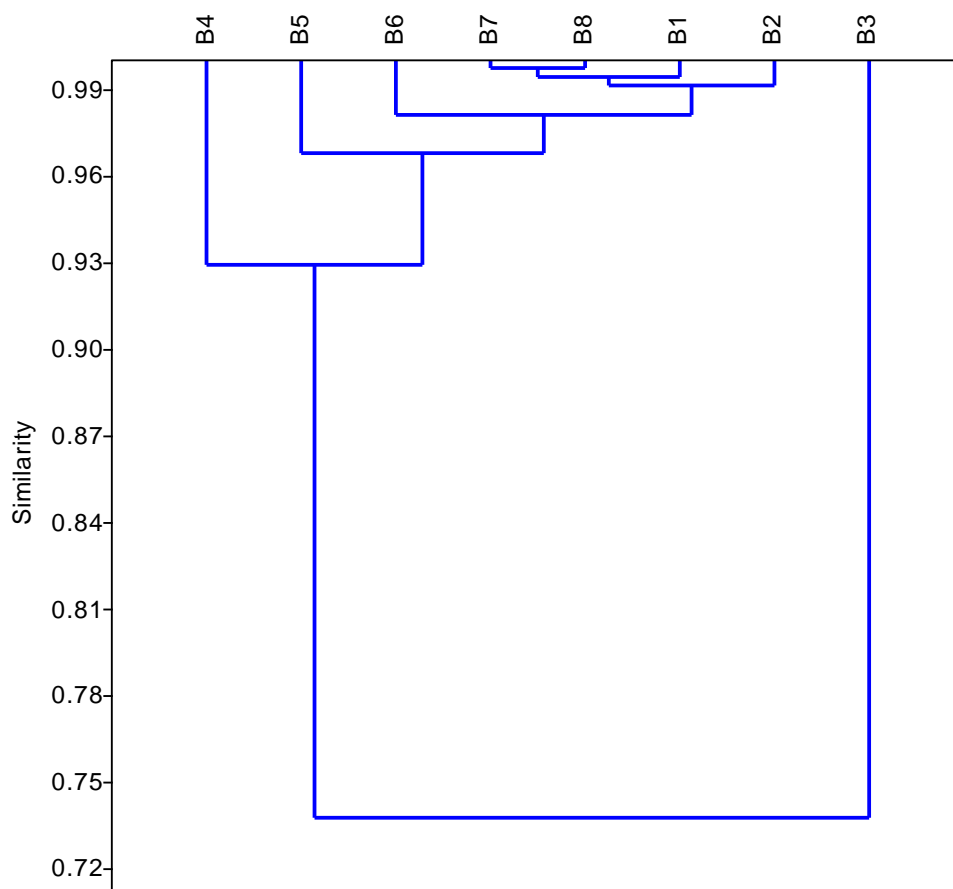
Slika VIII u Prilogu 2, strana vii, prikazuje preklopljene hromatograme ukupne jonske struje hidrosolubilnih komponenata uzoraka brašna, svih analiziranih genotipova ječma. Detektovane ugljenohidratne komponente prikazane su u tabeli 8, na strani 69.

Posmatranjem hromatograma sa slike VIII i detektovanih eluirajućih komponenata iz tabele 8, moguće je zaključiti da rastvorljive ugljenohidratne komponente prisutne u svim uzorcima brašna ječma sačinjavaju šećeri nižih molekulskih masa – monosaharidi i disaharidi, kao i pojedini šećerni alkoholi. Na hromatogramima se mogu uočiti tri značajne oblasti trimetilsilil-oksimskih derivata ugljenih hidrata. Kao što je već rečeno, prvu oblast čine trimetilsilil-oksimi pentoza i alkohola pentitola (arabinoza i ksilitol), drugu trimetilsilil-oksimi heksoza i heksitola (glukoza, glucitol i manitol), a treću oblast nekoliko disaharida - redukujući disaharidi (turanosa i melibioza), kao i neredukujuća saharoza.

Površine ugljenohidratnih komponenata su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Korišćen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Correlation*, jer se primenom datih parametara na analizirane uzorke dobija najviša vrednost kofenetičkog koeficijenta korelacije (0,9837).

Dobijeni dendrogram korelacije šećernih komponenata prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna osam genotipova ječma, prikazan je na slici 9.

Prema sastavu i sadržaju hidrosolubilnih komponenata, uzorak brašna genotipa ozimog pivskog ječma - B3, izdvaja se od ostalih analiziranih genotipova, koji međusobno pokazuju visok stepen sličnosti ($y \sim 0,93$). Uzorci brašna genotipova jarog i goloznog ječma, B7 i B8, grupišu se u jednu granu, jer ispoljavaju veću sličnost. Uzorci genotipova B1, B2, B6, B5 i B4 se individualno priključuju prema redosledu rastućeg stepena sličnosti. Uopšteno se može reći da je stepen sličnosti hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna svih analiziranih genotipova ječma relativno visok, $y > 0,72$. S druge strane, stepen sličnosti hidrosolubilnih ekstrakata ispitivanih uzoraka ječma ima značajno nižu vrednost u odnosu na stepen sličnosti dobijen korelacijom masnih kiselina liposolubilnih ekstrakata istih uzoraka.



Slika 9. Dendrogram korelacije šećernih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna 8 genotipova ječma

IV-A-2.3. Homogenost genotipova ovsa

Analizirani su masno-kiselinski profili liposolubilnih ekstrakata i ugljenohidratni profili hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna, dobijenih od 3 domaća genotipa ovsa: jari (Dunav – O1), ozimi (Jadar – O2) i golozrni (Sedef – O3). Poređenjem liposolubilnih i hidrosolubilnih profila, utvrđen je stepen sličnosti između analiziranih uzoraka (Ačanski et al., 2016a).

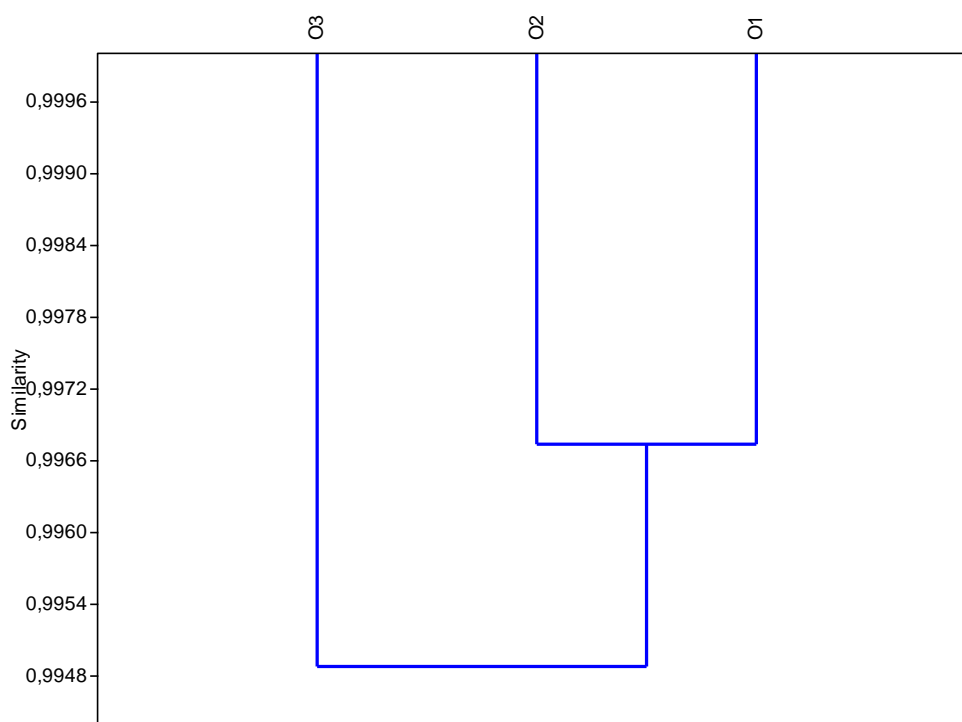
IV-A-2.3.1. Homogenost liposolubilnih profila brašna ovsa

Slika IX u Prilogu 2, strana viii, prikazuje preklopljene hromatograme ukupne jonske struje liposolubilnih komponenata uzoraka brašna tri analizirana genotipa ovsa. Detektovane masne kiseline prikazane su u tabeli 7, na strani 65.

Posmatranjem hromatogramima sa slike IX, isto kao što je bio slučaj kod heljde i ječma, vizuelno se uočavaju tri dela. U prvom delu hromatograma nalaze se metil-estri minornih masnih kiselina, koji sadrže do 16 ugljenikovih atoma u molekulu. Drugi deo obuhvata metil-estre najzastupljenijih masnih kiselina sa 16 - 18 ugljenikovih atoma u molekulu, a one uključuju heksadekansku (palmitinsku), 9,12-oktadekadiensku (linolnu), 9-oktadecensku (oleinsku) i oktadekansku (stearinsku). U drugom delu hromatograma takođe su detektovani estri 9-heksadecenske (palmitoleinske) i heptadekanske (margarinske) kiseline, ali u mnogo manjim količinama. Treći deo dobijenih hromatograma obuhvata metil-estre zasićenih i nezasićenih masnih kiselina sa više od 18 ugljenikovih atoma u molekulu, koji su prisutni u vrlo malim količinama u sva tri analizirana genotipa ovsa. U liposolubilnim ekstraktima ovsa nisu detektovane neosapunjive materije.

Površine metil-estara masnih kiselina su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Korišćen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Cosine*, jer se primenom datih parametara na analizirane uzorke dobija najviša vrednost kofenetičkog koeficijenta korelacije (0,9738).

Dobijeni dendrogram korelacije masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 3 genotipa ovsa, prikazan je na slici 10. Na x-osi prikazana je mera distance između analiziranih objekata – 3 genotipa ovsa, a koeficijent korelacije prikazan na y-osi prikazuje njihovu sličnost.



Slika 10. Dendrogram korelacije masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 3 genotipa ovsa

Može se uočiti da je čak i najniža vrednost sličnosti masno-kiselinskih profila analiziranih genotipova ovsa i dalje veoma visoka ($y \geq 0,9948$). Uzorci brašna genotipova ovsa O1 i O2 pokazuju viši stepen međusobne sličnosti ($y \geq 0,9966$), dok se masno-kiselinski profil genotipa golozrnog ovsa - O3, neznatno razlikuje.

IV-A-2.3.2. Homogenost hidrosolubilnih profila brašna OVSA

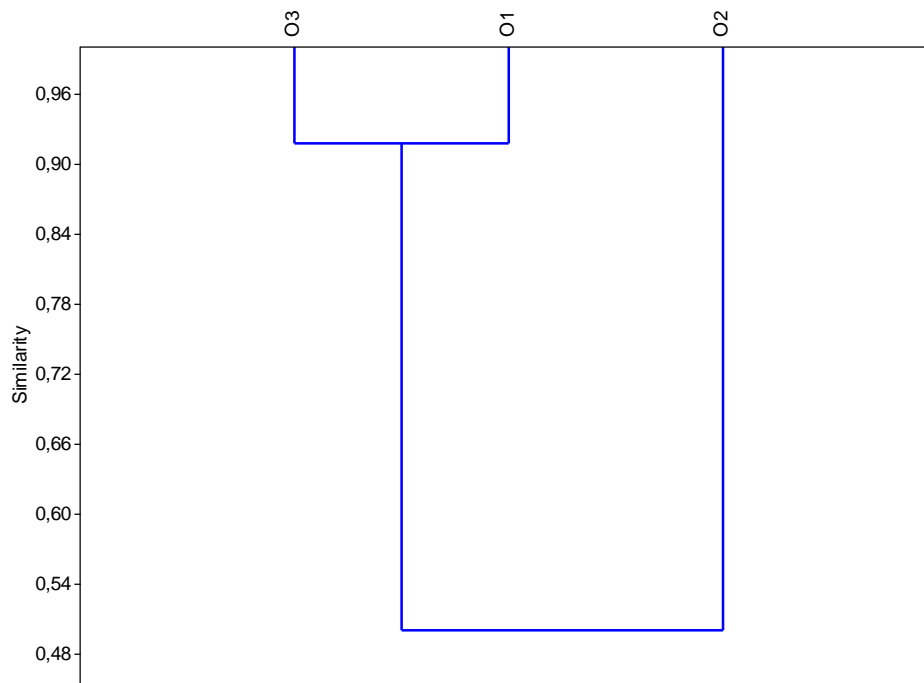
Slika X u Prilogu 2, strana viii, prikazuje preklapljene hromatograme ukupne jonske struje hidrosolubilnih komponenata uzoraka brašna tri analizirana genotipa ovsa. Detektovane ugljenohidratne komponente, u formi odgovarajućih trimetilsilil-oksima, prikazane su u tabeli 8, na strani 69.

Posmatranjem hromatograma sa slike X i detektovanih eluirajućih komponenata iz tabele 8, moguće je zaključiti da rastvorljive ugljenohidratne komponente, prisutne u svim uzorcima brašna ovsa, sačinjavaju trimetilsilil-oksimi šećera nižih molekulskih masa – monosaharida i disaharida, kao i pojedinih šećernih alkohola. Na hromatogramima se mogu uočiti tri značajne oblasti trimetilsilil-oksimskih derivata ugljenih hidrata. Kao što

je već rečeno, prvu oblast čine trimetililil-oksimi pentoza i alkohola pentitola (arabinoza i ksilitol), drugu trimetilsilil-oksimi heksoza i heksitola (glukoza, glucitol i manitol), a treću oblast nekoliko neredukujućih i redukujućih disaharida (saharoza, turanoza i melibioza) i gvajakol- β -glukozid.

Površine ugljenohidratnih komponenata su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Korišćen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Raup-Crick*, jer se primenom datih parametara na analizirane uzorke dobija najviša i maksimalna vrednost kofenetičkog koeficijenta korelacije (1,0).

Dobijeni dendrogram korelacije trimetilsilil-oksima šećernih komponenata prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna tri genotipa ovsa, prikazan je na slici 11.



Slika 11. Dendrogram korelacije šećernih komponenata prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 3 genotipa ovsa

Sa dobijenog dendrograma se može uočiti da minimalni stepen sličnosti hidrosolubilnih profila analiziranih uzoraka ovsa ima umerenu vrednost ($y \geq 0,50$), što pokazuje da se uzorak brašna genotipa ozimog ovsa – O2, razlikuje prema sastavu rastvorljivih ugljenih hidrata nižih molekulskih masa. Uzorci brašna genotipova jarog – O1, i golozrnog ovsa – O3, u ovom smislu pokazuju mnogo veći stepen sličnosti ($y \geq 0,93$). Uopšteno se može reći da je stepen sličnosti $y \sim 0,50$ hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna sva tri analizirana genotipa ovsa umeren i ima značajno nižu vrednost u odnosu na stepen sličnosti dobijen korelacijom masnih kiselina liposolubilnih ekstrakata ovih uzoraka.

IV-A-2.4. Homogenost hibridnih sorti kukuruza

Analizirani su masno-kiselinski profili liposolubilnih ekstrakata i ugljenohidratni profili hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna, dobijenih od različitih grupa domaćih hibrida kukuruza: NS 5, NS 7, NS 9, NS 10, NS 11, NS 12, NS 13, NS 14, NS 17, NS 20, NS 21, NS 22, NS 23, NS 24, NS 26, NS 27, NS 28. Poređenjem liposolubilnih i hidrosolubilnih profila, ispitan je stepen sličnosti između analiziranih uzoraka.

IV-A-2.4.1. Homogenost liposolubilnih profila brašna kukuruza

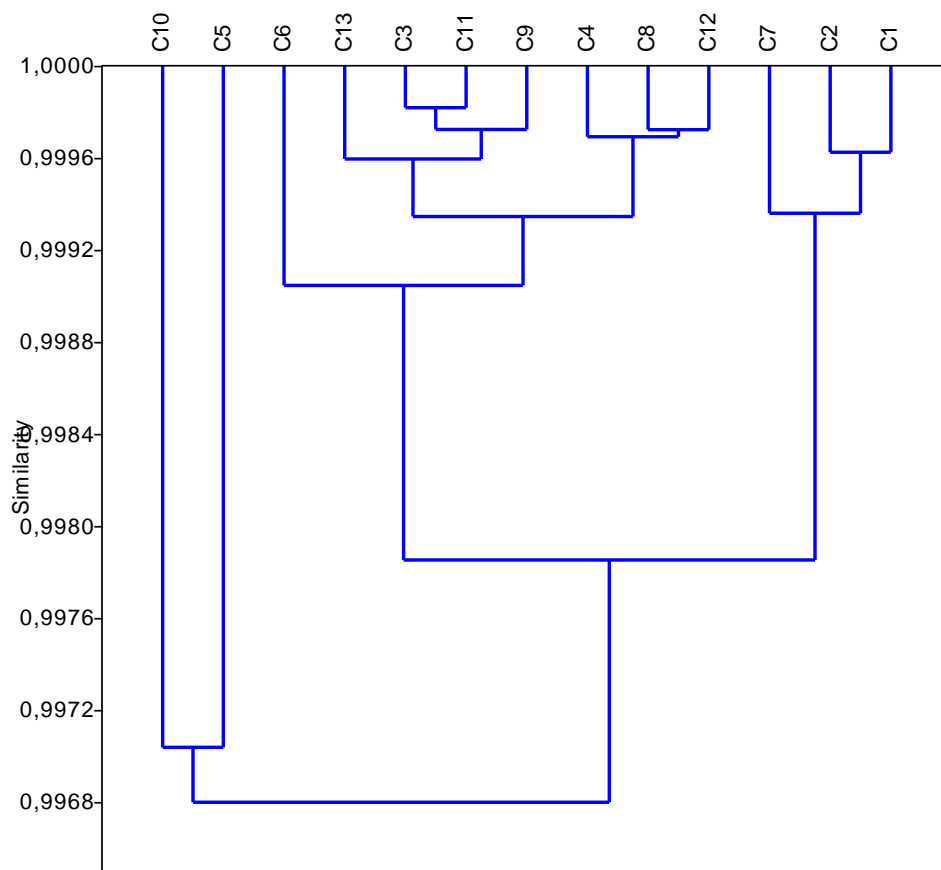
U cilju ispitivanja stepena sličnosti liposolubilnih profila korelacijom pikova eluirajućih lipidnih komponenata, analizirani su uzorci brašna sledećih hibrida kukuruza: NS 5 (C1), NS 7 (C2), NS 9 (C3), NS 10 (C4), NS 11 (C5), NS 12 (C6), NS 13 (C7), NS 14 (C8), NS 17 (C9), NS 20 (C10), NS 21 (C11), NS 22 (C12), NS 23 (C13) (Ačanski et al., 2014b; Ačanski et al., 2015c; Pastor et al., 2015c; Pastor et al., 2015d).

Slika XI u Prilogu 2, strana ix, prikazuje preklapljene hromatograme ukupne jonske struje lipidnih komponenata uzoraka brašna svih 13 analiziranih hibrida kukuruza.

Detektovane lipidne komponente prikazane su u tabeli 7, na strani 65. Posmatranjem hromatograma sa slike XI, i u ovom slučaju hromatogrami se vizuelno mogu podeliti na tri dela. Prvom delu hromatograma pripadaju metil-estri minornih masnih kiselina sa manje od 16 ugljenikovih atoma u molekulu (poput dodekanske, tetradekanske, pentadekanske itd.). Drugi deo obuhvata metil-estre najzastupljenijih masnih kiselina sa 16 do 18 ugljenikovih atoma u molekulu, a to su 9-heksadecenska (palmitoleinska), heksadecanska (palmitinska), 9,12-oktadekadienska (linolna), 9-oktadecenska (oleinska) i oktadecanska (stearinska) kiselina. Treći deo hromatograma obuhvata metil-estre zasićenih i nezasićenih masnih kiselina sa više od 18 ugljenikovih atoma u molekulu (eikozanska, tetrakozanska, heksakozanska). Od neosapunjivih materija kod nekih hibrida detektovani su kampesterol, stigmasterol i skvalen.

Površine svih detektovanih pikova su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Korišćen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Correlation*.

Dobijeni dendrogram korelacije površina svih komponenata, prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 13 hibrida kukuruza, prikazan je na slici 12.



Slika 12. Dendrogram korelacije komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 13 hibrida kukuruza

Uzorci brašna pojedinih hibrida kukuruza formiraju različite grupacije prema sličnosti liposolubilnih komponenata. Međutim, može se reći da je najniža vrednost stepena sličnosti između analiziranih uzoraka veoma visoka i iznosi $y \sim 0,9968$.

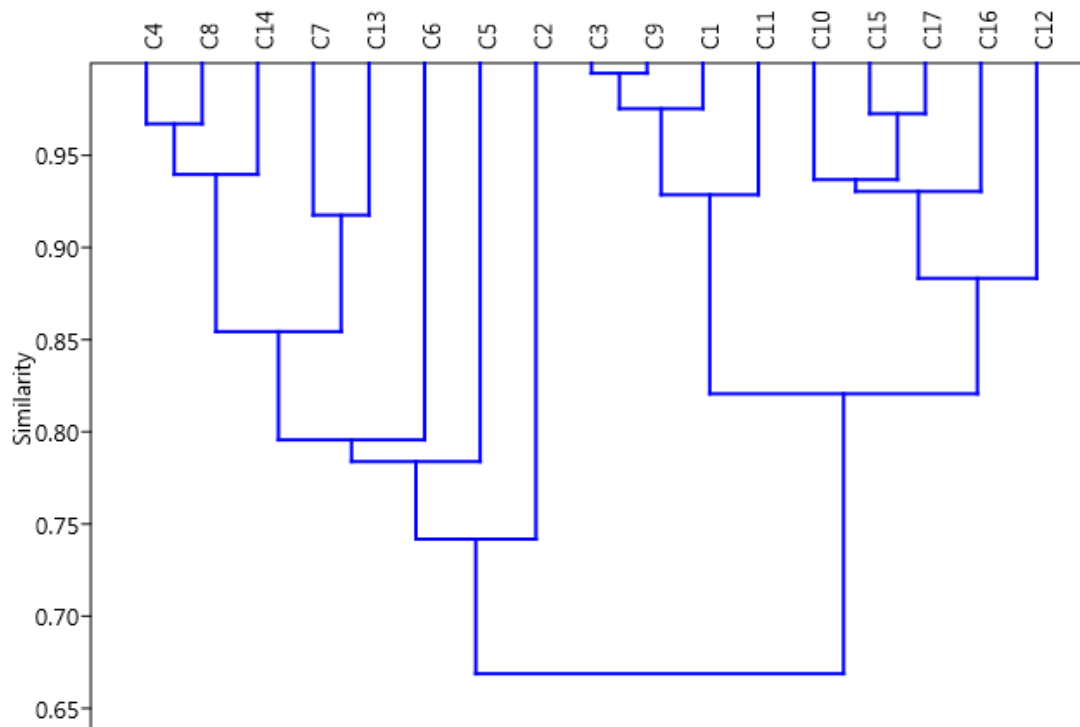
IV-A-2.4.2. Homogenost hidrosolubilnih profila brašna kukuruza

U cilju ispitivanja stepena sličnosti hidrosolubilnih profila korelacijom pikova eluirajućih ugljenohidratnih komponenata na TIC hromatogramima, analizirani su uzorci brašna 17 hibrida kukuruza: NS 5 (C1), NS 7 (C2), NS 9 (C3), NS 10 (C4), NS 11 (C5), NS 12 (C6), NS 13 (C7), NS 14 (C8), NS 17 (C9), NS 20 (C10), NS 21 (C11), NS 22 (C12), NS 23 (C13), NS 24 (C14), NS 26 (C15), NS 27 (C16), NS 28 (C17) (Pastor et al., 2015e).

Slika XII u Prilogu 2, strana ix, prikazuje preklapljene hromatograme ukupne jonske struje (TIC), dobijene analizom hidrosolubilnih ekstrakata 17 uzoraka hibrida kukuruza.

U tabeli 8, na strani 69, prikazane su sve ugljenohidratne komponente detektovane u hidrosolubilnim ekstraktima brašna 17 uzoraka hibrida kukuruza. Detektovane komponente su trimetilsilil-oksimi šećera nižih molekulskih masa – monosaharida i disaharida, kao i pojedinih šećernih alkohola. Kao i u prethodnim slučajevima, na hromatogramima se mogu uočiti tri dela trimetilsilil-oksimskih derivata ugljenih hidrata. Prvi deo hromatograma čine trimetilili-oksimi pentoza i alkohola pentitola (arabinoza, arabinitol i ksilitol), kao i eritritol. Drugi deo hromatograma sačinjavaju trimetilsilil-oksimi heksoza i heksitola (glukoza, manoza i manitol). Treći deo hromatograma čini redukujući disaharid (saharoza).

Na slici 13 prikazan je dendrogram analiziranih uzoraka kukuruza, dobijen multivarijantnom analizom numeričkih vrednosti površina svih detektovanih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata. Pri izvođenju hijerarhijske klaster analize primenjen je *Paired Group* algoritam i *Rho* indeks sličnosti. Korišćenjem ovakvih parametara dobijeni kofenetički koeficijent korelacije iznosi 0,71, a minimum sličnosti između ispitivanih uzorka brašna 17 hibrida kukurza očitao se na y-osi iznosi $y > 0,65$. Uopšteno se može reći da stepen sličnosti hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna kukuruza ima značajno nižu vrednost u odnosu na stepen sličnosti, dobijen korelacijom komponenata liposolubilnih ekstrakata istih uzoraka.



Slika 13. Dendrogram korelacije šećernih komponenata prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 17 hibrida kukuruza

IV-A-2.1. Homogenost genotipova pšenice

Zbog veoma velike potrošnje po glavi stanovnika, pšenica i proizvodi od pšenice smatraju se vrlo bitnim izvorom liposolubilnih antioksidanasa i vitamina u svakodnevnoj ishrani čoveka. Oni uključuju karotenoide, vitamin E, alkilrezorcinole i steril-ferulate. Lipidna frakcija zrna pšenice stoga predstavlja veoma važan faktor, kako sa nutritivnog aspekta, tako i sa aspekta tehnologije pšeničnih proizvoda.

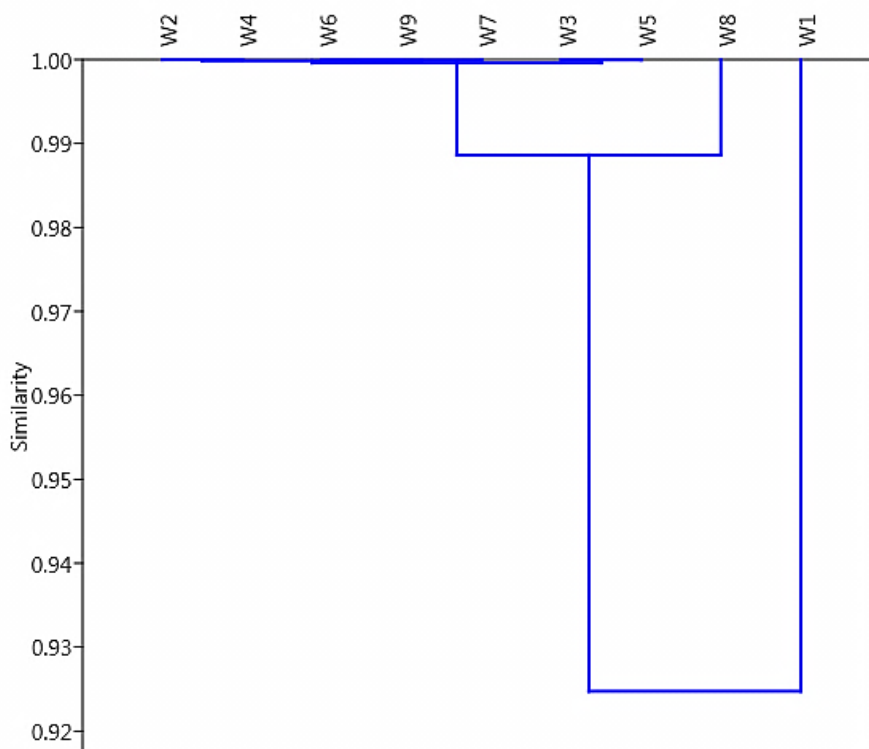
IV-A-2.1.1. Homogenost botaničke vrste i razlikovanje genotipova sa visokim i niskim sadržajem lipidne frakcije

Sa ciljem utvrđivanja stepena homogenosti genotipova pšenice, kao i mogućnosti razlikovanja genotipova sa visokim i niskim sadržajem lipidne frakcije, analizirani su liposolubilni ekstrakti uzoraka brašna proizvedeni od domaćih genotipova pšenice: ozima pšenica (Renesansa - W1, Rapsodija - W2, Evropa 90 - W3, Pesma - W4, Milijana - W5); jara pšenica (Nataša - W6, Venera - W7); i durum pšenica (Durumko - W8, NS Dur - W9) (Ačanski et al., 2017a). Eluirajuće masne kiseline detektovane u obliku odgovarajućih metil-estara, prikazane su u tabeli 7, na strani 65. Preklopljeni TIC hromatogrami liposolubilnih ekstrakata analiziranih genotipova pšenice, prikazani su na slici XIII, u Prilogu 2, strana x.

Površine detektovanih masnih kiselina su integrisane, a potom su njihove numeričke vrednosti podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi. Pri tome se dobijaju dendrogrami korelacije lipidnih profila, prikazani na slikama 14 i 15. Na x-osi prikazana je mera distance između analiziranih objekata – genotipova pšenice, a koeficijent korelacije prikazan na y-osi prikazuje njihovu sličnost.

Korišćenjem *Paired Group* algoritma, slika 14, i indeksa sličnosti *Correlation*, dobija se veoma visoka vrednost kofenetičkog koeficijenta korelacije (0,9963). Očitavanjem vrednosti sa y-ose, može se uočiti velika sličnost između uzoraka brašna analiziranih genotipova pšenice ($y > 0,92$). Jedino značajno odstupanje sa aspekta liposolubilnog sastava uočeno je kod genotipa ozime pšenice Renesansa (W1), koja se izdvaja od ostalih analiziranih uzoraka. Svi preostali analizirani uzorci pokazuju stepen sličnosti od čak $y \sim 0,99$.

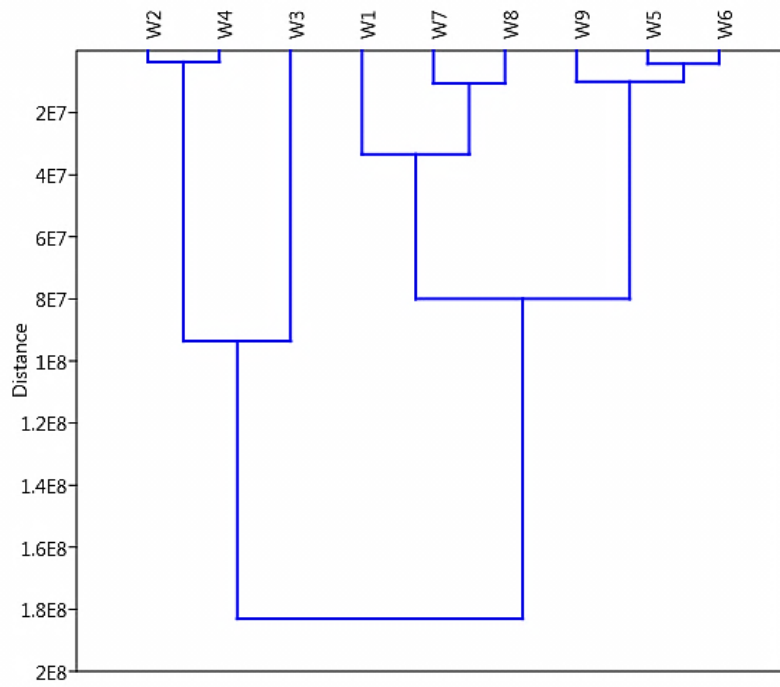
Korišćenjem algoritma *Ward's method*, slika 15, uzorci brašna genotipova pšenice sa visokim sadržajem lipidne frakcije (W2, W3, W4) grupisani su sa leve strane dendrograma, dok su uzorci sa niskim sadržajem lipidne frakcije (W1, W5, W6, W7, W8, W9) grupisani desno.



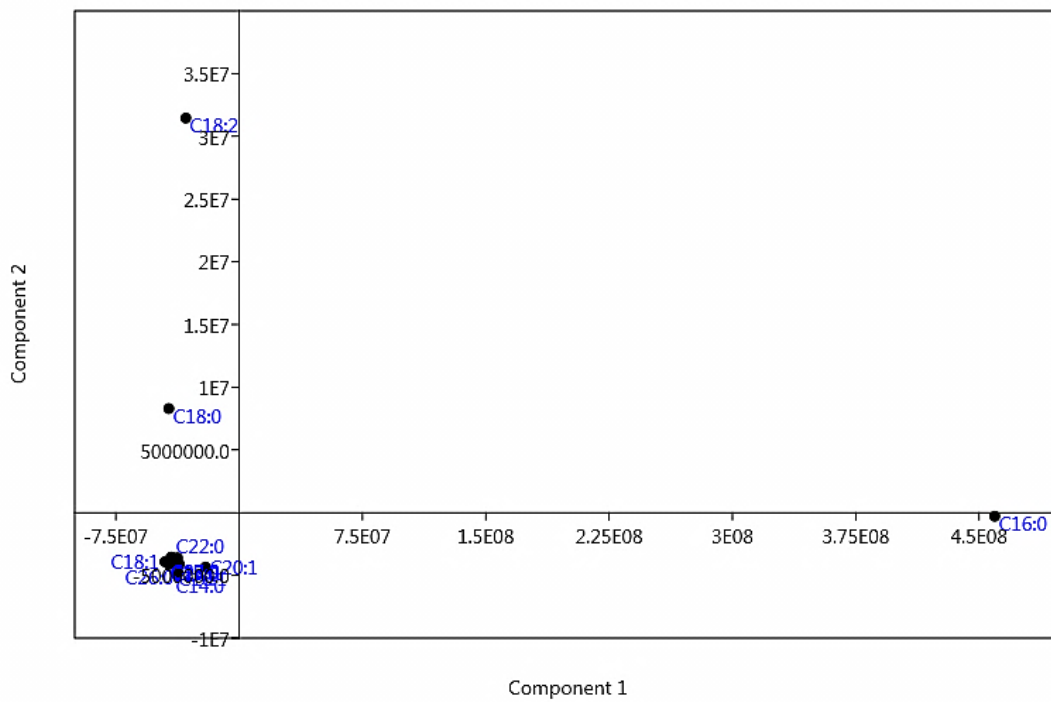
Slika 14. Dendrogram korelacije masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 9 genotipova pšenice

Primenom druge tehnike multivarijantne statističke analize – analize osnovnih komponentata (PCA), na detektovane masne kiseline kao varijable, dobija se PCA dijagram, prikazan na slici 16. Grupisanje varijabli na PCA dijagramu ukazuje da su samo tri detektovane masne kiseline faktori od značaja u razlikovanju analiziranih genotipova pšenice sa visokim i pšenice sa niskim sadržajem lipidne frakcije u znu. Odlučujući faktori su površine palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0) i linolne (C18:2) kiseline. Može se, dakle, reći da se detekcijom i integracijom površina tri masne kiseline, kao faktora od značaja, mogu razlikovati genotipovi pšenice prema sadržaju lipidne frakcije.

Ovi rezultati ispitivanja homogenosti uzoraka brašna različitih botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija (heljda, ječam, ovas, kukuruz i pšenica) su u saglasnosti sa referencama Vujić et al. (2013) i Psodorov et al. (2015b), koji potvrđuju visoki stepen homogenosti uzoraka brašna spelte i amarantusa.



Slika 15. Ward's method dendrogram masnih kiselina prisutnih u liposolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna 9 genotipova pšenice



Slika 16. PCA dijagram masnih kiselina kao faktora diskriminacije

IV-A-3.
Diferencijacija
uzoraka brašna

IV-A-3.1. Diferencijacija genotipova brašna cerealija i pseudocerealija

IV-A-3.1.1. Metode binarnih sistema

IV-A-3.1.1.1. Korelacije liposolubilnih profila brašna cerealija i pseudocerealija

U tekstu koji sledi biće predstavljen tzv. *binarni pristup* razlikovanja uzoraka brašna, dobijenih od genotipova različitih botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija (Ačanski et al., 2015d; Ačanski et al., 2016b; Ačanski i Pastor, 2017b; Pastor et al., 2017a). Binarnim pristupom ispitani su svi uzorci iz tabele 4, na strani 47, na sledeći način: oznakom „1“ naznačeno je prisustvo određene lipidne komponente, a njeno odsustvo oznakom „0“. Oznaka „1/0“ prikazuje lipidnu komponentu prisutnu u više od 50% ispitivanih genotipova iste biljne vrste, dok oznaka „0/1“ prikazuje lipidnu komponentu prisutnu u manje od 50% ispitivanih genotipova iste biljne vrste.

Preklopljeni hromatogrami ukupne jonske struje (TIC) derivatizovanih liposolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna cerealija i pseudocerealija svih ispitivanih botaničkih vrsta iz tabele 4, koji su analizirani primenom binarnog pristupa, prikazani su na slikama XIII – XXI, u Prilogu 2, strane x - xiv. To, ustvari, znači da se tabela 7 sa strane 65 transformiše u tabelu 10.

Kao što se vidi iz tabele 10, lipidne frakcije analiziranih uzoraka sastoje se od zasićenih i nezasićenih masnih kiselina sa 12-26 ugljenikovih atoma u molekulu i neosapunjivih materija. Neosapunjive materije obuhvataju fitosterole (kampesterol, stigmasterol, γ -sitosterol, etil-holestanol), α -tokoferol i skvalen**.

** Dobijeni TIC hromatogrami sadrže i pikove drugih liposolubilnih jedinjenja, poput ugljovodonika (n-alkana, n-alkena i aromatičnih jedinjenja), ali oni nisu uzimani u obzir prilikom dalje obrade podataka.

Tabela 10. Retenciona vremena (R_t), nazivi i skraćenice detektovanih komponenata, kao i prisustvo/odsustvo jedinjenja u saglasnosti sa binarnim pristupom u liposolubilnim ekstraktima brašna, ispitivanih botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija iz tabele 4

R_t	Jedinjenje	Skraćenice	C	W	R	T	O	B	S	A	H
8.34	Dodekanska (laurinska) kiselina, metil-estar	C12:0	1 ^a	1	1	1	1	1	0 ^b	0	0
10.19	Tetradekanska (miristinska) kiselina, metil-estar	C14:0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
11.23	Pentadekanska (pentadecilinska) kiselina, metil-estar	C15:0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
12.04	9-Heksadecenska (palmitoleinska) kiselina, metil-estar	C16:1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
12.25	Heksadekanska (palmitinska) kiselina, metil-estar	C16:0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13.19	Heptadekanska (margarinska) kiselina, metil-estar	C17:0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
13.92	9,12-Oktadekadienska (linolna) kiselina, metil-estar	C18:2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13.96	9-Oktadecenska (oleinska) kiselina, metil-estar	C18:1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14.12	Oktadekanska (stearinska) kiselina, metil-estar	C18:0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14.86	10-Nonadecenska kiselina, metil-estar	C19:1	0/1 ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
15.04	Nonadekanska (nonadecilinska) kiselina, metil-estar	C19:0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
15.67	11-Eikozenoinska (gondoinska) kiselina, metil-estar	C20:1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
15.87	Eikozanska (arahidinska) kiselina, metil-estar	C20:0	1	0/1	0	0	0	0	0	1	1
16.69	Heneikozanska (heneikozilinska) kiselina, metil-estar	C21:0	1/0 ^d	0	0	0	0	0/1	1	0	0
16.90	12-Hidroksi-9-oktadecenska (ricinoleinska) kiselina, metil-estar	RA	0	1/0	1	1	1	1/0	0	0	0
17.23	9,10-Dihidroksistearinska ili 13-Dokozenka (eruka, erukinska) kiselina, metil-estar	DHSA	0	0	0	0	1	1/0	0	0	0

Tabela 10. Nastavak

R_t	Jedinjenje	Skraćenice	C	W	R	T	O	B	S	A	H
17.48	Dokozanska (behenska) kiselina, metil-estar	C22:0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18.28	Trikozanska (trikozilna) kiselina, metil-estar	C23:0	0	0/1	0	0	0	0	0	1	0
19.17	Tetrakozanska (lignocerinska) kiselina, metil-estar	C24:0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20.01	Kampesterol	CA	1/0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.21	Pentakozanska (pentakozilinska) kiselina, metil-estar	C25:0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
20.27	Skvalen	SQ	1/0	0	0	0	0	0	0/1	1	0
20.88	Stigmasterol	ST	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0
21.14	γ -Sitosterol	γ SI	0	0	0	0	0	0	0	1	0
21.22	α -Tocopherol	α T	0	1	0	0	0	0	0	0	0
21.32	Etil-holestanol	ECH	0	0	0	0	0	0	0	1	0
21.45	Heksakozanska (ceratinska) kiselina, metil-estar	C26:0	1	1	1	1/0	1	1/0	1/0	1	0

^a „1“ lipidna komponenta detektovana u svakom analiziranom genotipu određene biljne vrste.

^b „0“ lipidna komponenta koja nije detektovana ni u jednom analiziranom genotipu određene biljne vrste.

^c „0/1“ lipidna komponenta detektovana u manje od polovine analiziranih genotipova određene biljne vrste.

^d „1/0“ lipidna komponenta detektovana u više od polovine analiziranih genotipova određene biljne vrste.

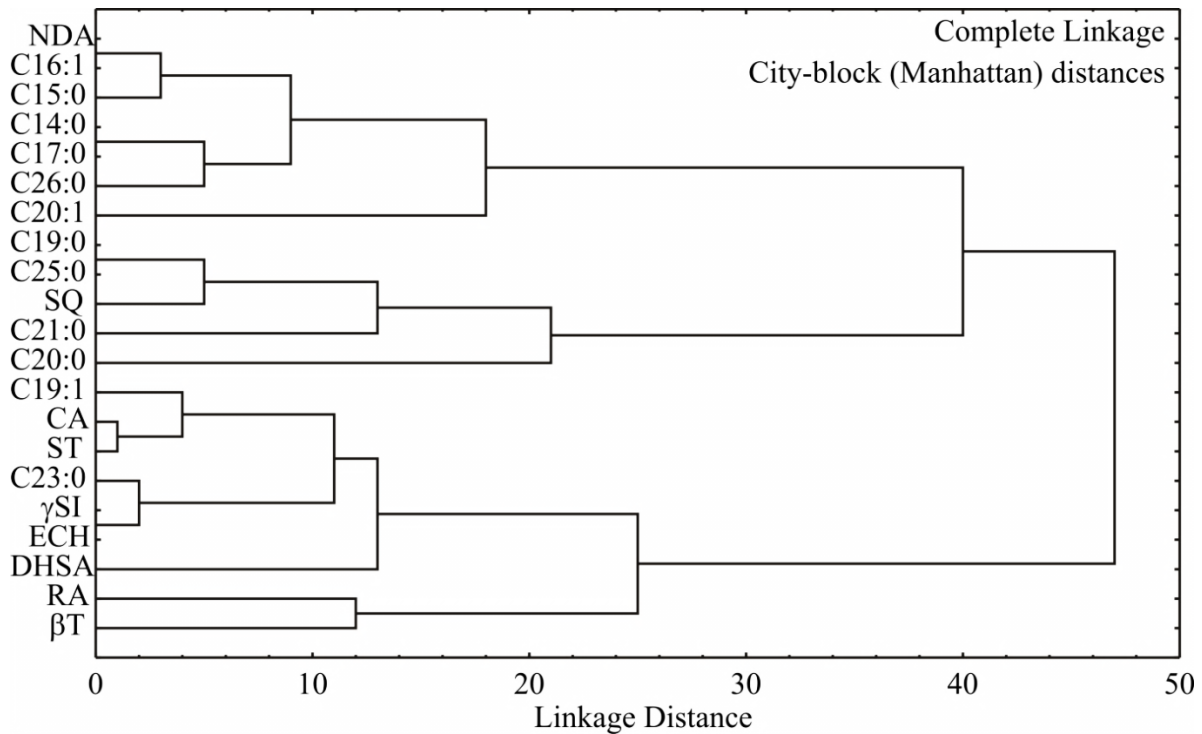
^e lipidne komponente koje nisu korišćene u multivarijantnoj obradi podataka napisane su sa podebljanjem (**bold**).

Najzastupljenije lipidne komponente identifikovane u brašnu svakog analiziranog genotipa, svake botaničke vrste cerealije i pseudocerealije su metil-estri masnih kiselina: palmitinske (C16:0), linolne (C18:2), oleinske (C18:1), stearinske (C18:0), dokozanske (C22:0) i tetrakozanske (C24:0). One su u tabeli 10 napisane sa podebljanjem (**bold**). Navedene komponente su isključene iz dalje obrade podataka, jer nemaju nikakav uticaj na razlikovanje analiziranih uzoraka. Dakle, u obzir su uzete samo lipidne komponente koje su u nekim analiziranim uzorcima prisutne, a u drugim odsutne. Prisustvo pojedinih lipidnih komponenata karakteristično je samo za određenu grupu uzoraka, ili čak određeni genotip. Na primer, 10-nonadecenska kiselina (C19:1) je detektovana samo u manje od 50% uzoraka ispitivanih genotipova kukuruza; nonadekanska kiselina (C19:0) detektovana je u svim uzorcima brašna kukuruza i amarantusa; 9,10-dihidroksi-oktadekanska kiselina (DHSA) u svim genotipovima ovsu i u više od 50% ispitivanih genotipova ječma; trikozanska kiselina (C23:0) u svakom genotipu amarantusa i manje od 50% genotipova pšenice; kampesterol (CA) samo u više od 50% genotipova kukuruza; pentakozanska kiselina (C25:0) u svim uzorcima kukuruza i amarantusa; stigmasterol (ST) je detektovan samo u manje od 50% ispitivanih genotipova kukuruza; γ -sitosterol (γ ST) samo u svim uzorcima brašna amarantusa; α -tokoferol (α T) samo u svim uzorcima pšenice; etil-holestanol (ECH) detektovan je samo u svim analiziranim uzorcima brašna amarantusa (Ačanski et al., 2015d; Ačanski et al., 2016b; Ačanski i Pastor, 2017b; Pastor et al., 2017a).

Ulja i masti najčešće se analiziraju gasnom hromatografijom uz primenu plameno-jonizacionog detektora (GC-FID) ili masenog spektrometra (GC-MS), nakon odgovarajuće ekstrakcije i derivatizacije. Međutim, GC-FID tehnika je često nedovoljno selektivna, te problem predstavljaju koeluirajuće komponente, prirodno prisutne u kompleksnim matriksima. S druge strane, GC-MS ima mogućnost detekcije koeluirajućih komponenata (Xu et al., 2015). Primenom predloženog binarnog sistema u multivarijantnoj analizi izbegava se potreba za tačnom kvantifikacijom identifikovanih lipidnih komponenata, primenom analitičkih standarda. Korišćenje veoma sofisticiranih, ali skupih tehnika, poput GC-MS/MS ili LC-MS/MS može se oceniti kao suvišno i nepotrebno, ukoliko se primenjuje predloženi binarni pristup. Pošto bi za uspešnu primenu ovog pristupa bilo dovoljno utvrditi samo da li je određena lipidna komponenta prisutna (primenom oznake „1“) ili odsutna (primenom oznake „0“) u analiziranom uzorku brašna, bilo bi sasvim dovoljno koristiti manje sofisticirani, jeftiniji i mnogo rasprostranjeniji GC-MS sistem. Analitička procedura se na ovaj način značajno pojednostavljuje i skraćuje. Izbegava se i potreba za primenom klasične statistike u obradi dobijenih podataka, poput izračunavanja srednje vrednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije.

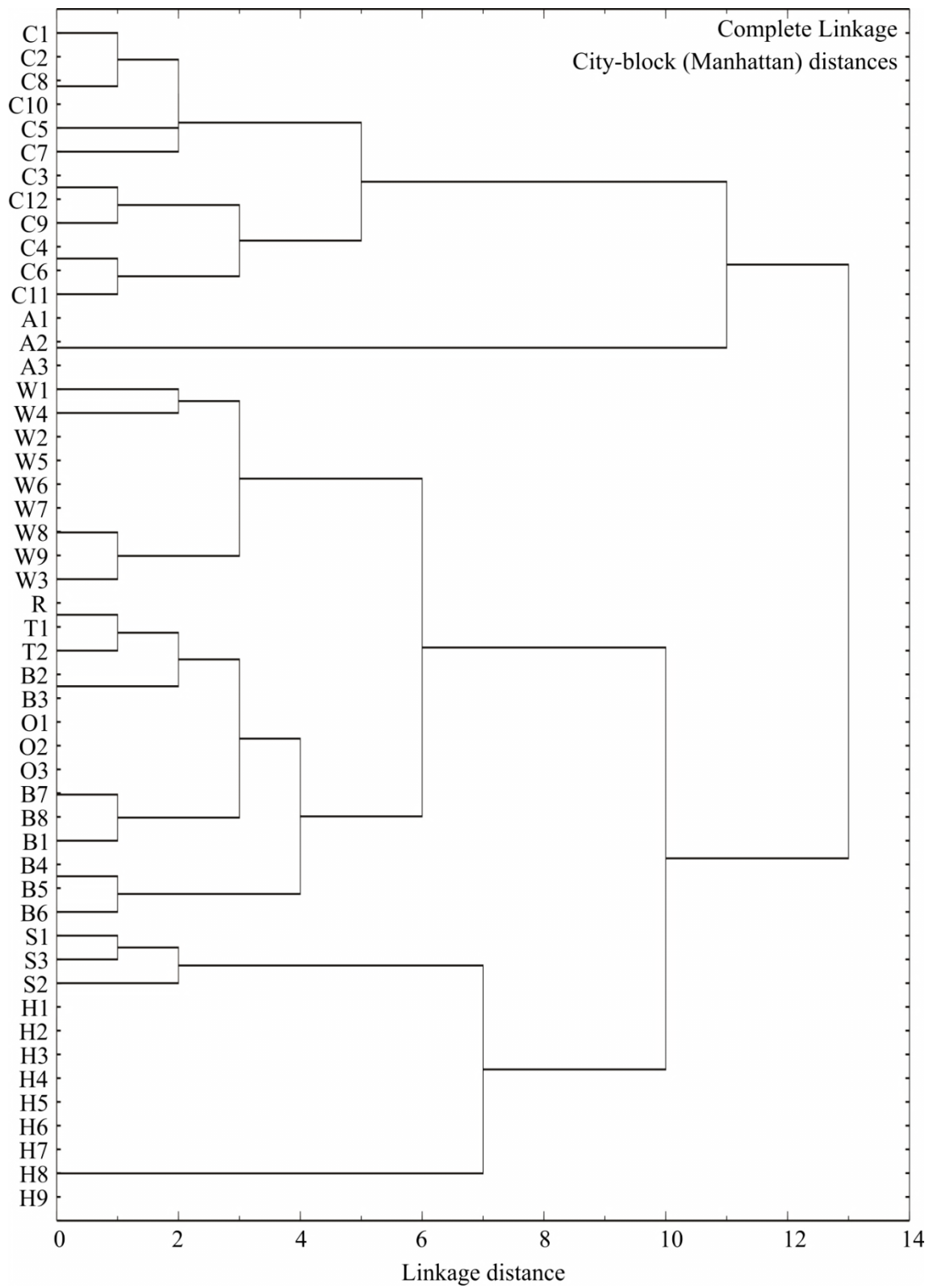
Dendrogram korelacija selektovanih masnih kiselina (masne kiseline napisane sa podebljanjem su isključene iz analize) i neosapunjivih materija iz tabele 10, kao faktora razlikovanja, prisutnih u heksanskim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna različitih genotipova cerealija i pseudocerealija prikazan je na slici 17. Primenjen je *Complete*

Linkage kao pravilo amalgamacije i *City-block (Manhattan) distance*, kao indeks sličnosti između analiziranih uzoraka.



Slika 17. Dendrogram korelacije selektovanih komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima iz tabele 10, analiziranih uzoraka brašna iz tabele 4

Slika 18 prikazuje dendrogram korelacije lipidnih komponenata ispitivanih liposolubilnih ekstrakata uzoraka brašna različitih botaničkih vrsta cerealijskih i pseudocerealijskih, iz tabele 4, na strani 47. Dobijeni dendrogram binarnih GC-MS matrica prikazuje jasna razdvajanja biljnih vrsta analiziranih uzoraka hlebne pšenice, spelte, raži, tritikalea, ovsa, ječma, kukuruza, amarantusa i heljde. Razlike među ispitivanim uzorcima botaničkih vrsta cerealijskih i pseudocerealijskih su dodatno uvećane, upravo uklanjanjem lipidnih komponenata prisutnih u svim uzorcima brašna (masne kiseline napisane sa podebljanjem). U pojedinim slučajevima, određeni genotipovi strnih žita na prikazanom dendrogramu ne pokazuju potpuno međusobno razdvajanje prema odgovarajućem botaničkom poreklu. Na primer, uzorci brašna genotipova ječma B2 i B3 pokazuju velike sličnosti sa uzorcima brašna genotipova tritikalea T1 i T2; uzorci brašna genotipova ovsa O1, O2 i O3 pokazuju veliku sličnost liposolubilnog sastava sa uzorcima brašna genotipova ječma B1, B7 i B8 (Ačanski et al., 2015d; Ačanski et al., 2016b; Ačanski i Pastor, 2017b; Pastor et al., 2017a).

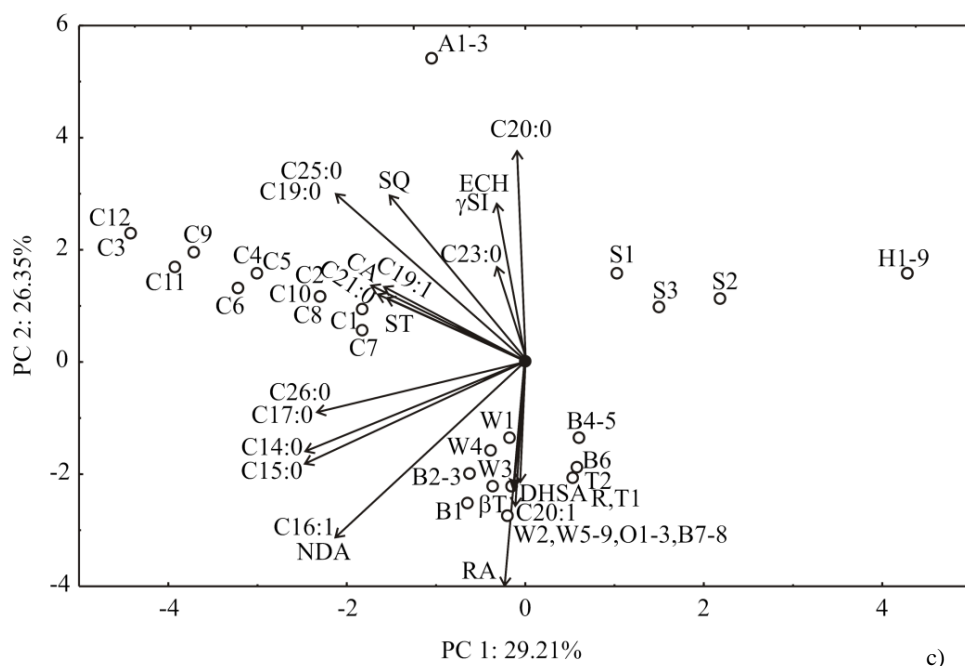


Slika 18. Dendrogram korelacije analiziranih uzoraka brašna različitih genotipova cerealijskih i pseudocerealijskih iz tabele 4, na osnovu selektovanih liposolubilnih komponentata

Sa druge strane, analizirani uzorci tri genotipa spelte koja, iako botanički pripada rodu *Triticum* i smatra se podvrstom hlebne pšenice (Escarnot et al., 2012), primenom ove metode se potpuno razlikuju od uzoraka brašna genotipova hlebne pšenice, kao i svih ostalih strnih žita. Primenom ove GC-MS metode i hijerarhijskom klaster analizom dobijenih podataka jasno se oučavaju razlike između uzoraka brašna heljde, amarantusa, spelte, kukuruza i strnih žita (hlebne pšenice, raži, tritikalea, ovsa i ječma), a dati uzorci se klasifikuju prema odgovarajućem botaničkom poreklu (Ačanski et al., 2015d; Ačanski et al., 2016b; Pastor et al., 2017a). Važno je napomenuti da se na ovaj način, uzorci bezglutenskog kukuruza i bezglutenskih pseudocerealija (heljde i amarantusa) jasno razdvajaju od svih uzoraka brašna analiziranih strnih žita (hlebne pšenice, raži, tritikalea, ječma, ovsa i spelte), koja sadrže gluten (Codex Alimentarius Commission, 1997; Codex Alimentarius Commission, 2000; Gallagher et al., 2004).

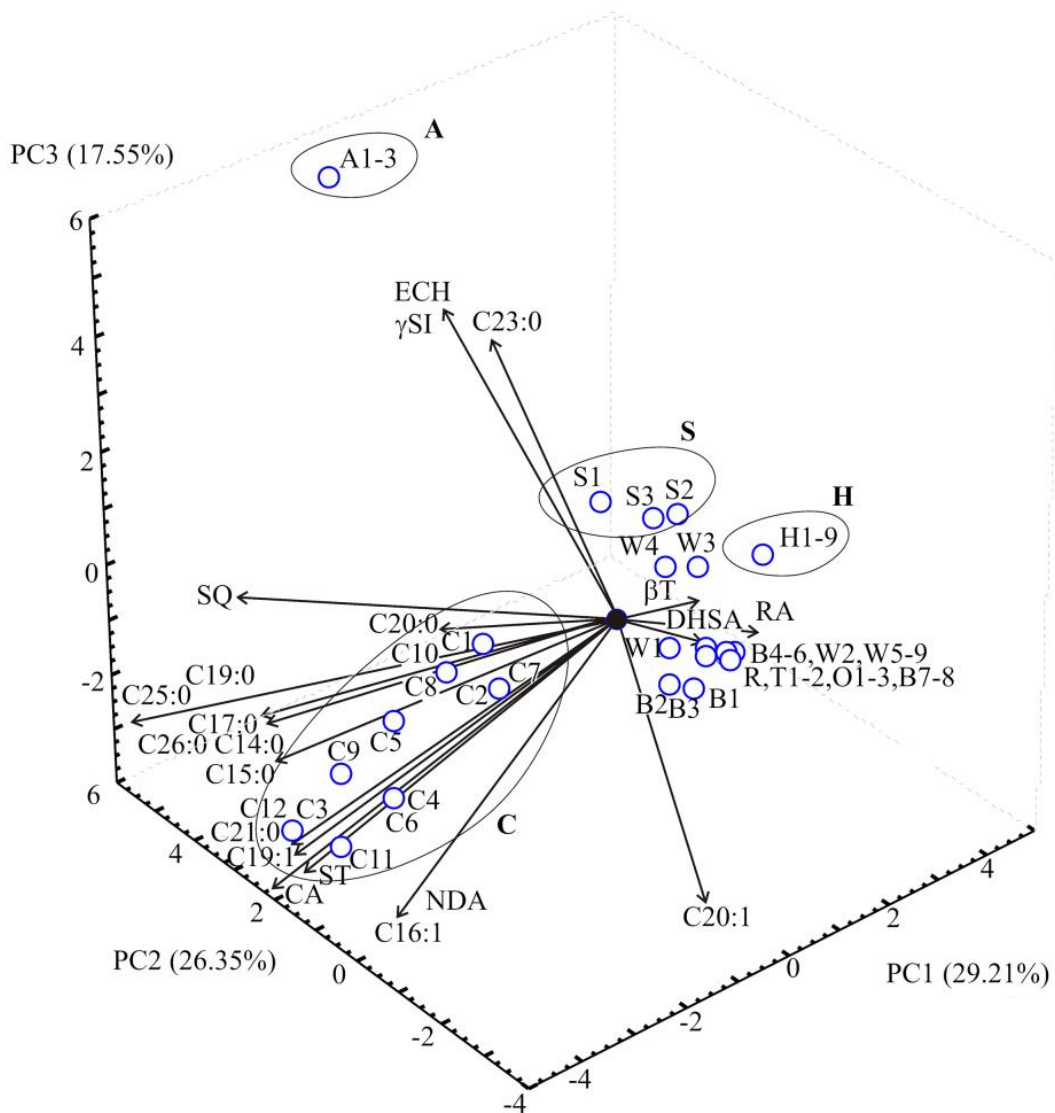
Međutim, iako spelta taksonomski pripada rodu *Triticum*, i botanički je stoga vrlo slična hlebnoj pšenici, razlikovanje uzoraka brašna spelte od brašna hlebne pšenice veoma je važno, zbog izražene razlike u ceni ova dva proizvoda. Spelta se često uzgaja organski, te se od nje proizvodi visokokvalitetno brašno visoke cene na tržištu (Escarnot et al., 2012).

Analizom osnovnih komponenata dobija se PCA dijagram prikazan na slici 19. Prve tri komponente objašnjavaju 73,11% ukupne varijanse (29,21%, 26,35% i 17,55%, respektivno) u 15 analiziranih varijabli. Posmatrajući dobijeni PCA dijagram, uočava se da jedinjenja NDA, C14:0, C15:0, C16:1, C17:0, C19:0, C25:0 and C26:0 (koja na osnovu korelacija doprinose sa 8,2%, 10,9%, 11,1%, 8,2%, 10,9%, 8,2%, 8,2% i 9,9% ukupnoj varijansi) imaju negativne vrednosti na prvoj osnovnoj komponenti. Pozitivne vrednosti na drugoj osnovnoj komponenti uočene su za C19:0 (koja doprinosi sa 7,4% ukupnoj varijansi), C20:0 (11,1%), C25:0 (7,4%), SQ (6,9%), a negativne vrednosti na drugoj osnovnoj komponenti za RA (12,2%), NDA (7,6%), C16:1 (7,6%). Pozitivne vrednosti na trećoj osnovnoj komponenti uočene su za C23:0 (14,3%), ST (7,0%), γ SI (14,9%) i ECH (14,9%), a negativne vrednosti na trećoj osnovnoj komponenti za C20:1 (9,9%) i CA (7,9%).



Slika 19. PCA dijagram analiziranih uzoraka brašna cerealija i pseudocerealija iz tebele 4, kao i komponenta njihovih liposolubilnih ekstrakata: a) projekcija u PC2-PC3 ravni, b) projekcija u PC1-PC3 ravni, c) projekcija u PC1-PC2 ravni

Polja na PCA dijagramu koja obuhvataju uzorke genotipova amarantusa (A regija), heljde (H regija) i hibride kukuruza (C regija), jasno su odvojena od uzoraka brašna ostalih biljnih vrsta, slika 20. Amarantus, heljda i kukuruz su ujedno i tri biljne vrste koje ne sadrže gluten, među uzorcima analiziranim u ovoj doktorskoj disertaciji. Njihovo jasno razdvajanje je stoga od velikog značaja. Uzorci glutenskog brašna različitih vrsta strnih žita: hlebne pšenice, ječma, ovsa, raži i tritikalea formiraju zasebnu grupu i odvajaju se od ostalih analiziranih uzoraka. Međutim, slično hijerarhijskoj klaster analizi, ni analiza osnovnih komponenta ne pokazuje mogućnost potpunog razdvajanja strnih žita prema botanički pripadajućoj biljnoj vrsti. Uzorci brašna genotipova spelte (S regija) se takođe grupišu zajedno, ali na PCA dijagramu pokazuju izvestan stepen sličnosti sa uzorcima brašna genotipova hlebne pšenice W3 i W4. To je moguće, s obzirom na činjenicu da je, od svih analiziranih biljnih vrsta, spelta (*Triticum spelta* L., ali takođe i *Triticum aestivum* subsp. *spelta* L.) najbliži botanički rođak hlebne pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Ačanski et al., 2015d; Ačanski et al., 2016b; Ačanski i Pastor, 2017b; Pastor et al., 2017a). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima u ranijim ispitivanjima (Ačanski i Vujić, 2014a; Ačanski et al., 2015b).



Slika 20. 3D-PCA dijagram analiziranih uzoraka brašna cerealija (W – pšenica, S – spelta, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz) i pseudocerealija (A – amarantus, H – heljda) i komponenta njihovih liposolubilnih ekstrakata

IV-A-3.2. Diferencijacija brašna genotipova cerealija: strnih i prosolikog žita

IV-A-3.2.1. Metode mikroskopiranja

IV-A-3.2.1.1. Primena svetlosnog mikroskopa

Čestice skroba nazivaju se granule i kod biljaka predstavljaju vid skladištenja energije uz maksimalnu uštedu prostora. Uobličen u svoje granule, skrob je u biljkama smešten u ćelije amiloplasta. U amiloplastu većine cerealija sintetiše se po jedna granula skroba, a njen oblik i veličina karakteristika su botaničkog porekla biljke (Kaluderski i Filipović, 1998; Thomas i Atwell, 1999; Shelton, 2000; McKevith, 2004; Delcour i Hoseney, 2010; Koehler i Wieser, 2013). Amiloplasti ovsu sadrže po nekoliko granula skroba (Delcour i Hoseney, 2010).

Veličina i oblik skrobnih granula različitih botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija, u skladu sa literaturnim podacima, prikazani su u tabeli 11.

Tabela 11. Veličina i oblik skrobnih granula nekih botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija

Botanička vrsta	Veličina granula (µm)	Oblik granula	Literatura
Pšenica	5-50	Elipsast Okrugao	Kaluderski i Filipović, 1998
	15-30	Sočivast	Kent i Evers, 1994
	1-10	Sferičan	
	20-35	Sočivast	Delcour i Hoseney, 2010
	2-10	Sferičan	
	25-40	Sočivast	Arendt i Zannini, 2013
	5-10	Sferičan	
	5-30	Elipsast Okrugao	Pastor, nepublikovani rezultati

Tabela 11. Nastavak

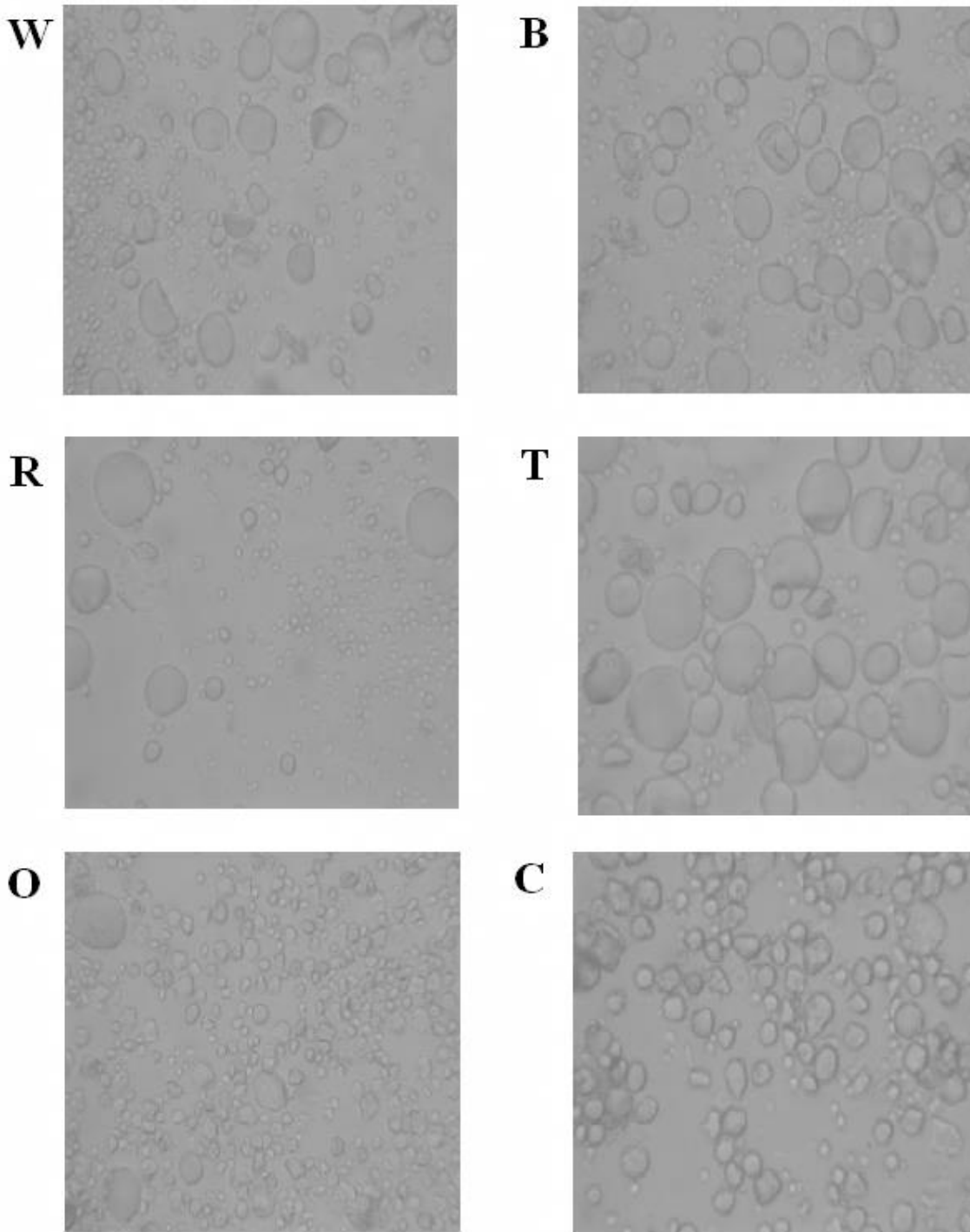
Botanička vrsta	Veličina granula (μm)	Oblik granula	Literatura
Raž	5-50	Sferičan Ovalan	Kaluđerski i Filipović, 1998
	10-40	Sočivast	Kent i Evers, 1994
	2-10	Sferičan	
	25-40	Sočivast	Delcour i Hoseneý, 2010
	5-10	Sferičan	
	15-35	Sočivast	Arendt i Zannini, 2013
	<10	Sferičan	
	5-30	Elipsast Okrugao	Pastor, nepublikovani rezultati
Ječam	5-40	Elipsast Okrugao	Kaluđerski i Filipović, 1998, Pastor, nepublikovani rezultati
	10-30	Sočivast	Kent i Evers, 1994
	1-5	Sferičan	
	25-40	Sočivast	Delcour i Hoseneý, 2010
	5-10	Sferičan	
		24-45 1,7-2,5	Sočivast Sferičan
Ovas	5-12	Poligonalan Sferičan	Kaluđerski i Filipović, 1998
	do 60	Ovalan	Kent i Evers, 1994
	2-10	Uglast	
	2-5	Poligonalan	Delcour i Hoseneý, 2010
	3-10	Poliedarski Ovalan Polukružan	Arendt i Zannini, 2013; Pastor, nepublikovani rezultati

Tabela 11. Nastavak

Kukuruz	5-30	Poligonalan Sferičan	Kaluđerski i Filipović, 1998
	2-30	Sferičan Uglast	Kent i Evers, 1994
	20	Poligonalan Sferičan	Delcour i Hoseneý, 2010
	15-25	Poligonalan Sferičan	Arendt i Zannini, 2013, Pastor, nepublikovani rezultati
Tritikale	1-30	Sočivast	Kent i Evers, 1994; Arendt i Zannini, 2013
	1-10	Sferičan	
	5-30	Elipsast Okrugao	Pastor, nepublikovani rezultati

Uzorci skroba dobijeni iz brašna strnih žita (pšenice, ječma, ovasa, raži, tritikalea), kao i kukuruza, analizirani su primenom svetlosne mikroskopije. Prema literaturnim podacima, standardna metoda za razlikovanje uzoraka brašna prema botaničkim vrstama biljaka podrazumeva mikroskopsku analizu i proučavanje strukture skrobnih granula (Kaluđerski i Filipović, 1998; Thomas i Atwell, 1999).

Na slici 21 su prikazani svetlosni mikrografi granula skroba pod uvećanjem od 400 puta, pri čemu je prikazan po jedan uzorak genotipa svake analizirane botaničke vrste cerealija: pšenica (Evropa 90 - W2), ječam (NS Mile - B9), ovas (Jadar - O2), tritikale (NS Trifun - T2), raž (NS Savo - R) i kukuruz (hibrid NS 22 - C12).



Slika 21. Svetlosni mikrofotograf granula skroba uzoraka brašna po jednog genotipa svake analizirane botaničke vrste cerealija (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz); uvećanje 400 puta

Može se reći da se primenom svetlosne mikroskopije uočavaju specifični oblici i veličine posmatranih granula skroba svake biljne vrste. Međutim, sa dobijenih mikrografa uočava se da se između uzoraka skroba genotipova strnih žita (pšenice, ječma, raži i tritikalea) ne primećuju jasne razlike u obliku, veličini i raspodeli veličina granula skroba. Naime, one pokazuju izraženu međusobnu sličnost, veću u poređenju sa onom koja se navodi u literaturi (Kalušerski i Filipović, 1998; Thomas and Atwell, 1999).

Kod analiziranih uzoraka brašna hibrida kukuruza mogu se primetiti okrugle, uglaste i poligonalne granule skroba, skoro jednakih dimenzija.

Ovas predstavlja izuzetak među analiziranim vrstama strnih žita. Oblik i veličina granula skroba analiziranih genotipova ovasa jasno se razlikuje od oblika i veličine granula skroba pšenice, ječma, raži i tritikalea.

IV-A-3.2.1.2. Primena elektronskog mikroskopa

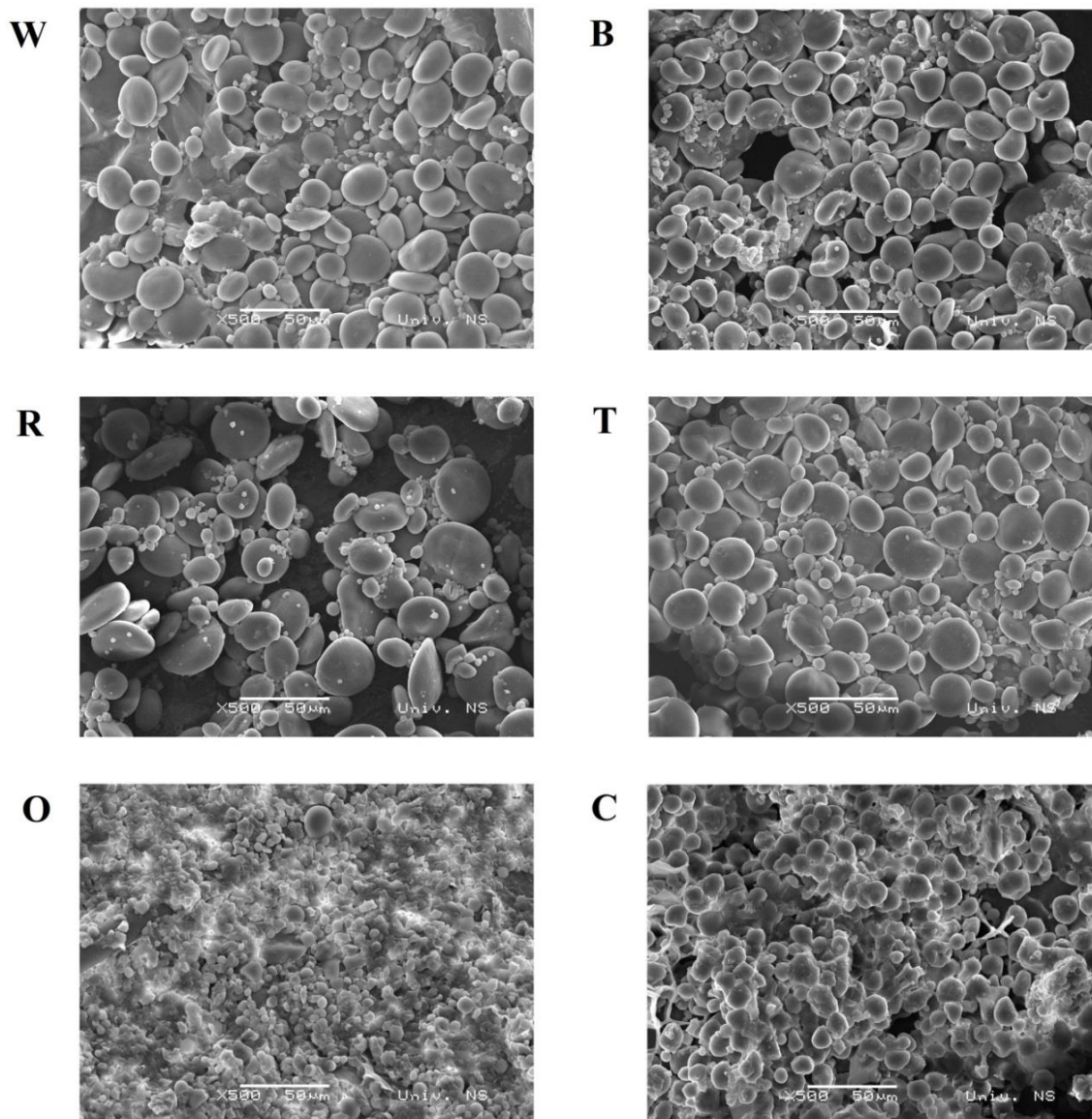
Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je odličan instrument za analizu i karakterizaciju skroba i prehrambenih proizvoda koji sadrže skrob. Prema literaturi, mikroskopska analiza granula skroba i karakterizacija njihove strukture predstavlja uobičajenu metodu za diferencijaciju različitih tipova brašna cerealija (Thomas i Atwell, 1999).

Uzorci skroba dobijeni iz brašna strnih žita (pšenice, ječma, ovasa, raži, tritikalea), kao i kukuruza, analizirani su i primenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) (Pastor et al., 2016a).

Na slikama 22 i 23 su prikazani elektronski mikrografi granula skroba pod uvećanjem od 500 (slika 22) i 1000 (slika 23) puta, pri čemu je nasumično odabran po jedan uzorak genotipa svake analizirane botaničke vrste cerealija: pšenica (Evropa 90 - W2), ječam (NS Mile - B9), ovas (Jadar - O2), tritikale (NS Trifun -T2), raž (NS Savo - R) i kukuruz (hibrid NS 22 - C12).

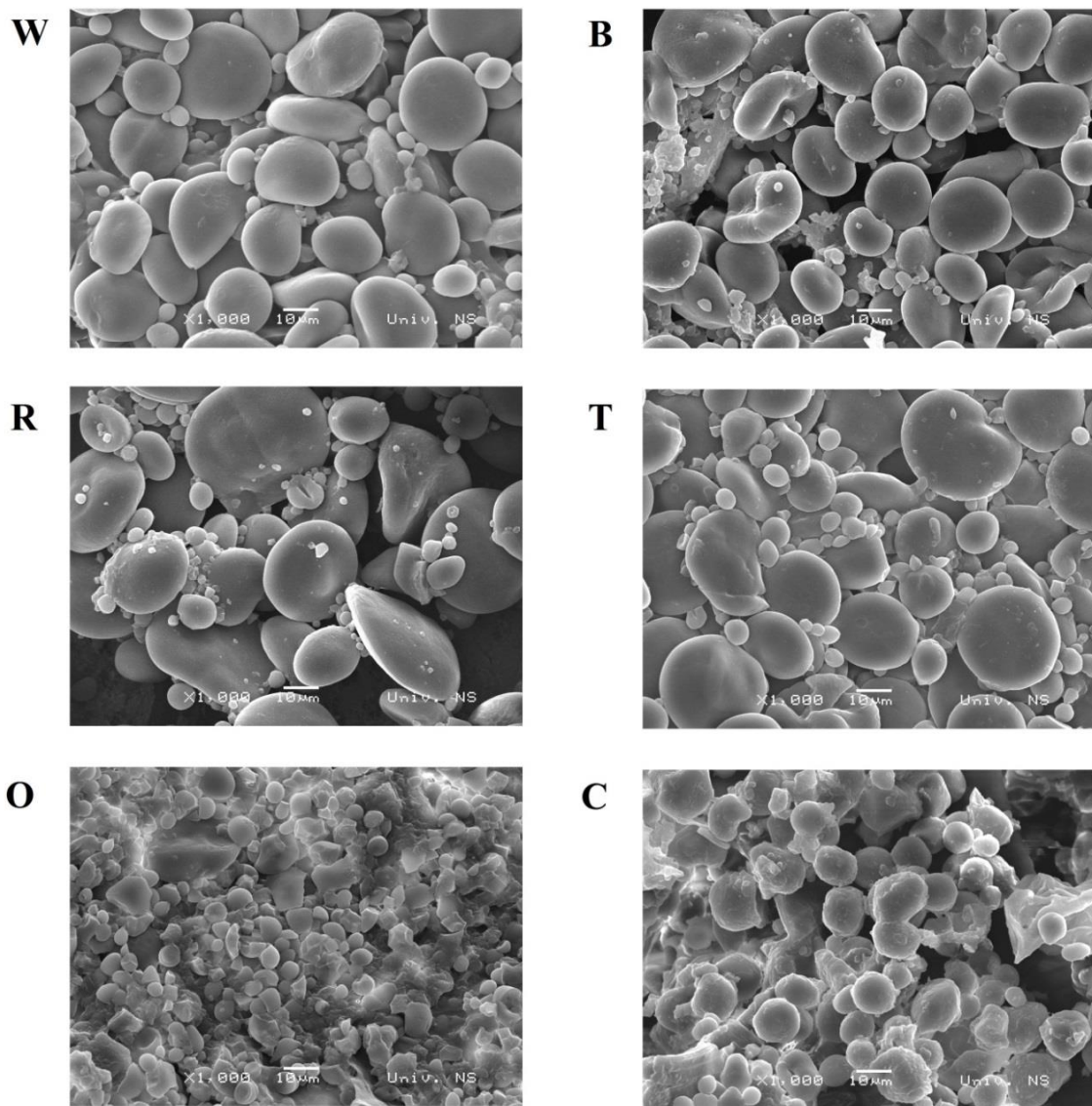
Na dobijenim SEM mikrografima uzoraka genotipova kukuruza i ovasa uočavaju se značajne razlike u obliku, veličini i raspodeli veličina skrobnih granula, u odnosu na ostale analizirane vrste cerealija: pšenicu, ječam, raž i tritikale.

Na SEM mikrografima genotipova svih analiziranih uzoraka strnih žita, sa izuzetkom ovasa, uočavaju se dva tipa skrobnih granula: velike i male, okruglog i ovalnog oblika. Skrobne granule genotipa kukuruza su uglaste i uniformnijih oblika i veličina, a granule genotipa ovasa su manjih dimenzija, poligonalnog oblika i takođe uniformnijih veličina.



Slika 22. SEM mikrografi granula skroba uzoraka brašna po jednog genotipa svake analizirane botaničke vrste cerealija (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz); uvećanje 500 puta

Isti zaključci mogu se izvesti posmatranjem SEM mikrografa pod manjim (500 puta) i većim (1000 puta) uvećanjem. Rezultati dobijeni primenom svetlosne i elektronske mikroskopije u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim instrumentalnom analizom lipidnih komponenata cerealija, primenom GC-MS sistema i multivarijantom obradom dobijenih podataka (Pastor et al., 2016a).



Slika 23. SEM mikrografi granula skroba uzoraka brašna po jednog genotipa svake analizirane botaničke vrste cerealija (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz): uvećanje 1000 puta

IV-A-3.2.2. Metode semi-kvantitativnog profilisanja

IV-A-3.2.2.1. Korelacije liposolubilnih profila brašna strnih žita i kukuruza

U tekstu koji sledi biće opisana mogućnost razlikovanja brašna genotipova strnih žita i hibrida prosolikog žita - kukuruza, primenom multivarijantne analize na profile minornih masnih kiselina. Kao potvrda sigurnog prisustva metil-estara masnih kiselina, sa hromatograma je izolovan karakteristični jon $74 m/z$, tzv. jon *McLafferty*-jevog premeštanja (Pastor et al., 2016a; Pastor et al., 2015f).

Analizirani uzorci cerealijskih obuhvataju 21 genotip strnih žita i 19 hibrida kukuruza (tabela 4, strana 47): hlebna pšenica (Rapsodija - W1, Evropa 90 - W2, Milijana - W3, Nataša - W4, Venera - W5, Durumko - W6, NS Dur - W7), ječam (Novosadski 525 - B1, NS Pinon - B2, NS Zitos - B3, Atlas - B4, Somborac - B5, Rudnik - B6, NS Marko - B7, Golijat - B8, NS Mile - B9), ovas (Dunav - O1, Jadar - O2, Sedef - O3), raž (NS Savo - R), tritikale (NS Karnak - T1, NS Trifun - T2) i kukuruz (hibridi NS 5 - C1, NS 7 - C2, NS 9 - C3, NS 10 - C4, NS 11 - C5, NS 12 - C6, NS 13 - C7, NS 14 - C8, NS 17 - C9, NS 20 - C10, NS 21 - C11, NS 22 - C12, NS 23 - C13, NS 24 - C14, NS 26 - C15, NS 27 - C16, NS 28 - C17).

Preklopljeni hromatogrami ukupne jonske struje (TIC), dobijeni GC-MS analizom derivatizovanih liposolubilnih ekstrakata brašna ispitivanih biljnih vrsta, prikazani su na slici XXII-A, u Prilogu 2, strana xv. Evidentno je da se, bez primene multivarijantne analize, samo prostim posmatranjem, ne mogu uočiti značajne razlike među dobijenim TIC hromatogramima.

Kako bi se selektovali isključivo pikovi metil-estara masnih kiselina, sa dobijenih TIC hromatograma izolovan je jon $74 m/z$, fragmentni jon *McLafferty*-jevog premeštanja. Na slici XXII-B u Prilogu 2, strana xv, prikazani su preklopljeni jonski hromatogrami jona $74 m/z$ derivatizovanih ekstrakata uzoraka brašna ispitivanih cerealijskih – kukuruza i strnih žita. Jasno se vidi da se na ovaj način dobijaju pojednostavljeni hromatogrami, na kojima su ekstrahovani isključivo pikovi masnih kiselina, koji su od značaja za dalju analizu.

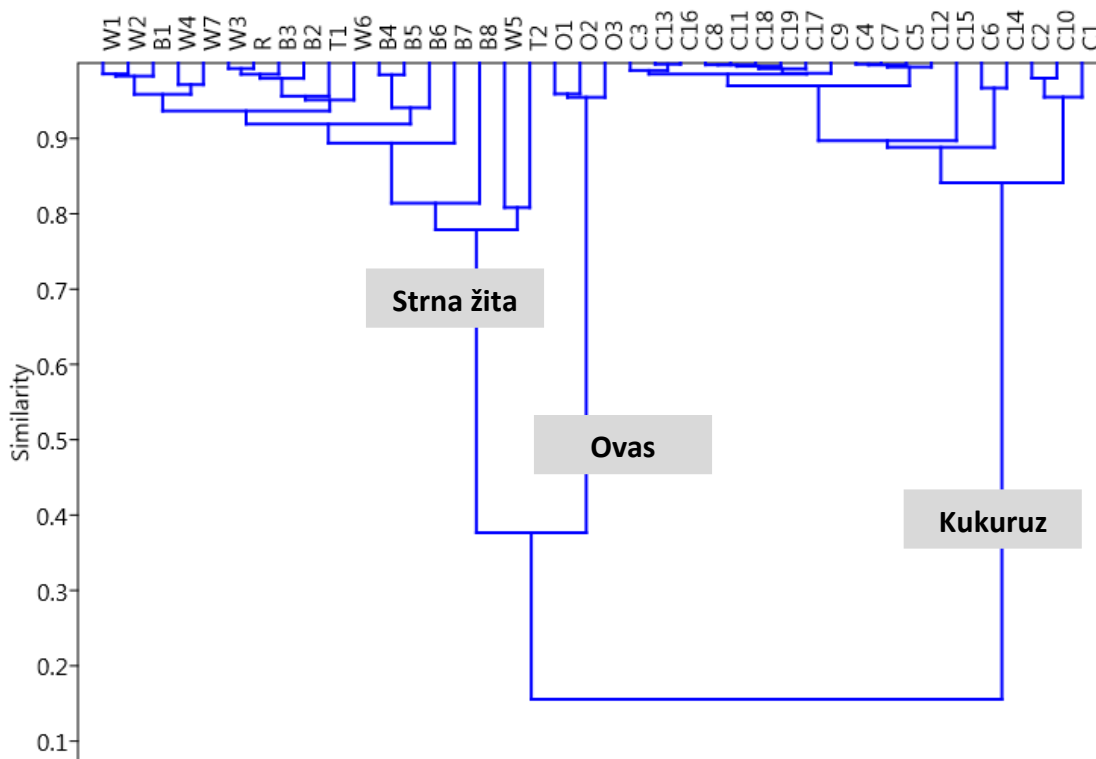
Primenom masene spektrometrije pokazano je da većinu ukupne integrisane površine dobijenih hromatograma svih ispitivanih uzoraka, sačinjavaju pikovi metil-estara dominantnih masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma u molekulu. Sve detektovane lipidne komponente prikazane su u tabeli 7, na strani 65.

Primećeno je da su lipidne komponente koje eluiraju pre 14.86 min karakteristične za ekstrakte brašna svih genotipova strnih žita i svih hibrida kukuruza, te ne predstavljaju pogodnu osnovu za njihovo razlikovanje. Najefikasnije razlikovanje ispitivanih uzoraka postignuto je multivarijantnom analizom masnih kiselina, koje na hromatogramima eluiraju nakon 14.86 min. Uvećan deo preklopljenih jonskih hromatograma, sa komponentama od

značaja za razlikovanje prikazan je na slici XXII-C u Prilogu 2, strana xv. Ovaj deo obuhvata minorne masne kiseline, odnosno masne kiseline sa više od 18 ugljenikovih atoma u molekulu. To su metil-estri eikozanske, dokozeanske, tetrakozeanske i heksakozeanske kiseline.

Dakle, integrisana površina punog pika svakog signala jona 74 m/z , koji eluira na jonskim hromatogramima nakon 14.86 min uvrštena je u multivarijantnu analizu. Na ovaj način je izbegnuta tačna identifikacija i tačno kvantitativno određivanje svakog pika od značaja.

Hijerarhijskom klaster analizom dobija se dendrogram prikazan na slici 24. Primenjen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Correlation*, jer se na ovaj način dobijaju najviše vrednosti kofenetičkog koeficijenta korelacije (0,9541).



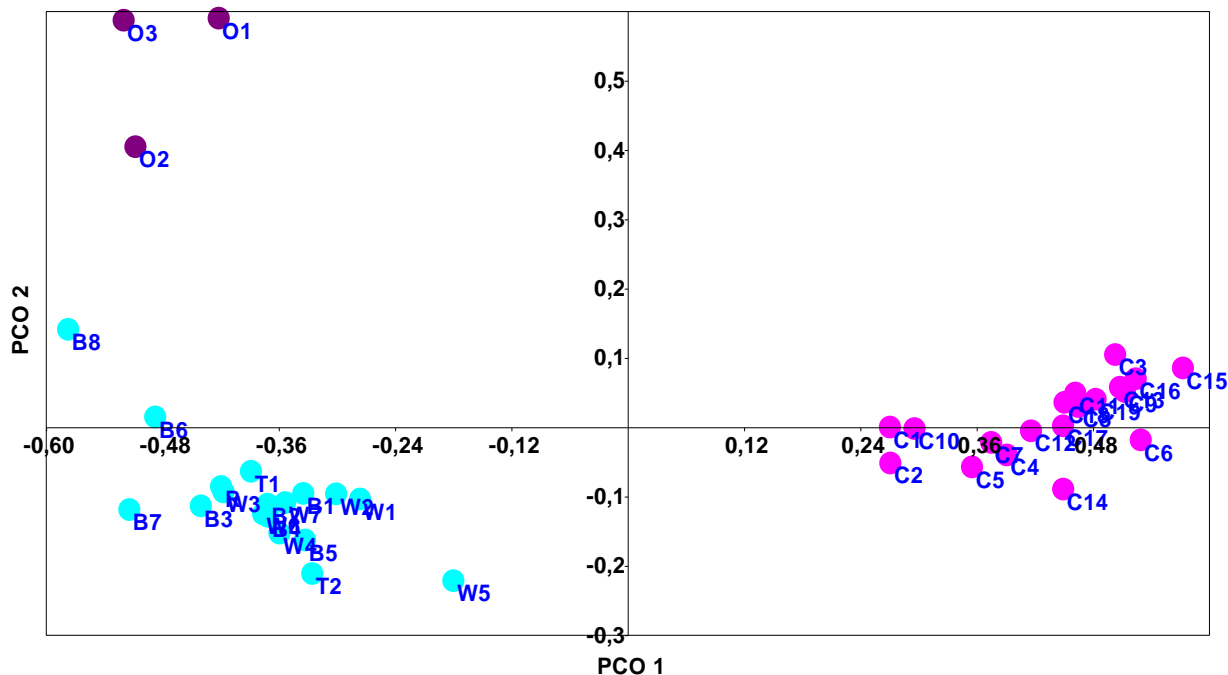
Slika 24. Dendrogram korelacije pikova od značaja, koji eluiraju nakon 14.86 min na hromatogramima liposolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna hibrida kukuruza i genotipova strnih žita iz tabele 4 (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz)

Na prikazanom dendrogramu uočava se jasno grupisanje analiziranih uzoraka u tri grane. Ispitivani uzorci brašna genotipova većine strnih žita (pšenice, ječma, raži i tritikalea)

grupušu se sa leve, dok se uzorci brašna hibrida kukuruza grupišu sa desne strane, uz nizak stepen sličnosti ($y > 0,1$). Interesantno je da uzorci brašna sva tri genotipa ovsa sačinjavaju posebnu granu i jasno se razdvajaju, kako od uzoraka hibrida kukuruza, tako i od genotipova svih ostalih strnih žita, uz stepen sličnosti $y < 0,4$.

Za razlikovanje uzoraka brašna dobijenog od strnih žita i kukuruza ispitana je i mogućnost primene analize osnovnih koordinata. Slika 25 prikazuje dobijeni PCO dijagram. Primenjen je *Paired Group* algoritam i indeks sličnosti *Correlation*, uz standardnu vrednost eksponenta transformacije ($c = 2$). Prva i druga osnovna koordinata (PCO1 i PCO2) objašnjavaju 81,9% ukupne varijanse (69,8% i 12,1%, redom). Rezultati PCO analize u potpunosti se podudaraju sa rezultatima dobijenim primenom hijerarhijske klaster analize. Svi uzorci bezglutenskog brašna hibrida prosolikog žita – kukuruza, kao i uzorci genotipova ovsa zasebno se grupišu i u potpunosti su odvojeni od uzoraka brašna drugih analiziranih genotipova strnih žita (pšenice, ječma, raži i tritikalea), koji sadrže gluten.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima analize uzoraka brašna različitih genotipova cerealija primenom svetlosne i skenirajuće elektronske mikroskopije (Pastor et al., 2016a).



Slika 25. PCO dijagram pikova od značaja, koji eluiraju nakon 14.86 min na hromatogramima liposolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna hibrida kukuruza i genotipova strnih žita iz tabele 4 (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz)

IV-A-3.2.2.2. Korelacije hidrosolubilnih profila brašna strnih žita i kukuruza

Sistem GC-MS u kombinaciji sa multivarijantnom analizom primenjen je i u razlikovanju uzoraka brašna različitih genotipova strnih žita i brašna kukuruza, poređenjem profila hidrosolubilnih komponenata (Pastor et al., 2016b).

Analizirani su uzorci brašna različitih genotipova strnih žita, kao i različiti hibridi kukuruza (tabela 4, strana 47): pšenica (Renesansa - W1, Rapsodija - W2, Evropa 90 - W3, Pesma - W4, Milijana - W5, Nataša - W6, Venera - W7, Durumko - W8), ječam (Novosadski 525 - B1, NS Pinon - B2, NS Zitos - B3, Atlas - B4, Somborac - B5, Rudnik - B6, NS Marko - B7, Golijat - B8, NS Mile - B9), ovas (Dunav - O1, Jadar - O2, Sedef - O3), raž (NS Savo - R), tritikale (NS Karnak - T1, NS Trifun - T2), 17 hibrida kukuruza (NS 5 - C1, NS 7 - C2, NS 9 - C3, NS 10 - C4, NS 11 - C5, NS 12 - C6, NS 13 - C7, NS 14 - C8, NS 17 - C9, NS 20 - C10, NS 21 - C11, NS 22 - C12, NS 23 - C13, NS 24 - C14, NS 26 - C15, NS 27 - C16, NS 28 - C17).

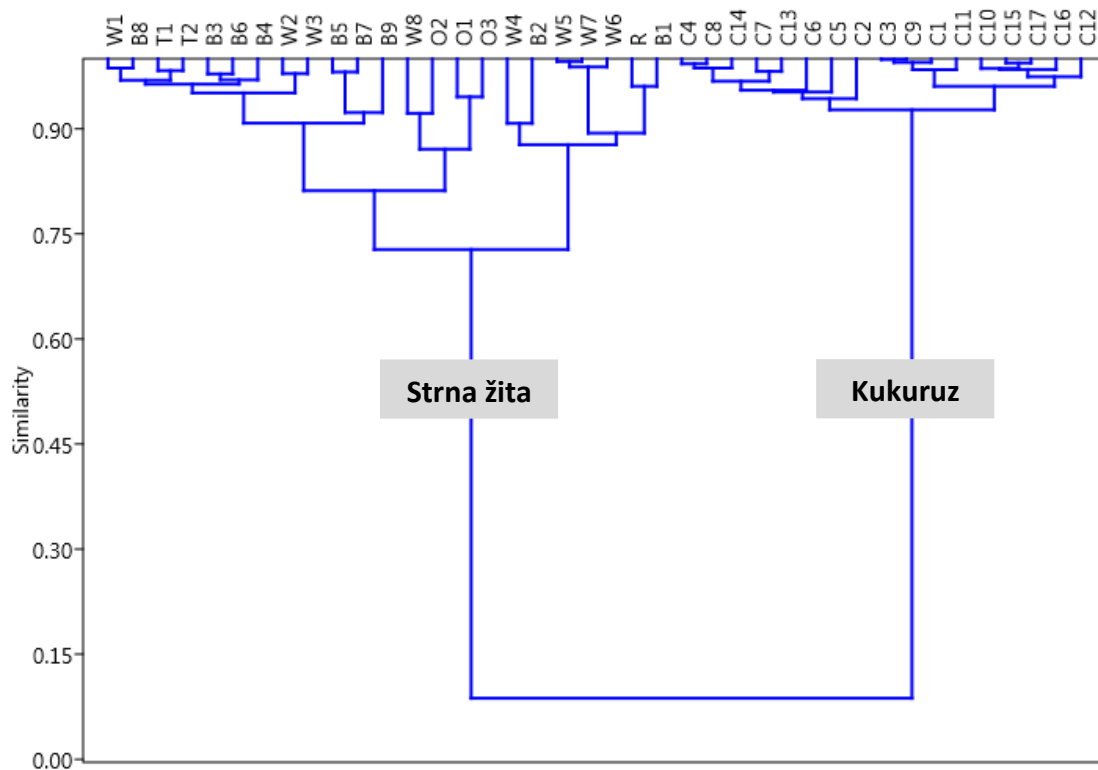
Trimetilsilil-etri prostih ugljenih hidrata imaju mnogo izomera, koji eluiraju u vidu mnoštva pikova na TIC hromatogramima. Stoga je odlučeno da se analiziraju trimetilsilil-oksimi prostih ugljenih hidrata i time pojednostave dobijeni hromatogrami. Takođe, u samoj proceduri derivatizacije primenjen je reagens, bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (BSTFA) (Gordon, 1990). Prema podacima iz literature BSTFA je efikasniji u odnosu na trimetilsilil-imidazol (TMSI), koji je korišćen u ranijim istraživanjima (Ačanski i Vujić, 2014).

Dobijeni hromatogrami ukupne jonske struje (TIC) prikazani su na slici XXIII u Prilogu 2, strana xvi. Slika XXIII prikazuje preklapljene TIC hromatograme hidrosolubilnih ekstrakata brašna strnih žita (A), brašna hibrida kukuruza (B), kao i svih analiziranih uzoraka zajedno (C).

Posmatranjem slike XXIII vizuelno se ne mogu uočiti značajne razlike među eluirajućim komponentama hidrosolubilnih ekstrakata strnih žita i kukuruza. Primenom masene spektrometrije pokazano je da na njima eluiraju eritritol, pentoze i pentitoli, heksoze i heksitoli, kao i nekoliko vrsta disaharida. Hidrosolubilne komponente detektovane masenom spektrometrijom prikazane su u tabeli 8, na strani 69. Kako svrha ovog istraživanja nije bila tačna identifikacija eluirajućih komponenata, hromatogrami su dalje analizirani odabirom specifičnih fragmentnih jona, karakterističnih za proste šećere, odnosno ugljene hidrate nižih molekulskih masa (Pastor et al., 2016b). Selektovanjem jona 73 m/z sa TIC hromatograma izolovani su svi trimetilsilil-derivati (TMS). Joni 204 m/z i 217 m/z izraženi su na pikovima monosaharida piranoznog i furanoznog prstena, redom (Karady i Pines, 1970; Ačanski i Vujić, 2014a), a jon 361 m/z na pikovima disaharida (Füzfai et al., 2008). Na ovaj način su sa kompleksnih TIC hromatograma ekstrahovani pojednostavljeni jonski hromatogrami, koji omogućavaju jednostavniju detekciju pikova prostih ugljenih hidrata (Pastor et al., 2016b).

U cilju multivarijante obrade u obzir su uzete isključivo integrisane pune površine onih pikova na TIC hromatogramima, koji sadrže barem jedan od odabranih karakterističnih fragmentnih jona prostih šećera (204, 217 i 361 m/z) u kombinaciji sa jonom 73 m/z . Pikovi koji sadrže fragmentni jon 204 m/z predstavljaju TMS-derivate monosaharida piranoznog prstena; pikovi koji sadrže jon 217 m/z TMS-derivate monosaharida furanoznog prstena, a pikovi sa karakterističnim jonom od 361 m/z TMS-derivate molekula disaharida. Kako su u ovoj studiji analizirani različiti genotipovi različitih botaničkih vrsta cerealija, pojedini uzorci brašna sadržali su komponente koje drugi uzorci ne sadrže. Ukupan broj pikova prostih šećera, kao varijabli odabranih za multivarijantnu analizu, je 20.

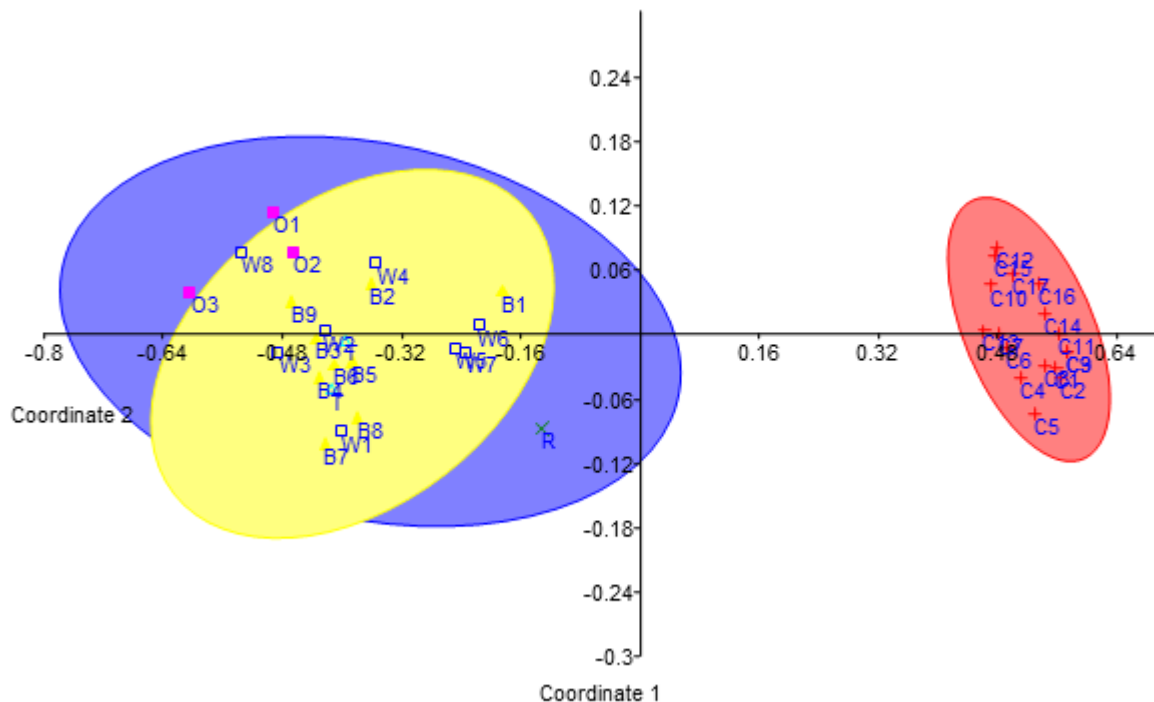
Hijerarhijskom klaster analizom integrisanih površina pikova (varijabli), dobija se dendrogram, prikazan na slici 26. Primenjen je *Paired Group* algoritam i *Rho* indeks sličnosti, uz dobijeni kofenetički koeficijent korelacije od 0,9717, što ukazuje na verodostojnost dobijenog dendrograma.



Slika 26. Dendrogram korelacije komponentata hidrosolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna hibrida kukuruza i genotipova strnih žita iz tabele 4 (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz)

Sa dendrograma se uočava jasno razlikovanje uzoraka glutenskog brašna strnih žita od uzoraka bezglutenskog brašna hibrida kukuruza. Međutim, klaster analiza ne uspeva potpuno da razdvoji uzorke brašna strnih žita prema odgovarajućoj botaničkoj pripadnosti. Uzorci brašna dva analizirana genotipa tritikalea (T1, T2), dve grupe uzoraka brašna genotipova ječma (B3, B6, B4) (B5, B7, B9), i grupa od dva genotipa ovsa (O1, O3) prikazuju adekvatno grupisanje i relativno jasno razdvajanje od ostalih uzoraka. Međutim, uzorci brašna genotipova (W1, B8), (W8, O2), (W4, B2) i (R, B1), ne grupišu se na odgovarajući način, prema biljnoj vrsti. Sa ordinate se uočava da je vrednost stepena sličnosti između svih analiziranih uzoraka strnih žita $y > 0,70$, jer su ove biljne vrste botanički veoma srodne. Sa druge strane, stepen sličnosti između uzoraka brašna hibrida kukuruza i uzoraka brašna genotipova strnih žita pokazuje nisku vrednost, $y > 0,10$, ukazujući na veoma izražene razlike profila njihovih hidrosolubilnih komponenata (Pastor et al., 2016b).

Analizom osnovnih koordinata dobija se PCO dijagram sa slike 27. Odabran je indeks sličnosti *Rho* i standardna vrednost eksponenta transformacije ($c = 2$).



Slika 27. PCO dijagram korelacije komponenata hidrosolubilnih ekstrakata analiziranih uzoraka brašna hibrida kukuruza i genotipova strnih žita iz tabele 4 (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikalea, O – ovas, C – kukuruz)

Posmatranjem uzoraka u koordinatnom sistemu PCO dijagrama uočava se usko grupisanje uzoraka brašna svih ispitivanih hibrida kukuruza u crvenoj elipsi sa desne strane. Nešto šire grupisanje uzoraka brašna genotipova svih ispitivanih strnih žita uočava se u elipsi sa leve strane. Može se zaključiti da se analizom osnovnih koordinata prostih šećera uzorci glutenskog brašna strnih žita mogu jasno razlikovati od uzoraka bezglutenskog brašna hibrida kukuruza. Međutim, predložena metoda je nedovoljno selektivna u razdvajanju uzoraka brašna strnih žita prema odgovarajućem botaničkom poreklu, najverovatnije zbog velike međusobne sličnosti ovakvih biljnih vrsta.

Interesantno je da su ovi rezultati u potpunosti saglasni sa rezultatima analize brašna primenom sinhronne fluorescentne spektroskopije u kombinaciji sa klaster analizom (Zeković et al., 2012).

IV-A-3.2.3. Metode binarnih sistema

IV-A-3.2.3.1. Korelacije hidrosolubilnih profila brašna strnih žita i kukuruza

U tekstu koji sledi opisan je nov binarni pristup razlikovanja brašna bezglutenskog prosolikog žita – kukuruza, od glutenskih brašna različitih genotipova strnih žita (hlebne pšenice, raži, tritikalea, ovsa i ječma). I u ovom slučaju uzorci su analizirani primenom GC-MS sistema, nakon čega je usledila obrada dobijenih podataka primenom multivarijantne analize. Takođe, nisu korišćeni analitički standardi, kao ni tačna, kvantitativna određivanja detektovanih ugljenohidratnih komponenata (Pastor et al., 2016c).

Analizirano je 19 uzoraka različitih hibrida kukuruza, kao i različite vrste strnih žita (tabela 4, strana 47): 17 hibrida kukuruza (NS 5 - C1, NS 7 - C2, NS 9 - C3, NS 10 - C4, NS 11 - C5, NS 12 - C6, NS 13 - C7, NS 14 - C8, NS 17 - C9, NS 20 - C10, NS 21 - C11, NS 22 - C12, NS 23 - C13, NS 24 - C14, NS 26 - C15, NS 27 - C16, NS 28 - C17), 9 genotipova pšenice (Renesansa - W1, Rapsodija - W2, Evropa 90 - W3, Pesma - W4, Milijana - W5, Nataša - W6, Venera - W7, Durumko - W8, NS Dur - W9), 1 genotip raži (NS Savo - R), 2 genotipa tritikalea (NS Karnak - T1, NS Trifun - T2), 3 genotipa ovsa (Dunav - O1, Jadar - O2, Sedef - O3), i 9 genotipova ječma (Novosadski 525 - B1, NS Pinon - B2, NS Zitos - B3, Atlas - B4, Somborac - B5, Rudnik - B6, NS Marko - B7, Golijat - B8, NS Mile - B9).

Slika XXIV (A), na strani xvii u Prilogu 2, prikazuje preklopljene TIC hromatograme hidrosolubilnih ekstrakata brašna različitih hibrida kukuruza. Slika XXIV (B), na strani xvii u Prilogu 2, preklopljene TIC hromatograme, dobijene GC-MS analizom hidrosolubilnih ekstrakata brašna različitih genotipova strnih žita. Samo posmatranjem priloženih hromatograma ne mogu se uočiti značajne razlike među eluirajućim hidrosolubilnim komponentama analiziranih uzoraka. Ugljenohidratne komponente nižih molekulskih masa identifikovane su isključivo primenom masene spektrometrije. Detektovane komponente hidrosolubilnih ekstrakata u obliku isparljivih trimetilsilil-oksima prikazane su u tabeli 12, zajedno sa odgovarajućim retencionim vremenima.

Šećerni alkohol, eritritol, je jedina identifikovana ugljenohidratna komponenta sa 4 ugljenikova atoma u molekulu. Ostatak hromatograma čine pentoze i pentitoli, heksoze i heksitoli, kao i pojedini disaharidi. Kako su ugljenohidratne komponente hidrosolubilnih ekstrakata uzoraka brašna derivatizovane u trimetilsilil-oksime, na TIC hromatogramima treba da se javljaju u vidu dva različita pika po redukujućem šećeru i u vidu isključivo jednog pika po neredukujućem šećeru. Međutim, primenom masene spektrometrije, prisustvo pojedinih redukujućih monosaharida (npr. arabinoze) i disaharida (npr. turanoze) identifikovano je samo na jednom retencionom vremenu. S druge strane, neredukujući disaharid- saharoza, detektovan na čak pet retencionih vremena.

Tabela 12. Nastavak

R_t	Jedinjenje	C	W	R	T	O	B
18.38	α-D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-β-D-fruktofuranozil-2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	1	1	1	1	1	1
18.52	Gvajakol- β -D-glukopiranozid--O-(trimetilsilil)-	0	0/1	0	0	1	0/1
18.57	D-Turanoza,2,3,4,2,3,4,6-heptakis-(trimetilsilil)-	0	1/0	0	0	1	1/0
18.80	Melibioza,2,3,4,6,1,2,3,4-oktakis-(trimetilsilil)-	0	1	0	1	1	1/0
18.92	α-D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-β-D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	1	1	1	1	1	1
20.85	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	1	1/0	0	1	1	1/0
21.39	α -D-Glukopiranozid,1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-fruktofuranozil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	1	1/0	0	1	1	1/0

^aSkraćenice: C – kukuruz, W – pšenica, R – raž, T – tritikale, O – ovas, B – ječam.

^b„1“ šećerna komponenta detektovana u svakom analiziranom genotipu određene biljne vrste.

^c„0“ šećerna komponenta koja nije detektovana ni u jednom analiziranom genotipu određene biljne vrste.

^d„0/1“ šećerna komponenta detektovana u manje od polovine analiziranih genotipova određene biljne vrste.

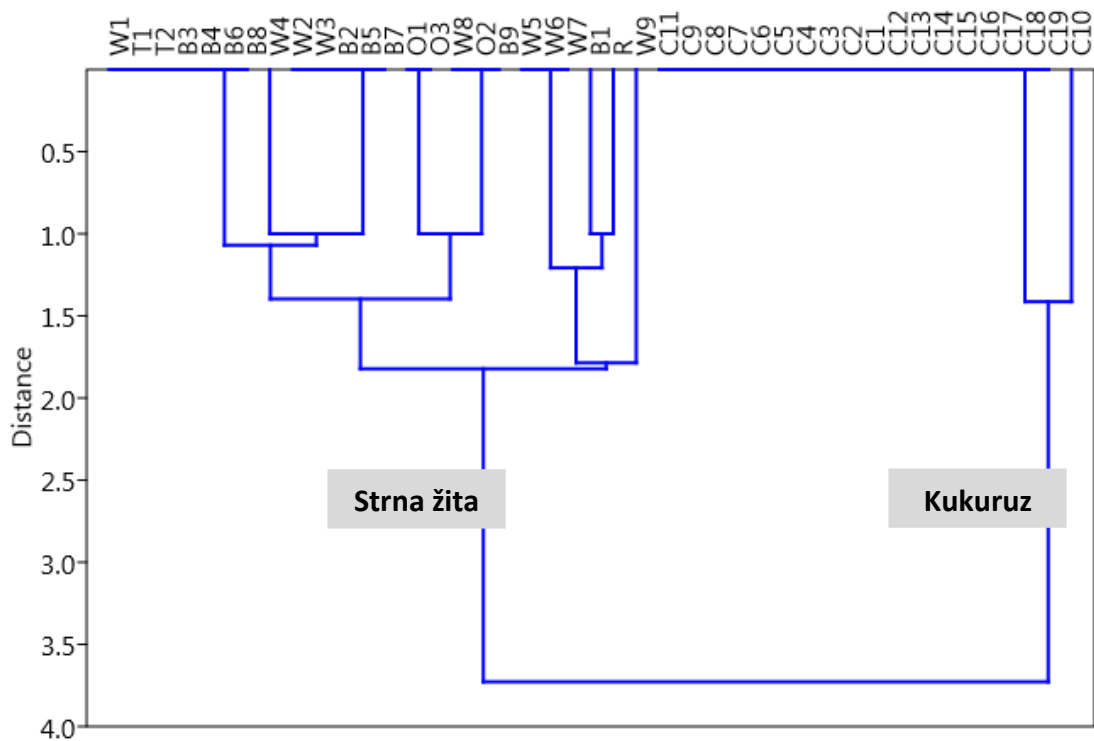
^e„1/0“ šećerna komponenta detektovana u više od polovine analiziranih genotipova određene biljne vrste.

^fšećerne komponente koje nisu korišćene u multivarijantnoj obradi podataka napisane su sa podebljanjem (**bold**).

Može se zaključiti da maseno-spektrometrijska detekcija ne daje u potpunosti zadovoljavajuće rezultate kada je u pitanju tačna identifikacija trimetilsilil-oksima prostih šećera, zbog veoma sličnih masenih spektara. Prosti šećeri se u prirodnim uzorcima javljaju u obliku mnogobrojnih izomera, čije se strukture međusobno neznatno razlikuju. Zbog toga, na primer, korišćenjem masenog spektrometra analitičar ne može biti u potpunosti siguran da je pik koji eluiru na retencionom vremenu od 18.38 min, definitivno pik saharoze, ali može biti sasvim siguran da je u pitanju pik prostog šećera, i to disaharida. To je sasvim dovoljno za primenu binarnog pristupa, koji se primenjuje u ovom slučaju.

Binarne matrice, koje su kreirane na osnovu prisustva (1) i odsustva (0), pojedinih prostih ugljenohidratnih komponenata u uzorcima brašna analiziranih vrsta cerealijskih, podvrgnute su multivarijantnoj analizi.

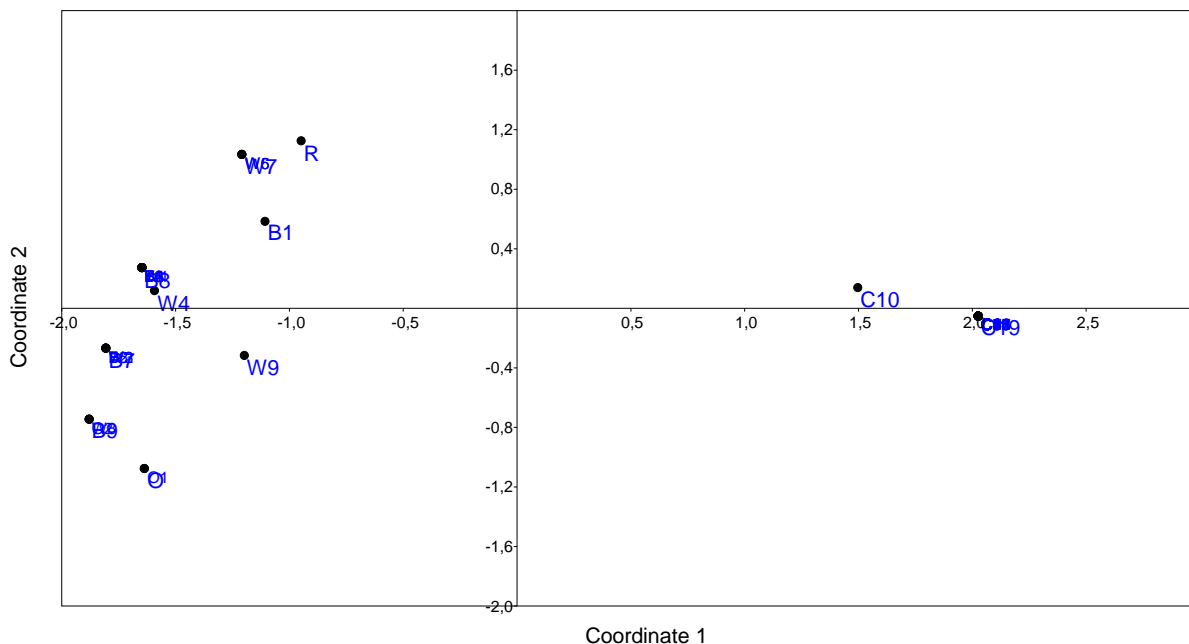
Hijerarhijskom klaster analizom dobija se dendrogram prostih ugljenohidratnih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata brašna različitih genotipova strnih žita i hibrida kukuruza, slika 28.



Slika 28. Dendrogram korelacije komponenata (dobijenih primenom binarnog pristupa) u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna genotipova strnih žita i hibrida kukuruza iz tabele 4 (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz)

Primenjen je indeks sličnosti *Euclidean distance* i *Paired Group* algoritam, pri čemu se dobija visoka vrednost kofenetičkog koeficijenta korelacije (0,9924), što ukazuje na verodostojnost prikazanog dendrograma. Na ovaj način, uzorci brašna svakog genotipa strnih žita (bez obzira na tačno botaničko poreklo) jasno su razdvojeni od uzoraka brašna svakog hibrida kukuruza, sa vrednošću rastojanja $y > 3,5$.

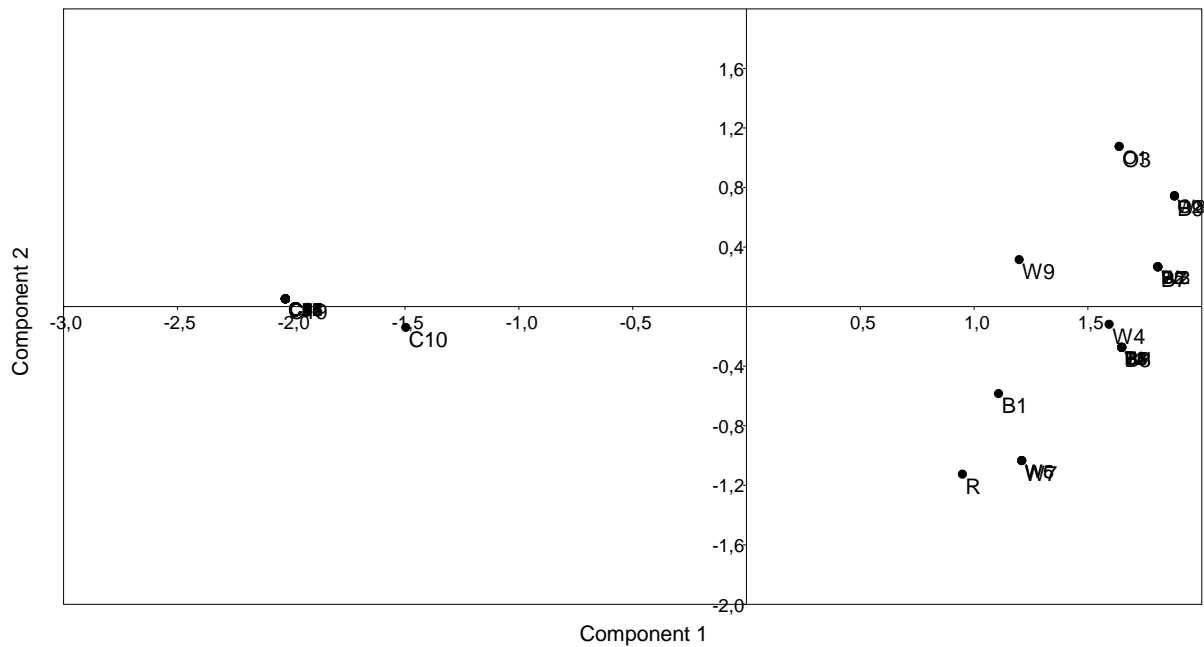
Analizom osnovnih koordinata dobija se PCO dijagram prostih ugljenohidratnih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata brašna, različitih genotipova strnih žita i hibrida kukuruza analiziranih u ovoj studiji, slika 29. Ponovo primenjeni indeks sličnosti *Euclidean distance*, prikazuje jasno odvajanje i grupisanje uzoraka brašna svih genotipova strnih žita, sa leve strane, a uzoraka brašna svih hibrida kukuruza, sa desne strane predstavljenog PCO dijagrama.



Slika 29. PCO dijagram komponenata (dobijenih primenom binarnog pristupa) prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna genotipova strnih žita i hibrida kukuruza iz tabele 4 (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz)

Analizom osnovnih komponenata dobija se PCA dijagram prostih ugljenohidratnih komponenata hidrosolubilnih ekstrakata brašna različitih genotipova strnih žita i hibrida kukuruza, analiziranih u ovoj studiji, slika 30.

Var-covar matriks PCA dijagram, slično PCO dijagramu sa slike 29, pokazuje jasno razlikovanje bezglutenskog brašna hibrida kukuruza (levo), od uzoraka glutenskog brašna svih analiziranih genotipova strnih žita (desno) (Pastor et al., 2016c).



Slika 30. PCA dijagram komponenata (dobijenih primenom binarnog pristupa) prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna genotipova strnih žita i hibrida kukuruza iz tabele 4 (W – pšenica, B – ječam, R – raž, T – tritikale, O – ovas, C – kukuruz)

IV-A-3.3. Diferencijacija brašna genotipova cerealija – strnih žita

IV-A-3.3.1. Metode binarnih sistema

IV-A-3.3.1.1. Korelacije hidrosolubilnih profila brašna strnih žita

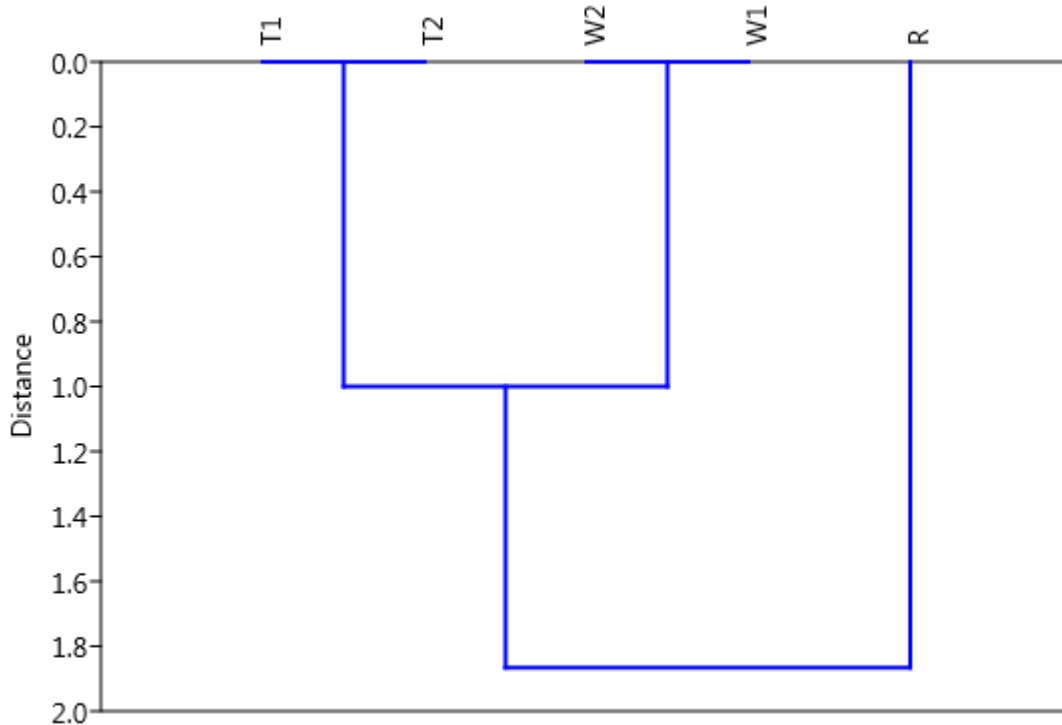
U ovom poglavlju je opisana mogućnost razlikovanja botanički srodnih cerealija – strnih žita: pšenice, raži i njihovog veštačkog hibrida, tritikalea (Pastor et al., 2017b).

Analizirana su dva uzorka pšenice (Rapsodija – W1, Evropa 90 – W2), jedan uzorak raži (NS Savo - R) i dva uzorka tritikalea (NS Karnak - T1, NS Trifun - T2). Preklopljeni hromatogrami ukupne jonske struje hidrosolubilnih ekstrakata ispitivanih uzoraka strnih žita prikazani su na slici XXV (A) u Prilogu 2, strana xviii.

Hromatogrami uključuju trimetilsilil-oksime prostih šećera: pentoza i pentitola, heksoza i heksitola, kao i nekoliko disaharida. Detektovane šećerne komponente prikazane su u tabeli 8, na strani 69. Binarne matrice eluirajućih hidrosolubilnih komponenata sa odgovarajućim retencionim vremenima kreirane su primenom oznaka „1“ i „0“. Kao i u prethodnim slučajevima, komponente koje su bile prisutne u svim ispitivanim uzorcima isključene su iz dalje analize, jer ne predstavljaju faktore bitne za njihovo razlikovanje. Preostale komponente su, kao faktori razdvajanja, korišćene u multivarijantnoj obradi podataka u obliku binarnih matrica, slika XXV (B) u Prilogu 2, strana xviii. Primenom masenog spektrometra i algoritma najveće verovatnoće, komponente koje eluiraju na 18.57 min, 18.80 min, 20.85 min i 21.39 min, identifikovane su kao turanoza, melibioza i dva pika saharoze, redom. Kako je verovatnoća podudaranja masenih spaktara svih ovih komponenata sa bibliotečkim podacima bila niska, primenom isključivo masene spektrometrije, ne može se sa sigurnošću utvrditi njihov tačan identitet. Međutim, može se reći da je svaka od eluirajućih komponenata od interesa definitivno neka vrsta prostog šećera. To je sasvim dovoljno za uspešnu primenu predložene semi-kvalitativne i semi-kvantitativne metode.

Primenom hijerarhijske klaster analize dobija se dendrogram prikazan na slici 31. Primenjena je mera distance *Euclidean* i algoritam *Paired Group*. Ovi parametri omogućili su dobijanje maksimalne vrednosti kofenetičkog koeficijanta korelacije (1), što potvrđuje verodostojnost dobijenog dendrograma. Stepenn sličnosti između ispitivanih uzoraka prikazan je na y-osi. Može se uočiti da primenom odabrane četiri varijable rastojanje između

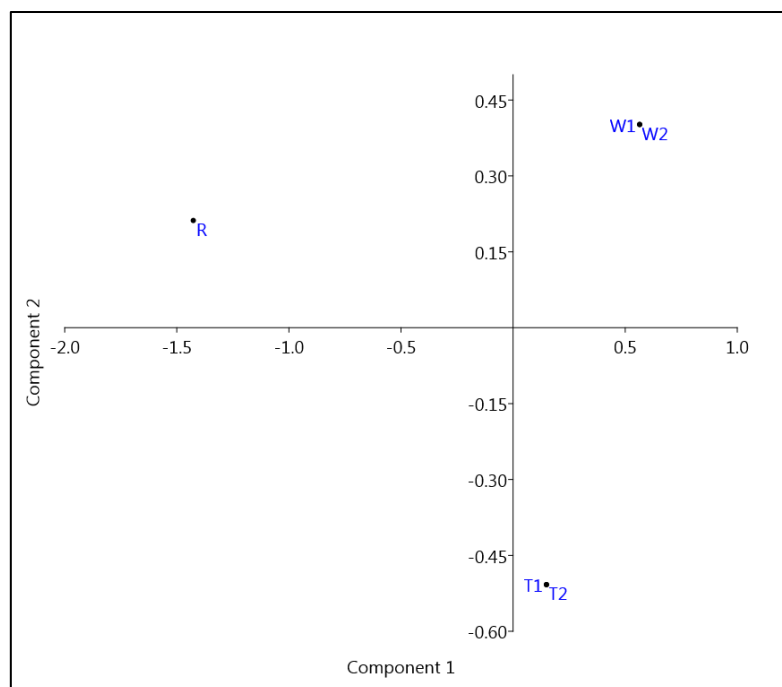
uzoraka pšenice i tritikalea iznosi $y \sim 1,0$, a između uzorka raži i uzoraka pšenice i tritikalea $y > 1,8$.



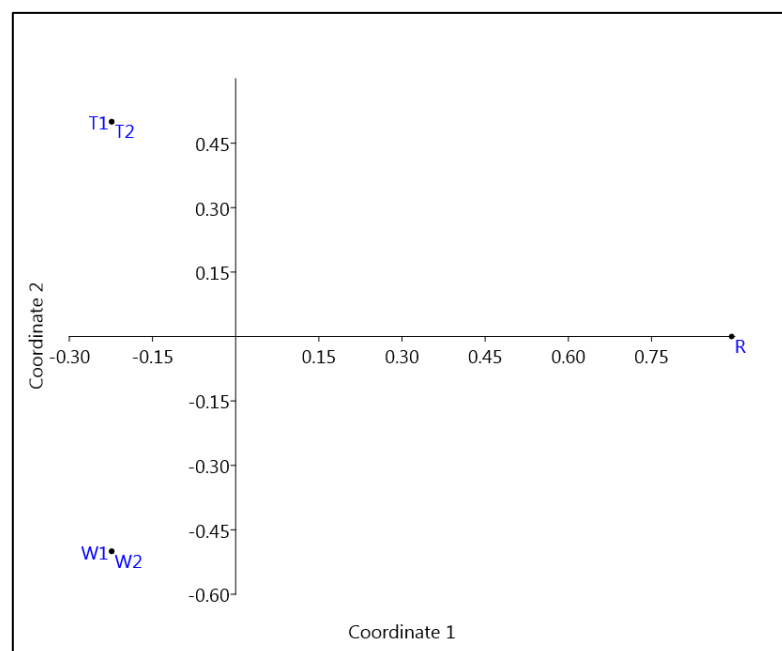
Slika 31. Dendrogram korelacije komponentata (dobijenih primenom binarnog pristupa) u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna genotipova pšenice (W), raži (R) i tritikalea (T)

Pimenom analize osnovnih komponentata dobijen je PCA dijagram, prikazan na slici 32. Odabirom četiri faktora razlikovanja dobijene su dve osnovne komponente, koje objašnjavaju 100% ukupne varijanse, 75,46 % i 24,54%, redom.

Primenom analize osnovnih koordinata dobijen je PCO dijagram prikazan na slici 33. Primenjen je indeks sličnosti *Correlation* i standardna vrednost koeficijenta transformacije ($c = 2$). Odabirom četiri faktora razlikovanja dobijene su dve osnovne koordinate koje objašnjavaju 100% ukupne varijanse, 83,67% i 16,33%, redom.



Slika 32. PCA dijagram korelacije komponenata (dobijenih primenom binarnog pristupa) u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna genotipova pšenice (W), raži (R) i tritikalea (T)



Slika 33. PCO dijagram korelacije komponenata (dobijenih primenom binarnog pristupa) u hidrosolubilnim ekstraktima analiziranih uzoraka brašna genotipova pšenice (W), raži (R) i tritikalea (T)

Primećuje se da se primenom odabranih faktora razlikovanja omogućava jasno razdvajanje uzoraka brašna pšenice, raži i tritikalea u kvadrantima PCA i PCO dijagrama. Međutim, primenom svake od ispitivanih tehnika multivarijantne analize uočava se veća sličnost između uzoraka brašna analiziranih genotipova tritikalea i pšenice, u odnosu na analiziran genotip raži (Pastor et al., 2017b). Ovaj zaključak može se dovesti u vezu sa sastavom genoma analiziranih botaničkih vrsta strnih žita. Tritikale (*Triticosecale* Wittmack) predstavlja veštački intergenerični hibrid različitih genotipova pšenice (*Triticum* ssp., AA, AABB i AABBDD) i raži (*Secale cereale*, RR), pri čemu se dobijaju genotipovi različitih konstitucija genoma i nivoa ploidnosti, poput tetraploidnog (AARR), heksaploidnog (AABBRR) i oktaploidnog (AABBDDRR). Za kultivaciju se koriste razvijeni sekundarni derivati tritikalea, koji predstavljaju stabilne heksaploidne sorte dobijene ukrštanjem oktaploidnog tritikalea i/ili heksaploidne pšenice sa heksaploidnim tritikaleom. Uzorci tritikalea analizirani u ovoj doktorskoj disertaciji pripadaju heksaploidnoj grupi, što ukazuje na to da se njihov genom sastoji od tri podgenoma: AA, BB i RR. To znači da ovi genotipovi većinu svog genoma nasleđuju od pšenice, a samo jednu trećinu od raži, pa se može reći da su sa pšenicom u bližem botaničkom srodstvu (Ma i Gustafson, 2008; Rakha et al., 2011). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Vujić et al., 2012; Vujić et al., 2013b).

IV-B

Analiza hleba

IV-B-1. Karakteristike proizvedenog pšeničnog hleba sa dodatkom brašna heljde

Hleb, kao masovna namirnica, uglavnom se proizvodi korišćenjem pšeničnog brašna, soli i kvasca. Danas je sve izrazitiji trend osmišljavanja i popularizacije novih formulacija za hleb, namenjenih potrošačima sa specijalnim zahtevima i potrebama, koje odlikuju različiti dodaci makro- i mikro-nutrijenata, koji mogu da potiču od heljde, spelte, ovsa itd. Suština kreiranja funkcionalnih formulacija za hleb leži u pokušaju da se osnovna formulacija za hleb obogati sirovinom koja je bogata bioaktivnim komponentama, kakva je, između ostalih, heljdino brašno.

Bonafaccia i Kreft (1994) su još 1994. godine razmatrali mogućnost korišćenja heljdinog brašna kao supstituenta pšeničnog brašna u formulacijama za hleb sa stanovišta tehnoloških parametara testa. Ispitivani nivoi supstitucije pšeničnog brašna heljdinim u formulaciji za hleb iznosili su 15%, 30% i 50%, dok je za kontrolu poslužio pšenični hleb. Autori su, ispitujući reološke pokazatelje ispitivanih testa, ustanovili da je testo sa 50% heljdinog brašna grudvasto i teško obradivo, ali da dodavanje heljdinog brašna u zames do nivoa od 30% povećava rezistentnost i stabilitet testa. Stoga su vekne proizvedene od smeša pšeničnog i heljdinog brašna do nivoa supstitucije od 30% zadovoljavajućeg volumena, sličnog volumenu kontrolnog hleba, dok je hleb sa 50% heljdinog brašna značajno manjeg volumena i bez poroznosti.

Jedan od pokazatelja kvaliteta osnovnog hemijskog sastava po kome se korišćena brašna upečatljivo razlikuju je sadržaj sirove celuloze, što je u skladu sa ranije publikovanim rezultatima, koji ukazuju da je heljdino brašno značajno bogatije vlaknima u odnosu na pšenično (Bonafaccia et al., 2003). To je, međutim, rezultiralo bitno povišenim sadržajem vlakana u hlebu obogaćenom integralnim heljdinim brašnom, što, verovatno, ima za posledicu i viši sadržaj nerastvornih β -glukana, prisutnih u ljusci. Obzirom da su β -glukani poznati kao imunostimulativni polisaharidi (Hozová et al., 2007), potrošači koji se opredeljuju na dugoročno konzumiranje hleba obogaćenog integralnim heljdinim brašnom obezbeđuju potporu svom imunom sistemu.

Supstitucija pšeničnog brašna integralnim heljdinim brašnom rezultirala je proizvodima povećane funkcionalnosti, pre svega zbog prisustva antioksidativno delotvornih polifenola, rutina i kvercetina. Izučavajući sadržaj rutina u heljdi, sirovinama od heljde i proizvodima od heljde, Kreft et al. (2006) su ustanovili da korišćenje sirovina od heljde, upravo zbog visokih sadržaja rutina, obezbeđuje funkcionalnost finalnom proizvodu.

Hlebove obogaćene integralnim heljdinim brašnom odlikuje manja svetloća i belina, kao i veći udeo crvene i žute boje u odnosu na kontrolni beli pšenični hleb. Trend smanjenja svetloće proizvoda sa dodatkom heljdinog brašna u odnosu na proizvode od pšeničnog brašna zabeležen je i u radovima (Arendt et al., 2003), koji su ukazali da se sa porastom udela heljdinog brašna u biskvitima, špagetama i tarani, respektivno, smanjuje i svetloća u odnosu na kontrolne uzorke od pšeničnog brašna. Hleb sa većim udelom heljdinog brašna karakteriše izrazitija braon boja u odnosu na boju belog hleba, koja je atraktivna i privlači pažnju potrošača.

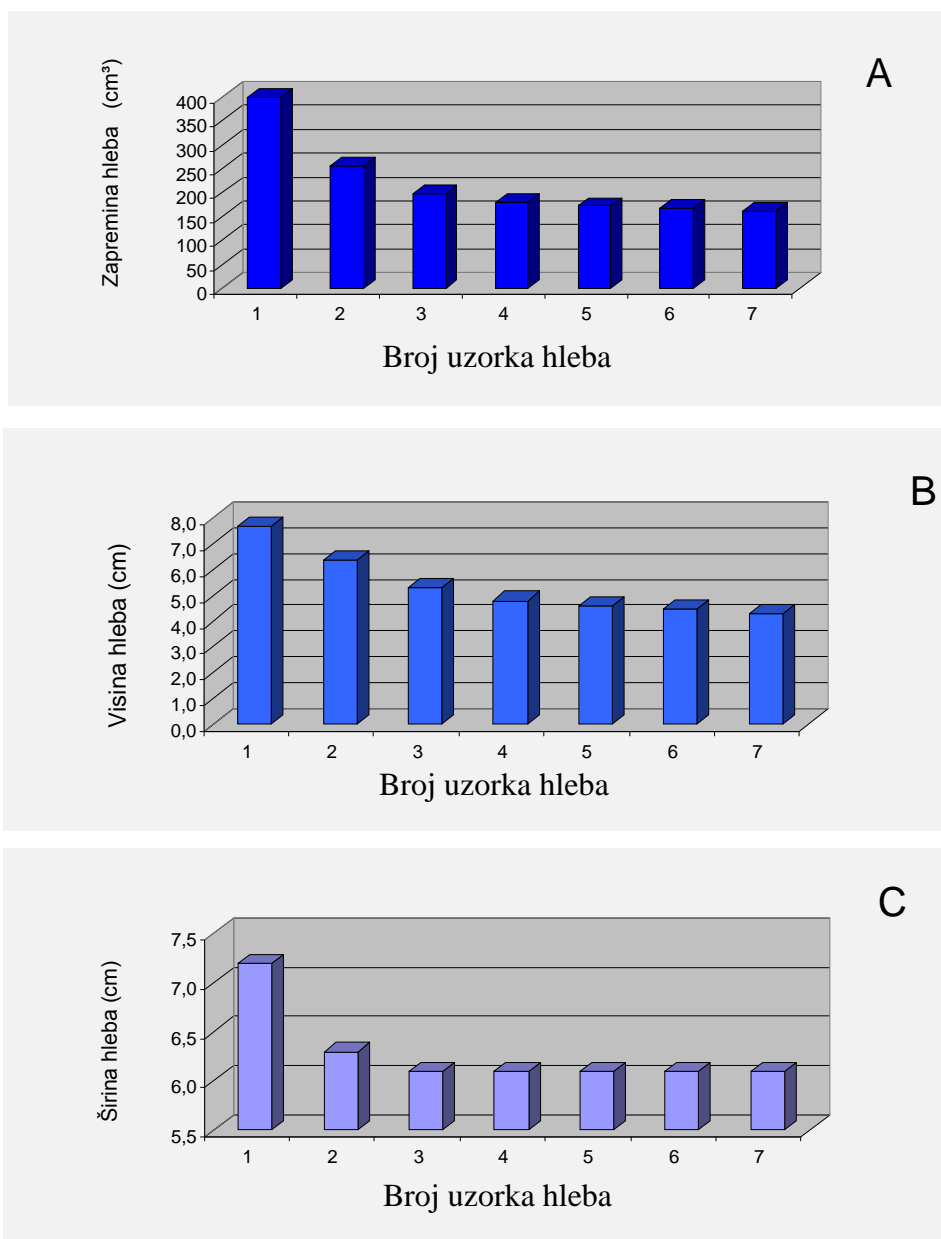
Dodavanje integralnog heljdinog brašna u pšenično belo brašno odrazilo se na organoleptičke karakteristike hleba, pre svega na njegov volumen, koji je sa porastom količine heljde postao manji, i boju kore i sredine hleba, koja je postala braonzelena. Ujednačenost pora sredine hleba smanjivala se, takođe, sa porastom udela integralnog heljdinog brašna u formulaciji za hleb, kao i elastičnost sredine hleba. Generalno, dodatak od 20% do 50% heljdinog brašna u formulaciju za hleb ocenjen je kao prihvatljiv. Takav hleb je manje zapremine, specifičnog, aromatičnog i prijatnog ukusa i mirisa, sa zadovoljavajućom elastičnošću. Dodavanje više od 50% heljdinog integralnog brašna ocenjeno je kao neprihvatljivo, jer je proizvedeni hleb bio neprihvatljive boje, zdudan, gumast, gnjecav i pomalo gorak.

Prema dobijenim rezultatima analize proizvedenih uzoraka hleba, dodatak integralnog heljdinog brašna belom pšeničnom brašnu uzrokuje promene fizičkih i organoleptičkih svojstava, što je prikazano na slici 34. Sa povećanjem sadržaja heljdinog brašna smanjuje se zapremina dobijenog hleba, a kora dobije braonzelenu boju. Ovi zaključci su u saglasnosti sa prethodnim studijama (Bonafaccia i Kreft, 1994; Gallagher et al., 2003; Bilgiçli, 2009).

Supstitucija belog pšeničnog brašna heljdinim brašnom u formulaciji za hleb ne utiče značajno na specifičnu zapreminu hleba. S obzirom na to da je specifična zapremina standardnog hleba $6 \text{ cm}^3/\text{g}$, i da ne treba da bude ispod $3,5 \text{ cm}^3/\text{g}$ (CGPRDI, 1983), može se reći da svih sedam uzoraka proizvedenog hleba imaju zadovoljavajuću specifičnu zapreminu.

Dodatak od 20% do 50% brašna heljde u formulaciji za hleb može da se oceni kao prihvatljiv. Iako hleb sa 20%, 40% i 50% brašna heljde u formulaciji ima manju zapreminu, njegov ukus može se okarakterisati kao aromatičan i prijatan. Elastičnost je, takođe, zadovoljavajuća.

Međutim, udeo heljdinog brašna sa više od 50% može se oceniti kao neprihvatljiv u formulacijama za hleb, jer uzorci ispitivanog hleba sa 60%, 80% i 100% brašna heljde imaju neprihvatljivu boju, gumasti su, gnjecavi i gorkog ukusa (Psodorov et al., 2014).



Slika 34. Zapremina (A), visina (B) i širina (C) ispitivanih uzoraka pšeničnog hleba sa dodatkom brašna heljde (oznake 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sadrže redom 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% brašna heljde)

IV-B-2. Korelacije liposolubilnih komponenata

Kako je ocenjeno da se zamena pšeničnog brašna heljdinim brašnom u udelu preko 60% u formulacijama za hleb može okarakterisati kao neprikladna sa aspekta organoleptičkih osobina takvog proizvoda, u daljim ispitivanjima korelacija liposolubilnog sastava korišćeni su uzorci hleba, koji su pečeni u potpuno obezmašćenim kalupima za hleb i to sa udelom brašna heljde od 0%, 20%, 40%, 50% i 60%.

Do sada je pokazano (Ačanski i Vujić, 2014a; Ačanski et al., 2015b), da se brašna pšenice i heljde mogu nedvosmisleno razlikovati kombinovanom GC-MS i multivarijantnom analizom: (i) karakterističnih jona prostih šećera prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima brašna, i (ii) karakterističnih jona metil-estara masnih kiselina i neosapunjivih komponenata, prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna. U drugim istraživanjima je, takođe, pokazano da je analizom prostih šećera hidrosolubilnih ekstrakata kora i sredina, moguće razlikovati uzorke hleba proizvedene od mešavine pšeničnog i heljdinog brašna u različitim proporcijama (Psodorov et al., 2014; Ačanski et al., 2015e). Cilj ovog pristupa je da se utvrdi mogućnost razlikovanja pet proizvedenih uzoraka pšeničnog hleba sa kontrolisanim dodatkom heljde. Sada je to učinjeno analizom metil-estara dominantnih i minornih masnih kiselina i formiranjem dendrograma njihovih korelacija u kori i sredini hleba.

IV-B-2.1. Korelacije metil-estara dominantnih masnih kiselina u kori i sredini hleba

Dominantne masne kiseline zrna heljde su pojedine nezasićene masne kiseline, C18:1 i C18:2, i zasićene masne kiseline, C16:0 i C18:0 (Bonafaccia et al., 2003). Tipični sastav od 80% nezasićenih masnih kiselina i više od 40% polinezasićene esencijalne masne kiseline – linolne kiseline, čini heljdu nutritivno superiornom u pogledu masno-kiselinskog sastava u odnosu na zrna konvencionalnih cerealija (Steadman et al., 2001).

Na slikama XXVI i XXVII u Prilogu 2, strana xix, prikazani su preklopljeni jonski hromatogrami, dobijeni selektovanjem karakterističnog jona *McLafferty*-jevog premeštanja od 74 m/z , u pet uzoraka liposolubilnih ekstrakata kore, odnosno sredine hleba. Kao što se sa obe slike vidi redosled eluiranja dominantnih metil-estara masnih kiselina je: C16:0, C18:2, C18:1 i C:18:0.

Primenom multivarijantne analize ispitani su mnogi vidovi korelacija. Međutim, pokazano je da analizom dominantnih masnih kiselina nije moguće jasno razlikovati uzorke kora i sredina hleba prema rastućem sadržaju heljdinog brašna, upotrebljenog u njihovoj proizvodnji (Ačanski et al., 2015e; Ačanski et al., 2015f).

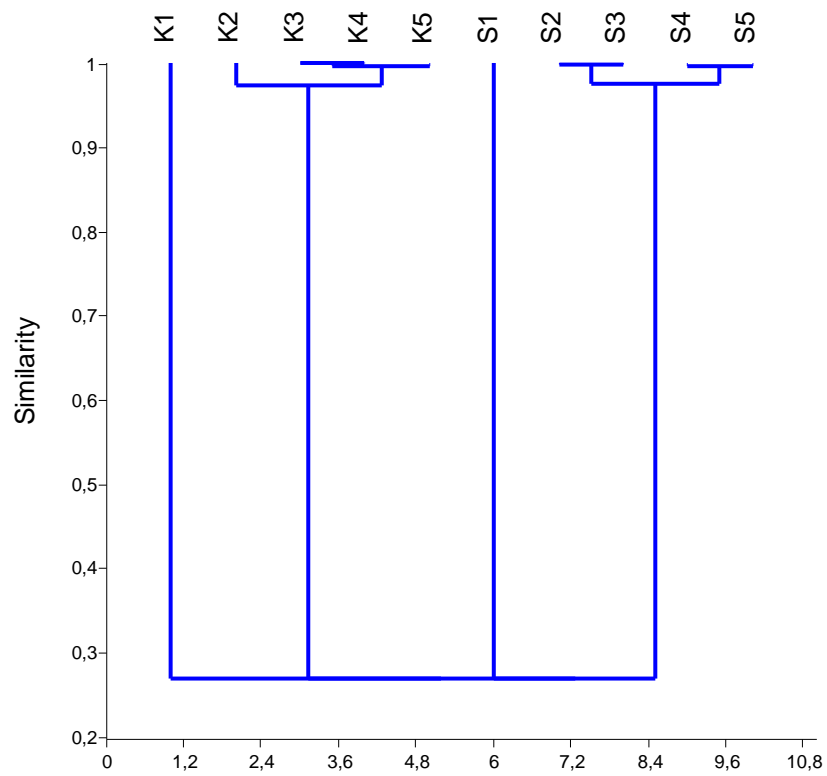
IV-B-2.2. Korelacije metil-estara minornih masnih kiselina u kori i sredini hleba

Sastav i sadržaj minornih masnih kiselina različitih tipova heljde karakteriše prisustvo eikozanske (arahidinske, C20:0), eikozenske (C20:1) i dokozanske (behenske, C22:0) masne kiseline.

Jonski hromatogrami kora i sredina analiziranih uzoraka hleba ekstrahovani su sa hromatograma ukupne jonske struje (TIC) izolovanjem signala jona 74 m/z , karakterističnog za metil-estre masnih kiselina. Na slikama XXVIII i XXIX u Prilogu 2 na stranama xx i xxi, prikazani su preklopljeni jonski hromatogrami liposolubilnih ekstrakata kora i sredina pet analiziranih uzoraka proizvedenog hleba. Slike XXVIII-A i XXIX-A prikazuju dobijene hromatograme počevši od 7 minute elucije. Može se uočiti da dominantne masne kiseline eluiraju između 13.00 min i 15.00 min, i to sledećim redosledom: palmitinska (C16:0), linoleinska (C18:2), oleinska (C18:1) i stearinska (C18:0). Metil-estri karakterističnih minornih masnih kiselina eluiraju sledećim redosledom: eikozenska (C20:1), eikozanska (C20:0) i dokozanska (C22:0). Slike XXVIII-B i XXIX-B prikazuju uvećano područje jonskih hromatograma, na kom eluiraju karakteristične minorne masne kiseline, detektovane u liposolubilnim ekstraktima kora i sredina uzoraka hleba (Ačanski et al., 2015e).

Sa prikazanih hromatograma može se uočiti da su sličnosti između kora i sredina analiziranih uzoraka hleba veoma velike. Integrisani su pikovi metil-estara isključivo minornih masnih kiselina, a numeričke vrednosti njihovih površina podvrgnute su multivarijantnoj analizi. Multivarijantna analiza je pogodna za brzo detektovanje fundamentalnih razlika između analiziranih uzoraka, pri čemu se uspešno isključuje primena analitičkih standarda i kalibracije. Na ovaj način se značajno pojednostavljuje analitička procedura. Ispitana je efikasnost različitih indeksa sličnosti, poput: *Manhattan*, *Rho*, *Horn* i *Euclidean*, ali se definitivno može zaključiti da *Correlation* indeks sličnosti omogućava najjasnije razlikovanje među analiziranim uzorcima, primenom ovog analitičkog pristupa. Uz primenu algoritma *Single Linkage* dobija se visoka vrednost kofenetičkog koeficijenta korelacije (0,9028), što ukazuje na verodostojnost prikazanog dendrograma.

Slika 35 prikazuje dendrogram korelacije metil-estara karakterističnih minornih masnih kiselina kora i sredina svih analiziranih uzoraka hleba. Očigledno je da se uzorci kore i sredine hleba proizvedeni od čistog pšeničnog brašna (K1 i S1) mogu jasno razdvojiti od uzoraka kora i sredina hleba proizvedenih mešanjem brašna pšenice i heljde. Ovi uzorci pokazuju veliku međusobnu sličnost, $y > 0,95$ (Ačanski et al., 2015f; Ačanski et al., 2015g).



Slika 35. Dendrogram korelacija metil-estara minornih masnih kiselina kora (K) i sredina hleba (S) proizvedenog zamenom pšeničnog brašna heljdinim (oznake 1, 2, 3, 4, 5 sadrže redom 0, 20, 40, 50 i 60% brašna heljde)

IV-B-3. Korelacije hidrosolubilnih komponenata

IV-B-3.1. Korelacije hidrosolubilnih komponenata kora hleba

Kao što je opštepoznato iz pekarske industrije, kora hleba je slađeg ukusa u poređenju sa sredinom hleba.

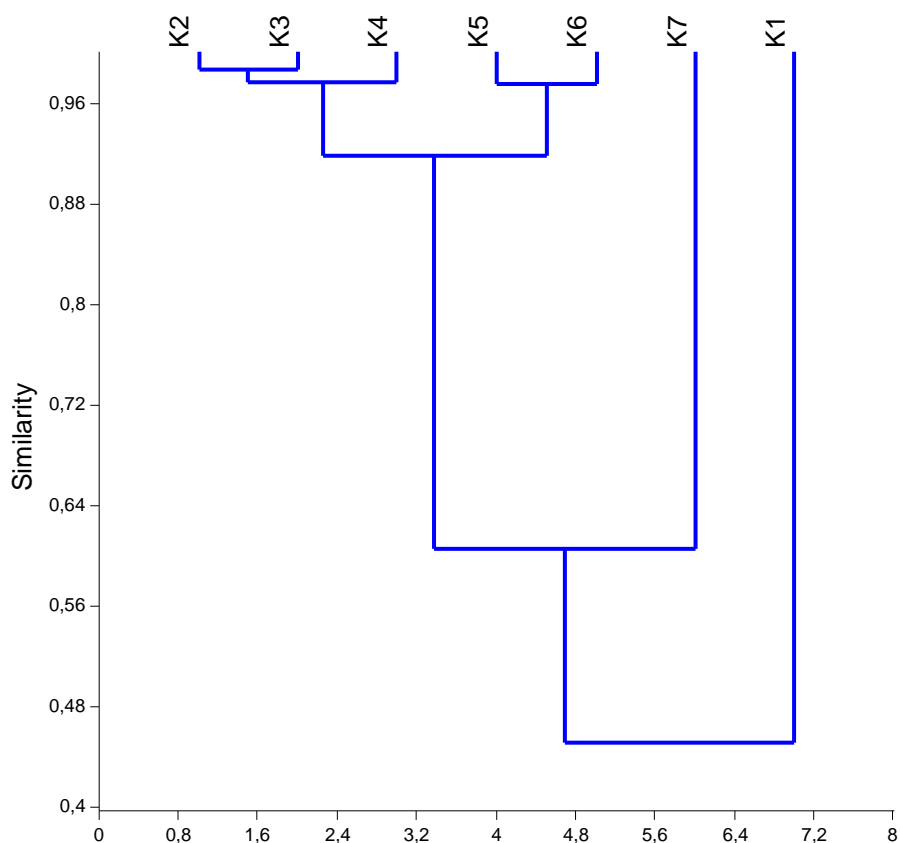
Dobijeni hromatogrami ukupne jonske struje (TIC) sedam ispitivanih uzoraka proizvedenog hleba prikazani su na slici XXX, u Prilogu 2 na strani xxii.

Detaljna analiza hromatograma i masenih spektara uzoraka K1-K7 (slika 3, strana 57), urađena je primenom programa AMDIS (Version 2.66) i NIST-MS Search (Version 2.0), kao i biblioteke masenih spektara NIST08. AMDIS program ima poseban algoritam za izdvajanje masenih spektara iz hromatograma. Sem ugljenih hidrata (pentoza, heksoza, disaharida, inozitola i slično) identifikovano je još nekoliko heterocikličnih jedinjenja. Poznato je da su ona nosioci aromatičnih svojstava gotovih proizvoda, koja su prošla termičku obradu. Kako se pšenično brašno i heljdino brašno veoma razlikuju očekivano je da *Maillard*-ovom reakcijom nastaju takva jedinjenja, koja ih još dodatno razlikuju. Zbog toga je odlučeno da se za multivarijantnu analizu uzoraka, osim ugljenih hidrata i njihovih alkohola, uzmu u obzir i heterociklična jedinjenja. Od ranije je poznato da su mase 73 m/z , 204 m/z i 217 m/z karakteristične za silirane derivate ugljenih hidrata, njihovih alkohola, ali takođe i pojedinih heterocikličnih jedinjenja. Zato su te mase ponovo korišćene u identifikaciji nabrojanih jedinjenja.

Deo postupka je prikazan na slici XXXI, u Prilogu 2, na strani xxiii. Izdvojene su mase 73 m/z , 204 m/z i 217 m/z , a maseni spektri određenog pika analizirani su samo u slučaju kada on sadrži kombinaciju jona 73 m/z sa jonima 204 m/z i 217 m/z . Na donjem delu slike je maseni spektar koji odgovara piku na 13.048 min i on je bibliotečki proveren.

Jonski hromatogrami selektovanih jona 73 m/z , 204 m/z i 217 m/z svih sedam ispitivanih uzoraka proizvedenog hleba sa slike 3, prikazani su na slici XXXII, u Prilogu 2, na strani xxiv.

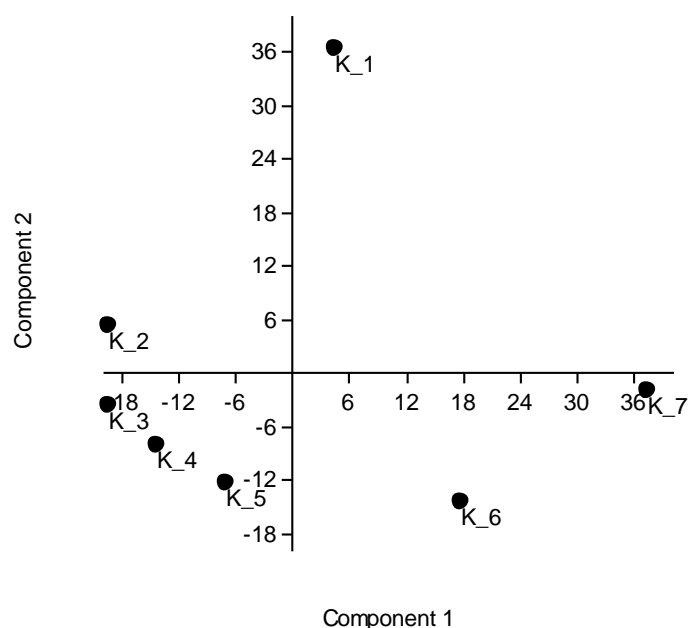
Kada se eksperimentalni podaci podvrgnu multivarijantnoj statističkoj obradi dobijaju se dendrogram i PCA dijagram. Slika 36 prikazuje dendrogram korelacije hidrosolubilnih komponenata analiziranih 7 uzoraka kora proizvedenog hleba.



Slika 36. Dendrogram korelacija ugljenohidratnih komponenata kora 7 uzoraka hleba (K1-K7, slika 3) proizvedenog zamenom pšeničnog brašna heljdinim (oznake 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sadrže redom 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% brašna heljde)

Na dendrogramu se uočavaju dve osnovne grane: grana K1 (čisto pšenično brašno) i grana 2, koja se deli na K7 (čisto heljdino brašno) i preostali deo. Taj deo predstavlja kombinacije pšeničnog i heljdinog brašna, K2-K6 sa 20%, 40%, 50%, 60%, 80% brašna heljde u formulaciji. Vrednosti međusobne sličnosti analiziranih uzoraka na y-osi pokazuju da je ovaj pristup pogodan za razlikovanje navedenih prehrambenih artikala.

Slika 37 prikazuje PCA korelacione dijagrame 7 ispitivanih uzoraka hleba. Kao što se sa slike 37 vidi uzorci K1 i K7 su jasno razdvojeni. Ostali uzorci K2-K6, sa 20%, 40%, 50%, 60% i 80% brašna heljde u formulaciji, su udaljeni od njih i pravilno raspoređeni (Ačanski et al., 2015f; Psodorov et al., 2015a).



Slika 37. PCA dijagram kora svih 7 uzoraka hleba (K1-K7, slika 3) proizvedenog zamenom pšeničnog brašna heljdinim (oznake 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sadrže redom 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% brašna heljde)

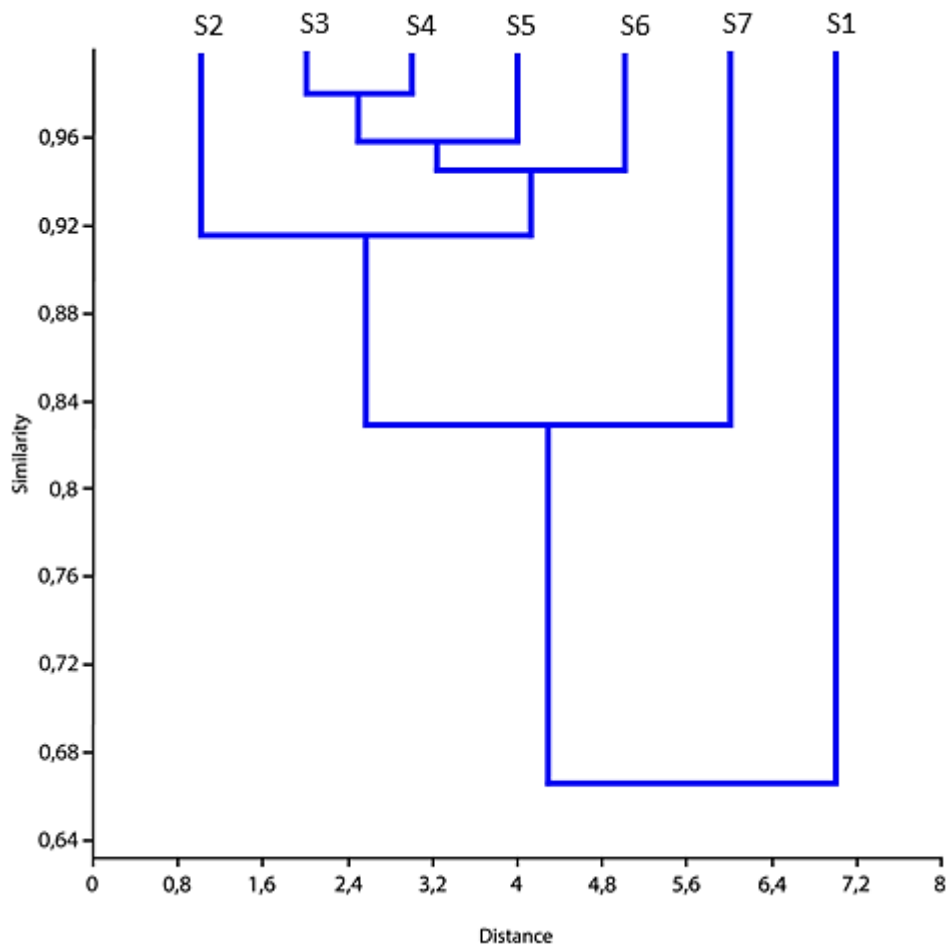
IV-B-3.2. Korelacije hidrosolubilnih komponenata sredina hleba

Slika XXXIII u Prilogu 2, strana xxv, prikazuje hromatograme ukupne jonske struje (TIC) sredine 7 analiziranih uzoraka hleba sa slike 3, strana 57. Kao i u prethodnim analizama (Ačanski i Vujić, 2014a) cilj ni sada nije bila detekcija novih komponenata, kao ni tačna kvantifikacija detektovanih. Sa prikazanih hromatograma izolovani su isključivo oni pikovi kod kojih je prisutna kombinacija jona $73 m/z$ sa jonima $204 m/z$ i $217 m/z$. Oni su analizirani primenom masenog spektrometra.

Posmatrajući hromatograme sa slike XXXIII u Prilogu 2, može se primetiti da je prilično komplikovano uočiti razlike između uzoraka hleba na ovaj način, pogotovo ako se u obzir uzmu i razlike u abundancama posmatranih hromatograma. Iz tog razloga, odlučeno je da se sa njih izoluju pikovi signala $73 m/z$, $204 m/z$ i $217 m/z$, i podvrgnu multivarijantnoj analizi. Pri tome je korišćeno 18 ugljenohidratnih varijabli, koje čine derivatizovani mono- i disaharidi, kao i njihovi alkoholi.

Na slici 38 je prikazan dendrogram korelacije ugljenohidratnih komponenata analiziranih sredina sedam proizvedenih uzoraka hleba sa slike 3, strana 57. Mogu se uočiti tri glavne

grane: grana S1 (uzorak hleba proizveden od čistog pšeničnog brašna), grana S7 (uzorak hleba proizveden od čistog heljdinog brašna), i ostatak koji sačinjavaju sredine uzoraka hleba proizvedenih od mešavina pšeničnog i heljdinog brašna u različitim odnosima. Vrednosti međusobne sličnosti analiziranih uzoraka, koje se mogu očitati sa y-ose, ukazuje na činjenicu da primena ovog pristupa može biti vrlo prikladna u razlikovanju analiziranih prehrambenih artikala (Psodorov et al., 2014; Ačanski et al., 2015f).



Slika 38. Dendrogram korelacija ugljenohidratnih komponenta sredina 7 uzoraka hleba (S1-S7, slika3) proizvedenog zamenom pšeničnog brašna heljdinim (oznake 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sadrže redom 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% brašna heljde)

V

**Tok buducih
istraživanja**

U poslednje dve decenije u razvijenim zemljama javlja se snažna tendencija usmerena ka prirodnoj, zdravstveno bezbednoj hrani, što zahvata i područje ulja i masti. Raznovrsna i kvalitetna hladno ceđena ulja u tom smislu mogu dati pun doprinos pravilnoj ishrani (Dimić, 2005). Predstavljen pristup primene GC-MS sistema i multivarijantne analize, uz određene modifikacije u skladu sa prirodom uzorka, primenjen je i u analizi autentičnosti i određivanju botaničkog porekla različitih uzoraka biljnih ulja. Analizirani uzorci ulja obuhvataju hladno presovana, devičanska, ekstra devičanska i rafinisana ulja, različitih vrsta uljarica i različitih proizvođača, dostupnih na tržištu Republike Srbije. Uzorci su dobijeni sa Odeljenja za uljarice na Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, kao i sa Katedre za inženjerstvo konzervisane hrane Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Multivarijantna analiza numeričkih matrica primenjena je sa ciljem: (i) određivanja stepena homogenosti među analiziranim uzorcima ulja, i (ii) ispitivanja mogućnosti određivanja njihove autentičnosti i razlikovanja prema odgovarajućem botaničkom poreklu.

U istraživanjima je uočen visok stepen sličnosti masno-kiselinskih profila uzoraka hladno presovanih ulja u okviru iste biljne vrste, bez obzira na genotip biljke od koje je ulje proizvedeno ili vrste proizvođača. To dalje daje mogućnost za razlikovanje uzoraka ulja prema botaničkom poreklu. Ispitana je homogenost uzoraka hladno presovanih ulja: lana (*Linum usitatissimum* L.); različitih uzoraka ekstra-devičanskog maslinovog ulja italijanskog porekla dostupnih na tržištu Republike Srbije; i hladno presovanog ulja koštica crnog i belog grožđa (*Vitis vinifera* L.) (Ačanski et al., 2016c; 2016d; 2016e; 2017c; 2017e). Dokazana je mogućnost razlikovanja: ekstra devičanskog maslinovog ulja (*Olea europaea* L.) i uzoraka hladno presovanog i rafinisanog suncokretovog ulja (*Helianthus annuus* L.); uzoraka ekstra devičanskog ulja masline (*Olea europaea* L.) i uzoraka hladno presovanog ulja različitih genotipova šafranjike (*Carthamus tinctorius* L.); uzoraka hladno presovanog ulja semena suncokreta (*Helianthus annuus* L.) i hladno presovanog ulja koštica grožđa (*Vitis vinifera* L.); uzoraka hladno presovanog ulja semena suncokreta (*Helianthus annuus* L.) od uzorka hladno presovanog ulja badema (*Prunus amygdalus* L.) i hladno presovanog ulja semena lana (*Linum usitatissimum* L.) (Ačanski et al., 2016e; 2016f; 2016g; 2017d, 2017e; Pastor et al., 2016d). Prikazana je i primena semi-kvantitativnog GC-MS pristupa u razlikovanju uzoraka hladno presovanog ulja šireg spektra botaničkih vrsta: šafranjika (*Carthamus tinctorius* L.), lan (*Linum usitatissimum* L.), tikva (*Cucurbita pepo* L.), susam (*Sesamum indicum* L.), lanik (*Camelina sativa* L. Crantz), bamija (*Abelmoschus esculentus* L. Moench), krtičnjak (carevac) (*Euphorbia lathyris* L.), čubar (*Satureja hortensis* L.), bela slačica (*Sinapis alba* L.) (Ačanski et al., 2017f). Velika sličnost uočena je između uzoraka hladno presovanih ulja semena lana, lanika i čubara. Uzorci hladno presovanih ulja semena tikve i susama, takođe, se grupišu zajedno, pokazujući pri tome visoki stepen sličnosti masno-kiselinskog sastava. Uzorak hladno presovanog ulja krtičnjaka se potpuno izdvaja i jasno razlikuje od uzoraka ulja svih ostalih analiziranih biljnih vrsta. Posebno treba naglasiti da ovo ulje predstavlja jedino nejestivo i toksično ulje, među analiziranim uzorcima.

VI

Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je mogućnost razlikovanja brašna cerealija, a to su strna žita (pšenica, spelta, ječam, raž, tritikale, ovas) i prosoliko žito (kukuruz), kao i pseudocerealija (heljde i amarantusa). U cilju analize primenjen je sistem gasne hromatografije sa maseno-spektrometrijskom detekcijom (GC-MS) u kombinaciji sa savremenim metodama statističke obrade podataka - multivarijantnom analizom. Takođe, ispitana je i mogućnost određivanja udela heljdinog brašna u kori i sredini proizvedenog hleba, gde je pšenično brašno zamenjeno sa 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% heljdinog brašna. Na osnovu eksperimentalnih rezultata, došlo se do sledećih zaključaka:

- Analizom liposolubilnih (heksanskih) ekstrakata, moguće je uspešno razlikovanje brašna cerealija i pseudocerealija, kao i određivanje sastava binarnih smeša brašna u gotovom pekarskom proizvodu – hlebu. Za derivatizaciju ekstrahovanih lipida preporučuje se primena reagensa trimetilsulfonijum-hidroksida (TMSH, 0,2 M u metanolu). Posebna pogodnost je što se transesterifikacija triacilglicerola u isparljive metil-estre masnih kiselina postiže direktno u injektoru gasnog hromatografa. Time se izbegava laboratorijska priprema ovih derivata.
- Analizom hidrosolubilnih (etanolnih) ekstrakata, takođe je moguće uspešno razlikovanje brašna cerealija i pseudocerealija, kao i određivanje sastava binarnih smeša brašna u gotovom pekarskom proizvodu – hlebu. Kao reagensi za derivatizaciju ekstrahovanih prostih šećera u trimetilsilil-etre uspešno se mogu koristiti trimetilsilil-imidazol (TMSI) i N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamid (BSTFA).
- GC-MS analizom liposolubilnih ekstrakata brašna cerealija i pseudocerealija dobija se karakterističan tip hromatograma za sve uzorke, na kojem se uočavaju tri dela. U prvom delu hromatograma nalaze se metil-estri minornih masnih kiselina. U drugom delu hromatograma, koji čini i najveći deo površine hromatograma, nalaze se metil-estri dominantnih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma u molekulu. Na trećem delu hromatograma, koji je od posebnog interesa, nalaze se metil-estri masnih kiselina sa više od 18 ugljenikovih atoma u molekulu i neosapunjive materije (fitosteroli, tokoferol i skvalen).
- GC-MS analizom hidrosolubilnih ekstrakata brašna cerealija i pseudocerealija postignuto je adekvatno razdvajanje šećernih komponenata. Prosti šećeri odlikuju se sličnim strukturama i mnoštvom izomera po svakom tipu šećera, te su njihove molekulske fragmentacije vrlo slične. Najzastupljenije identifikovane komponente hidrosolubilnih ekstrakata uključuju pentoze i pentitole, heksoze i heksitole, kao i pojedine disaharide.
- Multivarijantnom analizom integrisanih površina identifikovanih pikova liposolubilnih i hidrosolubilnih komponenata sa hromatograma ukupne jonske struje, uvrđen je stepen homogenosti profila liposolubilnih i hidrosolubilnih komponenata različitih genotipova heljde, ječma, ovsa, kukuruza i pšenice. Multivarijantnom analizom je pokazano da ispitivane vrste pseudocerealija i cerealija pokazuju viši stepen homogenosti profila liposolubilnih komponenata, u odnosu na hidrosolubilne, u okviru iste biljne vrste.

- Sa hromatograma ukupne jonske struje, selektovanjem karakterističnog fragmentnog jona *McLafferty*-jevog premeštanja 74 m/z , dobijaju se pojednostavljeni jonski hromatogrami liposolubilnih komponenata.
- Sa hromatograma ukupne jonske struje, selektovanjem karakterističnih fragmentnih jona 73 m/z (tipičan za sve silirane komponente), 204 m/z (tipičan za glukopiranozne jedinice), 217 m/z (tipičan za fruktofuranozne jedinice) i 361 m/z (tipičan za disaharide), dobijaju se pojednostavljeni jonski hromatogrami prostih šećera.
- U cilju razlikovanja uzoraka brašna genotipova cerealija i pseudocerealija primenjen je pristup formiranja binarnih matrica na osnovu detektovanih komponenata liposolubilnih i hidrosolubilnih ekstrakata na hromatogramima ukupne jonske struje. Komponente su identifikovane primenom masene spektrometrije. Kod binarnih matrica, oznaka „1“ se odnosi na prisustvo određene komponente, a oznaka „0“ na odsustvo određene komponente.
 - 1) Multivarijantnom analizom binarnih matrica liposolubilnih komponenata može se razlikovati brašno botaničkih vrsta cerealija (pšenice, spelte, raži, tritikalea, ječma, ovsu i kukuruza) od brašna pseudocerealija (heljde i amarantusa). Takođe, u okviru grupe cerealija, moguće je jasno razlikovanje uzoraka brašna nekih genotipova strnih žita (pšenice, raži, tritikalea, ječma, ovsu) od uzoraka brašna ispitivanih genotipova spelte, kao i od uzoraka brašna prosolikog žita – hibrida kukuruza.
 - 2) Multivarijantnom analizom binarnih matrica hidrosolubilnih komponenata može se razlikovati brašno botaničkih vrsta cerealija: brašno strnih žita (pšenice, raži, tritikalea, ječma, ovsu) od brašna prosolikog žita (hibrida kukuruza).
 - 3) Multivarijantnom analizom binarnih matrica odabranih hidrosolubilnih komponenata, kao bitnih faktora razlikovanja, može se razlikovati brašno botaničkih vrsta strnih žita: pšenice, raži i njihovog hibrida, tritikalea.
- U cilju razlikovanja uzoraka brašna genotipova cerealija i pseudocerealija primenjen je i pristup formiranja numeričkih matrica, integracijom pikova odabranih detektovanih komponenata liposolubilnih i hidrosolubilnih ekstrakata, bez njihove identifikacije. Komponente od interesa su odabrane izolovanjem karakterističnih jona sa hromatograma ukupne jonske struje: jona *McLafferty*-jevog premeštanja 74 m/z (u slučaju lipidnih komponenata) i jona 73 m/z , 204 m/z , 217 m/z i 361 m/z (u slučaju prostih šećera).
 - 1) Multivarijantnom analizom numeričkih matrica komponenata liposolubilnih ekstrakata, koje sadrže karakterističan jon 74 m/z , moguće je razlikovati uzorke brašna cerealija: genotipove strnih žita (pšenice, raži, tritikalea, ječma, ovsu) od ispitivanih genotipova prosolikog žita (hibrida kukuruza). Takođe, na ovaj način je moguće razlikovati i brašno ovsu od brašna ostalih uzoraka strnih žita (pšenice, raži, tritikalea i ječma).
 - 2) Multivarijantnom analizom numeričkih matrica komponenata hidrosolubilnih ekstrakata, koje sadrže karakteristične jone 73 m/z , 204 m/z , 217 m/z i 361 m/z ,

moguće je razlikovati uzorke brašna cerealija: genotipove strnih žita (pšenice, raži, tritikalea, ječma, ovsa) od ispitivanih genotipova prosolikog žita (hibrida kukuruza).

- Primenom različitih analitičkih pristupa, opisanih u ovoj doktorskoj disertaciji, moguće je pouzdano odrediti autentičnost uzoraka brašna različitih botaničkih vrsta cerealija i pseudocerealija, multivarijantnom analizom profila liposolubilnih i hidrosolubilnih komponenata. Međutim, mora se naglasiti da je, u okviru grupe strnih žita, moguće pouzdano odrediti autentičnost samo brašna ovsa, dok se ostala strna žita (pšenica, ječam, raž i tritikale) ne razdvajaju u potpunosti.
- Mogućnost određivanja autentičnosti uzoraka brašna cerealija (genotipova strnih žita i hibrida kukuruza), ispitana je i primenom svetlosne i skenirajuće elektronske mikroskopije. Zaključeno je da se karakterizacijom skrobnih granula vrlo teško mogu razlikovati analizirani uzorci brašna cerealija.
- Primenom GC-MS sistema moguće je ustanoviti sadržaj heljdinog brašna u hlebu, proizvedenom od kontrolnih mešavina pšeničnog i heljdinog brašna u različitim odnosima, na dva načina:
 - 1) Multivarijantnom analizom površina dominantnih i minornih masnih kiselina iz uzoraka kore i sredine hleba.
 - 2) Multivarijantnom analizom površina prostih šećera (monosaharida, šećernih alkohola, disaharida) iz uzoraka kore i sredine hleba.

Najbolje razvrstavanje uzoraka, prema rastućem sadržaju brašna heljde u formulaciji, postignuto je multivarijantnom analizom šećernih komponenata iz uzoraka kore hleba.

- Pristup, koji podrazumeva primenu GC-MS sistema u kombinaciji sa multivarijantnom analizom, može se primeniti i u određivanju autentičnosti uzoraka biljnih hladno presovanih, devičanskih, ekstra devičanskih i rafiniranih ulja. Uzorci ulja su derivatizovani primenom rastvora TMSH (trimetilsulfonijum hidroksida, 0,2 M u metanolu). Dokazano je da je ispitivane uzorke ulja moguće razlikovati prema odgovarajućem botaničkom poreklu, potpuno nezavisno od načina proizvodnje ulja.

VII

Literatura

Abdi H., L.J. Williams (2010), Principal component analysis, Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, 2(4), 433–459.

Accum F. (1820), A treatise on adulterations of food and culinary poisons, Longman, London, UK.

Ačanski M.M., Dj.N.Vujić (2014a), Comparing sugar components of cereal and pseudo cereal flour by GC-MS analysis, Food Chemistry, 145, 743 – 748.

Ačanski M., G. Bekavac, Đ. Vujić, K. Pastor (2014b), GC-MS Analysis of fatty acids and non-saponifiable part of flour different maize hybrids, II International Congress *Food Technology, Quality and Safety*, Book of Abstracts, p.71, Novi Sad, Serbia, 28-30. Oktobar 2014.

Ačanski M., K. Pastor, R. Razmovski, S. Kravić, Đ. Psodorov, Đ. Vujić (2015a), Homogeneity of oil and sugar components of flour buckwheat investigated by GC-MS system and multivariate analysis, International Congress on Natural Science and Engineering, Conference Proceedings, Part 2, 403-410, Kyoto, Japan, 7-9. Maj.

Ačanski M., Dj. Vujić, Dj. Psodorov (2015b), Practical method for the confirmation of authentic flours of different types of cereals and pseudocereals, Food Chemistry, 172, 314-317.

Ačanski M., K. Pastor, Đ. Vujić, G. Bekavac (2015c), Analysis of hexane extracts of corn hybrids, Journal on Processing and Energy in Agriculture, 19(3), 143-146.

Ačanski M., K. Pastor, L. Pezo, Đ. Vujić (2015d), Primena binarnog sistema u multivarijantnoj analizi heksanskih ekstrakata cerealija i pseudocerealija, 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Conference Proceedings, p.108, Novi Sad, Serbia, 29-30. Maj.

Ačanski M., K. Pastor, Đ. Psodorov, S. Kravić, R. Razmovski, Đ. Vujić (2015e), Određivanje sadržaja heljde u hlebu analizom metil estara dominantnih masnih kiselina, XX Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova 20(22), 335-340, Čačak, Srbija.

Ačanski M., K. Pastor, Đ. Psodorov, R. Razmovski, Đ. Vujić (2015f), New methods for rapid estimation of buckwheat flour content in bread/Nove metode za brzo određivanje sadržaja heljadinog brašna u hlebu, Osmi naučno-stručni skup *InterRegio Sci 2015*, Novi Sad, Serbia, 17. Decembar.

Ačanski M., K. Pastor, Đ. Psodorov, Đ. Vujić, R. Razmovski, S. Kravić (2015g), Determination of the presence of buckwheat flour in bread by the analysis of minor fatty acid methyl esters, Advanced technologies, 4(2), 86-92.

Ačanski M., K. Pastor, Đ. Vujić (2016a), Authenticity of lipid and soluble sugar profiles of various oat cultivars (*Avena Sativa*), 18th International Congress on Engineering, Technology, and Sciences, World Academy of Science, Engineering and Technology (WASET), Conference Proceedings, 1918-1923, Miami, USA, 24-25. Mart 2016.

Ačanski M., R. Razmovski, K. Pastor (2016b), A novel GC/MS method for rapid differentiation of cereal and pseudocereal species, 2nd General Meeting of COST Action FA1306: *The quest for tolerant varieties – Phenotyping at plant and cellular level*, PhenomenAll, p.96, Copenhagen, Denmark, 18-20. April.

Ačanski M., A. Marjanović-Jeromela, V. Vujasinović, K. Pastor, S. Dojčinović-Vujašković, Đ. Vujić, V. Filipović (2016c), Homogeneity of oil samples from different linseed cultivars, III International Congress *Food Technology, Quality and Safety*, Book of Abstracts, p. 46, Novi Sad, Serbia, 25-27. Oktobar.

Ačanski M., E. Dimić, V. Vujasinović, K. Pastor, J. Suđi, Đ. Vujić, B. Marić (2016d), Homogeneity of the samples of extra-virgin olive oil on the Serbian market, *Production and Processing of Oilseeds*, Proceedings of the 57th Oil Industry Conference, 115-121, Herceg Novi, Montenegro, 19-24. Jun.

Ačanski M., V. Vujasinović, K. Pastor, J. Suđi, S. Dojčinović-Vujašković, Đ. Vujić, A. Marjanović-Jeromela (2016e), Brza metoda za određivanje homogenosti i autentičnosti uzoraka ekstra-devičanskog maslinovog ulja i ulja šafranjike/Rapid method for determining homogeneity and authenticity of samples of extra-virgin olive oil and safflower oil, *Uljarstvo*, 47(1), 3-9.

Ačanski M., E. Dimić, V. Vujasinović, K. Pastor, J. Suđi, Đ. Vujić, B. Marić (2016f), Distinguishing extra-virgin olive oil from sunflower oil using a new method, III International Congress *Food Technology, Quality and Safety*, Book of Abstracts, p. 45, Novi Sad, Serbia, 25-27. Oktobar.

Ačanski M., A. Marjanović-Jeromela, V. Vujasinović, K. Pastor, S. Dojčinović-Vujašković, Đ. Vujić, V. Filipović (2016g), A new method for olive oil and safflower oil differentiation, *Production and Processing of Oilseeds*, Proceedings of the 57th Oil Industry Conference, 121-129, Herceg Novi, Montenegro, 19-24. Jun.

Ačanski M., K. Pastor, A. Kondić-Špika (2017a), Chemometric discrimination of high- from low-lipid wheat cultivars using GC/MS data, COST WG1/EPPN2020 Workshop: Current and future applications of phenotyping for plant breeding, Novi Sad, Srbija, 29-30. Septembar.

Ačanski M., K. Pastor (2017b), Uticaj botaničkog porekla na lipidne profile različitih poljoprivrednih kultura – Temelj za razvoj metoda kontrole kvaliteta mešanih brašna, Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, u štampi.

Ačanski M., V. Vujasinović, K. Pastor, Đ. Vujić, J. Sudi, S. Dojčinović-Vujašković (2017c), Analiza hladno presovanog ulja koštica belog i crnog grožđa primenom nove GC-MS metode/Applying a new GC-MS method in the analysis of white and red grape seed cold-pressed oils, *Production and Processing of Oilseeds*, Proceedings of the 58th Oil Industry Conference, 235-241, Herceg Novi, Montenegro, 18-23. Jun.

Ačanski M., E. Dimić, K. Pastor, Đ. Vujić, S. Dojčinović-Vujašković, J. Sudi (2017d), Investigation of similarity between sunflower and grape seed cold-pressed oils using multivariate analysis, 58th Conference: *Production and processing of oilseeds*, Proceedings, 227-235, Herceg Novi, Montenegro, 18-23. June.

Ačanski M., E. Dimić, K. Pastor, V. Vujasinović, Đ. Vujić, J. Sudi, S. Dojčinović-Vujašković (2017e), Primena multivarijantne analize u ispitivanju sličnosti hladno presovanih ulja suncokreta i koštica belog i crnog grožđa, Uljarstvo, u štampi.

Ačanski M., K. Pastor, A. Marjanović-Jeromela (2017f), Classification of various cold-pressed plant oils using a new semi-quantitative analytical approach, 3rd General Meeting of COST Action FA1306: *The quest for tolerant varieties – Phenotyping at plant and cellular level*, Field phenotyping technologies from woody perennials to annual crops, p.32, Lisabon, Portugal, 27-29. Mart.

Ali Karrar E.M. (2014), A review on: Antioxidant and its impact during the bread making process, *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(6), 592-596.

Alvarez-Jubete L., E.K. Arendt, E. Gallagher (2009), Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 240-257.

Alvarez-Jubete L., E.K. Arendt, E. Gallagher (2010a), Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients, *Trends in Food Science & Technology*, 21, 106-113.

Alvarez-Jubete L., H. Wijngaard, E.K. Arendt, E. Gallagher (2010b), Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking, *Food Chemistry*, 119, 770-778.

An, X.L., Q.Y. Li, Y.M. Yan, Y.H. Xiao, S.L.K. Hsam, F.J. Zeller (2005), Genetic diversity of European spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp *spelta* L. em. Thell.) revealed by glutenin subunit variations at the Glu-1 and Glu-3 loci, *Euphytica*, 146(3), 193-201.

Anglioni A., C. Collar (2011), Nutritional and functional added value of oat, Kamut, spelt, rye and buckwheat versus common wheat in breadmaking, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1283-1292.

Aparicio R., Aparicio-Ruiz R. (2002), Chapter 7: Chemometrics as an aid in authentication, in: *Oils and fats authentication*, Michael Jee (Ed.), Blackwell publishing, Oxford, UK, pp. 156-180.

Arendt E., E. Zannini (2013), *Cereal grains for the food and beverage industries*, Woodhead Publishing, Elsevier, Cambridge, UK.

Ares G. (2014), Cluster Analysis: Application in Food Science and Technology, in: *Mathematical and statistical methods in food science and technology*, Granato D., G. Ares (Eds.), First Edition, Wiley, Chichester, UK, pp. 103-121.

Armanino C., R. Acutis, M.R. Festa (2002), Wheat lipids to discriminate species, varieties, geographical origins and crop years, *Analitica Chimica Acta*, 454, 315–326.

Azevedo M.S., S.K.T. Seraglio, G. Rocha, C.B. Balderas, M. Piovezan, L.V. Gonzaga, D.B. Falkenberg, R. Fett, M.A.L. de Oliveira, A.C.O. Costa (2017), Free amino acid determination by GC-MS combined with a chemometric approach for geographical classification of bracatinga honeydew honey (*Mimosa scabrella* Bentham), *Food Control*, 78, 383-392.

Barthole G., L. Lepiniec, P.M. Rogowsky, S. Baud (2012), Controlling lipid accumulation in cereal grains, *Plant Science*, 185-186, 33-39.

Belton P. and J. Taylor (2002), *Pseudocereals and Less Common Cereals - Grain Properties and Utilization Potential*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.

Beltrán A., M. Ramos, N. Grané, M.C. Garrigos (2011), Monitoring the oxidation of almond oils by HS-SPME-GC-MS and ATR-FTIR: Application of volatile compounds determination to cultivar authenticity, *Food Chemistry*, 126, 603–609.

Betoret E., N. Betoret, D. Vidal and P. Fito (2011), Functional foods development: Trends and technologies, *Trends in Food Science & Technology*, 22, 498-508.

Berghofer E., R. Schoenlechner (2002), Chapter 7: Grain Amaranth, in: Pseudocereals and Less Common Cereals - Grain Properties and Utilization Potential (Peter S. Belton, John R.N. Taylor, Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 219-260.

Biacs P., E. Aubrecht, I. Leder, J. Lajos (2002), Chapter 4 – Buckwheat, in: Pseudocereals and Less Common Cereals - Grain Properties and Utilization Potential (Peter S. Belton, John R.N. Taylor, Eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 123-151.

Bilgiçli N. (2009), Effect of buckwheat flour on chemical and functional properties of tarhana, *Food Science and Technology-LWT*, 42, 514-518.

Bock M.A. (2000), Chapter 15: Minor Constituents of Cereals, in: K. Kulp, J.G. Ponte (Eds.) *Handbook of Cereal Science and Technology* (Second Edition), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 479-504.

Bonaduce I., M.P. Colombini (2004), Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures, *Journal of Chromatography A*, 1028, 297–306.

Bonafaccia G., I. Kreft (1994), Technological and qualitative characteristics of food products made with buckwheat, *Fagopyrum*, 14, 35-42.

Bonafaccia G., M. Marocchini, I. Kreft (2003), Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat, *Food Chemistry*, 80, 9-15.

Bönick J., G. Huschek, H.M. Rawel (2017), Determination of wheat, rye and spelt authenticity in bread by targeted peptide biomarkers, *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 82-91.

Borras E., J. Ferre, R. Boque, M. Mestres, L. Acena, O. Busto (2015), Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment - A review, *Analytica Chimica Acta*, 891, 1-14.

Bradbury A. (1990), Gas chromatography of carbohydrates in food, in: *Principles and applications of gas chromatography in food analysis*, Gordon M.H. (Ed.), Ellis Horwood Series, Chichester, UK, pp. 111-144.

Brennan C.S., L.J. Cleary (2005), The potential use of cereal (1/3,1/4)-b-D-glucans as functional food ingredients, *Journal of Cereal Science*, 42, 1–13.

Bruni R., A. Medici, A. Guerrini, S. Scalia, F. Poli, M. Muzzoli, G. Sacchetti (2001), Wild *Amaranthus caudatus* Seed Oil, a Nutraceutical Resource from Ecuadorian Flora, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5455–5460.

Butt M.S., M. Tahir-Nadeem, M.K.I. Khan, R. Shabir, M.S. Butt (2008), Oat: unique among the cereals, *European Journal of Nutrition* , 47, 68–79.

Cagliero C., C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, B. Sgorbini, E. Liberto (2012), Fast headspace-enantioselective GC-mass spectrometric-multivariate statistical method for routine authentication of flavoured fruit foods, *Food Chemistry*, 132, 1071–1079.

Certified reference materials for food authenticity, Joint Research Centre, European Commission, European Union, 2016.

CGPRDI (1983), Bread making, China Grain Products Research and Development Institute, Taipei, Taiwan, p.23.

Chanvrier H., P. Colonna, G.D. Valle, D. Lourdin (2005), Structure and mechanical behaviour of corn flour and starch–zein based materials in the glassy state, *Carbohydrate Polymers*, 59, 109–119.

Charalampopoulos D., R. Wang, S.S. Pandiella, C. Webb (2002), Application of cereals and cereal components in functional foods: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 131– 141.

Cheewapramong P. (2007), Use of Near-Infrared Spectroscopy for Qualitative and Quantitative Analyses of Grains and Cereal Products, Doktorska disertacija, Faculty of The Graduate College at the University of Nebraska, Lincoln, USA.

Cheruvanky R. (2003), Chapter 17: Phytochemical products: rice bran, in: *Phytochemical functional foods* (I. Johnson, G. Williamson, Eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 347-376.

Codex Alimentarius Commission (1997), Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Report of the twentieth session of the codex committee on nutrition and foods for special dietary uses, 22nd session, 23-28. June, Geneva, Switzerland.

Codex Alimentarius International Food Standards (1999), Recommended methods of analysis and sampling CODEX STAN 234-1999, Adopted in 1999, Food and Agriculture Organization and World Health Organization, 1-64.

Codex Alimentarius Commission (2000), Draft revised standard for gluten free foods (CX/NFSDU 98/4). In Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, 22nd session, Berlin, Germany.

Codex Alimentarius Commission (2007), Food Labelling (Fourth Edition), World Health Organization and Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Consensus Document (1999): Scientific Concepts of Functional Foods in Europe, *British Journal of Nutrition*, 81, 1-27.

Corrado G. (2016), Advances in DNA typing in the agro-food supply chain, *Trends in Food Science & Technology*, 52, 80-89.

Cuadros-Rodríguez L., C. Ruiz-Samblas, L. Valverde-Som, E. Perez-Castano, A. Gonzalez-Casado (2016), Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food 'identification' and food authentication - A tutorial, *Analytica Chimica Acta*, 909, 9-23.

Cubadda R., E. Marconi (2002), Chapter 5: Spelt Wheat, in *Pseudocereals and Less Common Cereals - Grain Properties and Utilization Potential* (Peter S. Belton, John R.N. Taylor), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 153 – 175.

Cubero-Leon E., R. Peñalver, A. Maquet (2014), Review on metabolomics for food authentication, *Food Research International*, 60, 95-107.

Cuevas F.J., G. Pereira-Caro, J.M. Moreno-Rojas, J.M. Muñoz-Redondo, M.J. Ruiz-Moreno (2017), Assessment of premium organic orange juices authenticity using HPLC-HR-MS and HS-SPME-GC-MS combining data fusion and chemometrics, *Food Control*, 82, 203-211.

Danezis G.P., A.S. Tsagkaris, F. Camin, V. Brusic, C. A. Georgiou (2016a), Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches, *Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132.

Danezis G.P., A.S. Tsagkaris, V. Brusic, C.A. Georgiou (2016b), Food authentication: state of the art and prospects, *Current Opinion in Food Science*, 10, 22–31.

Darvey N.L., H. Naeem (2000), Chapter 9: Triticale, Production and Utilization, in: *Handbook of Cereal Science and Technology*, second edition, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 257-274.

De Lima Morais da Silva P., L.S. de Lima, I.K. Caetano, Y.R. Torres (2017), Comparative analysis of the volatile composition of honeys from Brazilian stingless bees by static headspace GC–MS, *Food Research International*, u štampi.

Delcour J.A., R.C. Hoseney (2010), *Principles of Cereal Science and Technology*, Third Edition, AACC International, St. Paul, Minnesota, USA.

Derndorfer E., A. Baierl (2014), Multidimensional scaling (MDS), in: *Mathematical and statistical methods in food science and technology*, Granato D., G. Ares (Eds), Wiley, Chichester, UK, pp. 175-187.

Dimić E. (2005), *Hladno ceđena ulja*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.

Dinelli G., A. Segura-Carretero, R. Di Silvestro, I. Marotti, S. Fu, S. Benedettelli, L. Ghiselli, A. Fernandez Gutierrez (2009), Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216, 7229-7240.

Dinelli G., A. Segura-Carretero, R. Di Silvestro, I. Marotti, D. Arráez-Román, S. Benedettelli, L. Ghiselli, A. Fernandez-Gutierrez (2011), Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218 (42), 7670–7681.

Dunivannt F., J. Ginsbach (2011), *Gas Chromatography, Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry (Third Edition)*, Whitman College, Walla walla, WA, USA.

Đaković Lj. (1997), Pšenično brašno: Fizičko-hemijski osnovi određivanja tehnološkog kvaliteta pšeničnog brašna, *Zavod za tehnologiju žita i brašna, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija*.

Eiceman G. (2006), *Instrumentation of Gas Chromatography*, In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, A. Meyers (Ed.), John Wiley and Sons, New Jersey, USA, pp. 1–9.

Escuderos M.E. (2011), Olive Oil Aroma Evaluation By Gas Chromatographic Method: A Critical Review, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41, 70–80.

European Commission (2002), Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety, *Official Journal of the European Communities*, L31, 1-24.

European Commission (2011), Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, *Official Journal of the European Communities*, L304/18, 18-62.

European Commission (2014), Regulation 78/2014/EC of 22 November 2013 amending annexes II and III to Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council on the provision of food information to consumers, as regards certain cereals causing allergies or intolerances and foods with added phytosterols, phytosterol esters, phytostanols or phytostanol esters. *The Official Journal of the European Union*, L27, 7-8.

Escarnot E., J.-M. Jacquemin, R. Agneessens, M. Paquot (2012), Comparative study of the content and profiles of macronutrients in spelt and wheat, a review, *BASE*, 16(2), 243-256.

Fang G., J.Y. Goh, M. Tay, H.F. Lau, S.F. Li (2013), Characterization of oils and fats by ¹H NMR and GC/MS fingerprinting: Classification, prediction and detection of adulteration, *Food Chemistry*, 138, 1461–1469.

Füzfai Zs., I. Boldizsár, I. Molnár-Perl (2008), Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl–oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to iontrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1177, 183–189.

Gallagher E., T.R. Gormley, E.K. Arendt (2003), Crust and crumb characteristics of gluten-free breads, *Journal of Food Engineering*, 56, 153-161.

Gallagher E., T.R. Gormley, E.K. Arendt (2004), Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products, *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 143–152.

Gallo M., P. Ferranti (2016), The evolution of analytical chemistry methods in foodomics, *Journal of Chromatography A*, 1428, 3–15.

Gao L., W. Ma, J. Chen, K. Wang, J. Li, S. Wang, F. Bekes, R. Appels, Y. Yan (2010), Characterization and comparative analysis of wheat high molecular weight glutenin subunits by SDS-PAGE, RP-HPLC, HPCE and MALDI-TOF-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2777-2786.

Gawlik-Dziki U., M. Swieca, D. Dzik (2012), Comparison of Phenolic Acids Profile and Antioxidant Potential of Six Varieties of Spelt (*Triticum spelta* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4603–4612.

Gemperline P. J. (2006), Chapter 4: Principal Component Analysis, in: *Practical Guide to Chemometrics*, Second Edition (P. Gemperline), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 70-107.

Gerhardt K.O. (1990), Gas chromatography-mass spectrometry, in: *Principles and applications of gas chromatography in food analysis*, Gordon M.H. (Ed.), Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 59–85.

Gordon M.H. (1990), Principles of gas chromatography, in: *Principles and applications of gas chromatography in food analysis*, Gordon M.H. (Ed.), Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 11-58.

Gower J.C. (1983), Data analysis: Multivariate or univariate and other difficulties, in: *Food Research and Data Analysis*, Harald Martens and Hellmut Russwurm Jr (Eds.), Applied Science Publishers, Essex, UK, pp. 39-69.

Grane A., A. Jach (2014), Application of principal component analysis (PCA) in food science and technology, in: Mathematical and statistical methods in food science and technology, Granato D., G. Ares (Eds), First Edition, Wiley, Chichester, UK, pp. 57-87.

Grob R.L., E.F. Barry (2004), Modern Practice of Gas Chromatography (Fourth Edition), John Wiley & Sons, New Jersey, USA.

Gross J.H. (2011), Mass Spectrometry, Second Edition, Springer, pp. 293–296.

Guo J., T. Yue, Y. Yuan (2012), Feature selection and recognition from nonspecific volatile profiles for discrimination of apple juices according to variety and geographical origin, Journal of Food Science, 77, 1090-1096.

Hammer O., D.A.T. Harper, P.D. Ryan (2001), PAST-Paleontological statistics software package for education and data analysis, Palaeontologia Electronica, 4(1), Oslo, Norway, pp. 4-11.

Havrlentová M., J. Kraic (2006), Content of β -D-glucan in cereal grains, Journal of Food and Nutrition Research, 45(3), 97-103.

He H.-P., H. Corke (2003), Oil and Squalene in Amaranthus Grain and Leaf, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(27), 7913–7920.

Hill T., P. Lewicki (2007), STATISTICS: Methods and Applications, StatSoft, Tulsa, OK, USA.

<https://www.aacnet.org/Pages/default.aspx>

<https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/advanced-testing-methods-help-food-authentication>

<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/articles-journals/preface-food-chemistry-special-issue-food-authenticity-traceability>

<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/brochures-leaflets/certified-reference-materials-food-authenticity>

<https://www.icc.or.at/>

http://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik_o_kvalitetu_zita_mlinskih_i_pekarskih_proizvoda_i_testenina.html

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.slglasnik.com/>

Hockett E.A. (2000), Chapter 3: Barley, in: Handbook of Cereal Science and Technology, second edition, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 81-126.

Hozová B., L. Kuniak, P. Moravčiková, A. Gajdošová (2007), Determination of Water-Insoluble β -d-Glucan in the Whole-Grain Cereals and Pseudocereals, Czech Journal of Food Science, 25(6), 316-324.

Huggett A.C., B. Schliter (1996), Research needs for establishing the safety of functional foods, Nutrition Reviews, 54, 143– 148.

Hübschmann H.J. (2009), Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications (Second Edition), Wiley-VCH Verlag Weinheim, Germany.

Iafelice G., V. Verardo, E. Marconi, M.F. Caboni (2009), Characterization of Total, Free and Esterified Phytosterols in Tetraploid and Hexaploid Wheats, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(6), 2267–2273.

Ikanović J., V. Popović, S. Janković, G. Dražić, S. Pavlović, M. Tatić, Lj. Kolarić, V. Sikora, Lj. Živanović (2016), Impact of agro-ecological conditions on protein synthesis in hexaploid wheat - spelt (*Triticum Spelta*), Biotechnology in Animal Husbandry, 32 (1), 91-100.

Janatuinen E.K., T.A. Kemppainen, R.J. Julkunen, V.M. Kosma, M. Mäki, M. Heikkinen, M.I. Uusitupa (2002), No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease, Gut, 50, 332–335.

Jankovic S., J. Ikanovic, V. Popovic, S. Rakic, S. Pavlovic, V. Ugrenovic, D. Simic, D. Doncic (2015), Morphological and productive traits of spelt wheat –*Triticum spelta* L., Agriculture & Forestry, 61(2), 173-182.

Jespersen B.M., L. Munck (2009), Cereals and Cereal Products, in: Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control (Da-Wen Sun, Ed.), Elsevier Inc.

Johnson L.A. (2000), Chapter 2: Corn, in: Handbook of Cereal Science and Technology, second edition, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 32-80.

Jumtee K., T. Bamba, E. Fukusaki (2009), Fast GC-FID based metabolic fingerprinting of Japanese green tea leaf for its quality ranking prediction, Journal of Separation Science, 32, 2296-2304.

Jumtee K., H. Komura, T. Bamba, E. Fukusaki (2011), Predication of Japanese green tea (Sen-cha) ranking by volatile profiling using gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis, Journal of Bioscience and Bioengineering, 112, 252-255.

Kalinova J., N. Vrchotova, J. Triska (2007), Exudation of Allelopathic Substances in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6453–6459.

Kaluđerski G., N. Filipović (1998), Metode ispitivanja kvaliteta žita, brašna i gotovih proizvoda, Tehnološki fakultet Novi Sad, Zavod za tehnologiju žita i brašna/ Methods for the investigation of cereals, flour and final product quality, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia.

Karady S., S.H. Pines (1970), Mass spectrometry of the trimethylsilyl ethers of 2-ketohexoses, *Tetrahedron*, 26, 4527-4536.

Kasarda D., R. D'Ovidio (1999), Deduced Amino Acid Sequence of an a-Gliadin Gene from Spelt Wheat (*Spelta*) Includes Sequences Active in Celiac Disease, *Cereal Chemistry*, 76(4), 548–551.

Kazeem M.I., Theophilus C.D. (2016), Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents, *Journal of Functional Foods*, 20, 122–138.

Kent N.L., A.D. Evers (1994), *Technology of cereals: An introduction for students of food science and agriculture (Fourth Edition)*, Elsevier Science, Oxford, UK.

Kim Chung O., J.-B. Ohm (2000), Chapter 14: Cereal Lipids, in: K. Kulp, J.G. Ponte (Eds.) *Handbook of Cereal Science and Technology (Second Edition)*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 417-478.

Kim S.L., S.K. Kim, C.H. Park (2004), Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable, *Food Research International*, 37, 319-327.

Kitson F., B. Larsen, C. McEwen (1996), *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a practical guide*, Academic Press, San Diego, USA.

Kim S.-L., S.-K. Kim, C.-H. Park (2004), Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable, *Food Research International*, 37(4), 319-327.

Klaus L. (2000), Chapter 8: Rye, in: *Handbook of Cereal Science and Technology*, second edition, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 223-256.

Knapp R.D. (1979), *Handbook of analytical derivatization reactions*, John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 67–68.

Koehler P., H. Wieser (2013), Chapter 2: Chemistry of Cereal Grains, in: *Handbook on Sourdough Biotechnology*, Springer Science and Business Media (M. Gobbetti, M. Gänzle, Eds.), New York, SAD, pp. 11-45.

- Konopka I., S. Czaplicki, D. Rotkiewicz (2006), Differences in content and composition of free lipids and carotenoids in flour of spring and winter wheat cultivated in Poland, *Food Chemistry*, 95, 290–300.
- Kotilainen L., R. Rajalahti, C. Ragasa, E. Pehu (2006), Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries, *Agriculture and Rural Development Discussion*, Paper 30.
- Kreft I., N. Fabjan, K. Yasumoto (2006), Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products, *Food Chemistry*, 98(3), 508-512.
- Lavine B. K., C. E. Davidson Chapter 9: Classification and Pattern Recognition, in: *Practical Guide to Chemometrics, Second Edition* (P. Gemperline), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 339-379.
- Lee I., J. Yang (2009), Common clustering algorithms, in: *Comprehensive chemometrics*, Brown S.D., R. Tauler, B. Walczak (Eds.), Elsevier, Oxford, UK, pp. 577-618.
- Lin J., P. Zhang, Z. Pan, H. Xu, Y. Luo, X. Wang (2013), Discrimination of oolong tea (*Camellia sinensis*) varieties based on feature extraction and selection from aromatic profiles analysed by HS-SPME/GC-MS, *Food Chemistry*, 141, 259–265.
- Lookhart G. (2000), Chapter 12: Cereal Proteins: Composition of Their Major Fractions and Methods for Identification, in: *Handbook of Cereal Science and Technology*, second edition, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 363-384.
- Ma X.F., J.P. Gustafson (2008), Allopolyploidization-accommodated Genomic Sequence Changes in Triticale, *Annals of Botany*, 101(6), 825-832.
- Maia M., F.M. Nunes (2013), Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis, *Food Chemistry*, 136, 961–968.
- Malheiro R., P. Guedes de Pinho, S. Soares, A. Cesar da Silva Ferreira, P. Baptista (2013), Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination, *Food Research International*, 54, 186-194.
- Manning L. (2016), Food fraud: policy and food chain, *Current Opinion in Food Science*, 10, 16–21.
- Manning L., J.M. Soon (2014), Developing systems to control food adulteration, *Food Policy*, 49, 23–32.
- Márton M., Zs. Mándoki, J. Csapó (2010), Evaluation of biological value of sprouts: I. Fat content, fatty acid composition, *Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria*, 3, 53–65.

Masisi K., T. Beta, M.H. Moghadasian (2016), Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies, *Food Chemistry*, 196, 90–97.

McKevith B. (2004), Nutritional aspects of cereals, *Nutrition Bulletin*, 29, 111-142.

McLafferty F.W. (1959), Mass Spectrometric Analysis: Molecular Rearrangements, *Analytical Chemistry*, 31(1), pp. 82–87.

McLafferty F.W., F. Tureček (1993), Interpretation of Mass Spectra, University Science Books, Sausalita, California, USA, 251–258.

McMaster M. (2008), *GC/MS A Practical User's Guide* (Second edition), John Wiley & Sons, New Jersey, USA.

McMullen M.S. (2000), Chapter 4: Oats, in: *Handbook of Cereal Science and Technology*, second edition, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 127-148.

McNair H., J. Miller (1998), *Basic Gas Chromatography*,: John Wiley & Sons, New York, USA.

McNaught A.D., A. Wilkinson (1997), *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (Second Edition), Blackwell Science Publications, Oxford, UK.

Mikulajová A., M. Takáčsová, P. Rapta, L. Brindzová, M. Zalibera, K. Németh (2007), Total phenolic contents and antioxidant capacities of cereal and pseudocereal genotypes, *Journal of Food and Nutrition Research*, 46 (4), 150-157.

Mohamed S. (2014), Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease, *Trends in Food Science & Technology*, 35, 114-128.

Moore J.C., J. Spink, M. Lipp (2012), Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010, *Journal of Food Science*, 77(4), 118-126.

Nagi H.P.S., J. Kaur, B.N. Dar, S. Sharma (2012), Effect of Storage Period and Packaging on the Shelf Life of Cereal Bran Incorporated Biscuits, *American Journal of Food Technology*, 7, 301-310.

Nibbering N.M.M. (2004), The McLafferty Rearrangement: A Personal Recollection, Focus: McLafferty rearrangement account and perspective, *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 956-958.

Niessen W. (2001), *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Chromatographic Science Series), Marcel Dekker, New York, USA.

Oliveri P., G. Downey (2012), Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims, *Trends in Analytical Chemistry*, 35, 74-86.

Pastor K., M. Ačanski, R. Razmovski, S. Kravić, Đ. Psodorov, Đ. Vujić (2015a), Authenticity of lipid and sugar profiles of various buckwheat cultivars investigated by GC-MS system and multivariate analysis, *Food Science and Technology*, 3(3), 42-47.

Pastor K., M. Ačanski, Đ. Vujić, A. Kondić-Špika, N. Hristov (2015b), Lipid and sugar profiles of various barley cultivars (*Hordeum vulgare*), *APTEFF*, 46, 65-75.

Pastor K., M. Ačanski, G. Bekavac, Đ. Vujić (2015c), Qualitative analysis of liposoluble flour extracts of different corn hybrids using GC-MS system, *IV International Congress Engineering, Environment and Materials in Processing Industry*, Conference Proceedings, 1100-1115, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 4-6. Mart 2015.

Pastor K., M. Ačanski, Đ. Vujić, G. Bekavac (2015d), Lipid composition of hexane extracts of corn hybrids, 4th International Conference *Sustainable Postharvest and Food Technologies - INOPTEP 2015* and 27th National Conference *Processing and Energy in Agriculture -PTEP 2015*, Conference Proceedings, 1-5, Divčibare, Serbia, 19-24. April 2015.

Pastor K., M. Ačanski, G. Bekavac, Đ. Vujić (2015e), Kvalitativna analiza alkoholnih ekstrakata brašna različitih genotipova kukuruza primenom GC-MS sistema i multivarijantne analize, 11th Symposium *Novel technologies and economic development*, Conference Proceedings, 47-53, Leskovac, Serbia, 23-24. Oktobar 2015.

Pastor K., M. Ačanski, N. Hristov, Đ. Vujić, A. Kondić-Špika (2015f), Application of multivariate analysis in wheat and corn flour differentiation, *IV International Congress Engineering, Environment and Materials in Processing Industry*, Conference Proceedings, 132-137, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 4-6. Mart.

Pastor K., M. Ačanski, Đ. Vujić, Đ. Jovanović, S. Wienkoop (2016a), Authentication of cereal flours by multivariate analysis of GC-MS data, *Chromatographia*, 79(19-20), 1387-1393.

Pastor K., M. Ačanski, Dj. Vujić, G. Bekavac, S. Milovac, S. Kravić (2016b), Rapid Method for Small Grain and Corn Flour Authentication Using GC/EI-MS and Multivariate Analysis, *Food Analytical Methods*, 9, 443-450.

Pastor K., M. Ačanski, Đ. Vujić, A. Kondić-Špika (2016c), Binary Simple Sugar Profiling in Corn and Small Grain Flour Authentication Using GC/EI-qMS Approach, *Chromatographia*, 79(21-22), 1553-1559.

Pastor K., M. Ačanski, E. Dimić, V. Vujasinović, Đ. Vujić, J. Sudi, S. Dojčinović-Vujašković (2016d), A GC/MS method for sunflower, almond and linseed oil differentiation, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Bioscience Conference – IBSC 2016*, Conference Proceedings, p. 312, Novi Sad, Serbia, 19-21. Septembar.

Pastor K., L. Pezo, Dj. Vujić, Dj. Jovanović, M. Ačanski (2017a), Discriminating cereal and pseudocereal species using binary system of GC-MS data - Chemometric approach, *Journal of the Serbian Chemical Society*, u štampi.

Pastor K., M. Ačanski, Đ. Vujić, A. Kondić-Špika (2017b), Relationship between GC/EI-qMS disaccharide profiles and corresponding genomes of wheat, rye and triticale cultivars, *Ratarstvo i povrtarstvo*, 54(2), 73-78.

Patel S. (2015), Cereal bran fortified-functional foods for obesity and diabetes management: Triumphs, hurdles and possibilities, *Journal of Functional Foods*, 14, 255–269.

Pegels N., I. Gonzalez, T. García, R. Martín (2015), Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays, *LWT - Food Science and Technology*, 60, 867-875.

Pelillo M., F. Feriol, G. Iafelice, E. Marconi, M.F. Caboni (2010), Characterisation of the phospholipid fraction of hulled and naked tetraploid and hexaploid wheats, *Journal of Cereal Science*, 51, 120-126.

Peterson G. (1974), Gas-chromatographic analysis of sugars and related hydroxy acids as acyclic oxime and ester trimethylsilyl derivatives, *Carbohydrate Research*, 33(1), 47–61.

Peterson David M. (2001), Oat Antioxidants – Mini Review, *Journal of Cereal Science*, 33, 115–129.

Piironen V., A.-M. Lampi (2004), Chapter 1: Occurrence and Levels of Phytosterols in Foods, in: P.C. Duta (Ed.) *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals*, Marcel Dekker, NY, USA, pp. 1-32.

Pinto D., I. Castro, A. Vicente, A.I. Bourbon, M.Â. Cerqueira (2014), Chapter 25: Functional Bakery Products: An Overview and Future Perspectives, in: W. Zhou, Y.H. Hui, I. De Leyn, M.A. Pagani, C.M. Rosell, J.D. Selman, N. Therdthai (Eds.) *Bakery Products Science and Technology (Second Edition)*, John Wiley & Sons, Hoboken, USA, pp. 431-452.

Pongsuwan W., T. Bamba, T. Yonetani, A. Kobayashi, E. Fukusaki (2008), Quality prediction of Japanese green tea using pyrolyzer coupled GC/MS based metabolic fingerprinting quality prediction of Japanese green tea using pyrolyzer coupled GC/MS based metabolic, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 744-750.

Posner E.S. (2000), Chapter 1:Wheat, in: *Handbook of Cereal Science and Technology*, second edition, CRC Press, Taylor & Francis, pp. 1-30.

Pouliarekou E., A. Badeka A., M. Tasioula-Margari, S. Kontakos, F. Longobardi, M.G. Kontominas (2011), Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds, *Journal of Chromatography A*, 1218, 7534–7542.

Preface (2010), *Food Chemistry*, 118, 888–889.

Prestamo G., A. Pedrazuela, E. Penas, M.A. Lasuncion, G. Arroyo (2003), Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food, *Nutrition Research*, 23, 803–814.

Primrose S., M. Woolf, S. Rollinson (2010), Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs, *Trends in Food Science & Technology*, 21, 582-590.

Psodorov Đ., Đ. Vujić, M. Ačanski, K. Pastor, R. Razmovski, S. Kravić (2014), The content of buckwheat flour in wheat bread, 45, *APTEFF*, 79-87.

Psodorov Đ., M. Ačanski, D. Psodorov, Đ. Vujić, K. Pastor (2015a), Determining the content of wheat and buckwheat flour in bread using GC-MS system and multivariate analysis, *Journal of Food and Nutrition Research*, 54 (2), 179-183.

Psodorov Đ.B., M.M. Ačanski, Đ.N. Vujić, J.S. Brkljača, D. Đ. Psodorov (2015b), Homogeneity of oil and sugar components of flour amaranth investigated by GC-MS, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21(1), 71–76.

Ragae S., E.-S.M. Abdel-Aal, M. Noaman (2006), Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, *Food Chemistry*, 98, 32–38.

Rakha A., P. Åman, R. Andersson (2011), Dietary fiber in triticale grain: Variation in content, composition, and molecular weight distribution of extractable components, *Journal of Cereal Science*, 54, 324-331.

Ranhotra G.S., J.A. Gelroth, B.K. Glaser, K.J. Lorenz (1995), Baking and nutritional qualities of a spelt wheat sample, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 118-122.

Ranhotra G.S., J.A. Gelroth, B.K. Glaser, K.J. Lorenz (1996), Nutrient Composition of Spelt Wheat, *Journal of food composition and analysis*, 9, 81–84.

Regert M., J. Langlois, S. Colinart (2005), Characterisation of wax works of art by gas chromatographic procedures, *Journal of Chromatography A*, 1091, 124–136.

Reid L.M., C.P. O'Donnellb, G. Downey (2006), Recent technological advances for the determination of food authenticity, *Trends in Food Science & Technology* 17, 344–353.

Rencher A. (2002), *Methods of Multivariate Analysis Second Edition*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

Risticovic S., E. Carasek, J. Pawliszyn (2008), Headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric methodology for geographical origin verification of coffee, *Analitica Chimica Acta*, 617, 72–84.

Roberfroid M.B. (1999), What is beneficial for health? The concept of functional food, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1039–1041.

Rotzsche H. (1991), *Stationary Phases in Gas Chromatography (Vol. 48)*, Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Rozenberg R., N.L. Ruibal-Mendieta, G. Petitjean, P. Cani, D.L. Delacroix, N.M. Delzenne, M. Meurens, J. Quetin-Leclercq, J.-L. Habib-Jiwan (2003), Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS, *Journal of Cereal Science*, 38 (2), 189–197.

Ruibal-Mendieta N.L., R. Rozenberg, D.L. Delacroix, G. Petitjean, A. Dekeyser, C. Baccelli, C. Marques, N.M. Delzenne, M. Meurens, J.-L. Habib-Jiwan, J. Quetin-Leclercq (2004), Spelt (*Triticum Spelta* L.) and Winter Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Wholemeals Have Similar Sterol Profiles, as Determined by Quantitative Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15), 4802-4807.

Ruibal-Mendieta N.L., D.L. Delacroix, E. Mignolet, J.M. Pycke, C. Marques, R. Rozenberg, G. Petitjean, J.L. Habib-Jiwan, M. Meurens, J. Quetin-Leclercq, N.M. Delzenne, Y. Larondelle (2005), Spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2751-2759.

Ruiz-Matute A.I., O. Hernández-Hernández, S. Rodríguez-Sánchez, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro (2011), Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses, *Journal of Chromatography B*, 879, 1226-1240.

Ryan E., K. Galvin, T.P. O'Connor, A.R. Maguire, N.M. O'Brien (2007), Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seeds, Grains, and Legumes, *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 85–91.

Samala A., R. Srinivasan, M. Yadav (2015), Comparison of xylo-oligosaccharides production by autohydrolysis of fibers separated from ground corn flour and DDGS, *Food and Bioproducts Processing*, 94, 354-364.

Sanders M.E. (1998), Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria, *International Dairy Journal*, 8, 341—347.

Schipilliti L., P. Dugo, I. Bonaccorsi, L. Mondello (2011), Headspace-solid phase microextraction coupled to gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometer and to enantioselective gas chromatography for strawberry flavoured food quality control, *Journal of Chromatography A*, 1218, 7481–7486.

Schipilliti L., P. Dugo, I. Bonaccorsi, L. Mondello (2012), Authenticity control on lemon essential oils employing Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS), *Food Chemistry*, 131, 1523–1530.

Shahidi F., C. Liyana-Pathirana (2008), Chapter 11: Phenolic Content and Antioxidant Activity of Whole-Wheat Grain and Its Components, in: T. Shibamoto, K. Kanazawa, F. Shahidi, C.-T. Ho (Eds.) *Functional Food and Health*, American Chemical Society, Washington, USA, pp. 110-124.

Shelton D. (2000), Chapter 13: Cereal Carbohydrates, in: K. Kulp, J.G. Ponte (Eds.) *Handbook of Cereal Science and Technology (Second Edition)*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 385-416.

Shewry P.R. (2002), Chapter 1: The Major Seed Storage Proteins of Spelt Wheat, Sorghum, Millets and Pseudocereals, in: *Pseudocereals and Less Common Cereals - Grain Properties and Utilization Potential* Peter (S. Belton, J.R.N. Taylor), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 1-25.

Silva P., J. Freitas, C.L. Silva, R. Perestrelo, F.M. Nunes, J.S: Camara (2017), Establishment of authenticity and typicality of sugarcane honey based on volatile profile and multivariate analysis, *Food Control*, 73, 1176-1188.

Simsek S., K. Whitney, J.-B. Ohm (2013), Analysis of Cereal Starches by High-Performance Size Exclusion Chromatography, *Food Analytical Methods*, 6, 181–190.

Singh S.K., N. Singh, N. Singh Malhi (2007), Some properties of corn grains and their flours I: Physicochemical, functional and chapati-making properties of flours, *Food Chemistry*, 101(3), 938-946.

Siroa I., E. Kapolna, B. Kapolna, A. Lugasi (2008), Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review, *Appetite*, 51, 456–467.

- Sivadier G., J. Ratel, F. Bouvier, E. Engel (2008), Authentication of meat products: Determination of animal feeding by parallel GC-MS analysis of three adipose tissues, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9803–9812.
- Skrabanja V., B. Kovac, T. Golob, H.G.M. Liljeberg Elmståhl, I.M.E. Björck, I. Kreft (2001), Effect of Spelt Wheat Flour and Kernel on Bread Composition and Nutritional Characteristics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (1), 497–500.
- Skulberg A. (1983), Introductory Remarks, in: *Food Research and Data Analysis*, Harald Martens and Hellmut Russwurm Jr (Eds.), Applied Science Publishers, Essex, UK, pp. 1-3.
- Spence J.T. (2006), Challenges related to the composition of functional foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 4–6.
- Spink J., D.C. Moyer (2011), Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), 157–163.
- Stajić S., D. Živković, V. Tomović, V. Nedović, M. Perunović, N. Kovjanić, S. Lević, N. Stanišić (2014), The utilisation of grapeseed oil in improving the quality of dry fermented sausages, *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2356–2363.
- Steadman K.J., M.S. Burgoon, B.A. Lewis, S.E. Edwardson, R.L. Obendorf (2001), Buckwheat Seed Milling Fractions: Description, Macronutrient Composition and Dietary Fibre, *Journal of Cereal Science*, 33, 271–278.
- Størsrud S., M. Olsson, R. Arvidsson Lenner, L.A. Nilsson, O. Nilsson, A. Kilander (2003), Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats, *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 163–169.
- Takahama, U., S. Hirota (2010), Fatty acids, epicatechin- dimethylgallate, and rutin interact with buckwheat starch inhibiting its digestion by amylase: implications for the decrease in glycemic index by buckwheat flour, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12431–12439.
- Takayama M. (1995), Metastable McLafferty rearrangement reaction in the electron impact ionization of stearic acid methyl ester, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 144, 199-204.
- Thomas D., W. Atwell (1999), *Starches*, Egan Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Tikekar R.V., R.D. Ludescher, M.V. Karwe (2008), Processing Stability of Squalene in Amaranth and Antioxidant Potential of Amaranth Extract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (22), 10675–10678.

Topping D. (2007), Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health, *Journal of Cereal Science*, 46, 220–229.

Troya F., M.J. Lerma-García, J.M. Herrero-Martínez, E.F. Simó-Alfonso (2015), Classification of vegetable oils according to their botanical origin using n-alkane profiles established by GC-MS, *Food Chemistry*, 167, 36–39.

US FDA (1997), FDA final rule for federal labeling: health claims; oats and coronary heart disease, *Federal Register*, 62, 3584–3681.

Varmuza K., P. Filzmoser (2008), Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.

Varughese, G., T. Barker, E. Saari (1987), Triticale, CIMMYT, Mexico, D.F. 32 pp. 1-35.

Vujić Dj., M. Ačanski, M. Bodroža-Solarov, N. Hristov, M. Krunić (2012), Performance of GC-MS analysis for differentiation of various types of flour by creating dendrogram of liposoluble extract, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 18(4), 555–561.

Vujić Đ.N., Đ.B. Psodorov, M.M. Ačanski, M.I. Bodroža-Solarov, J.S. Brkljača (2013a), Qualitative analysis of hexane flour extract of spelt, *APTEFF*, 44, 125-130.

Vujić Đ., M. Ačanski, M. Bodroža-Solarov, Đ. Psodorov, J. Brkljača (2013b), Qualitative analysis of hydrosoluble flour extract of spelt and bread wheat, *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 17(4), 169-172.

Wang M., B. Avula, Y.H. Wang, J. Zhao, C. Avonto, J.F. Parcher, V. Raman, J.A. Zweigenbaum, P.L. Wylie, I.A. Khan (2014), An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products, *Food Chemistry*, 152, 391–398.

WHO/FAO Report (2003) of a Joint Expert Consultation “Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases”, WHO Technical Report Series, 916, Geneva, Switzerland.

Wildman R., M. Kelley (2007), Chapter 1: Nutraceuticals and Functional Foods, in: R.E.C. Wildman (Ed.) *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods (Second Edition)*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 1-22.

Wishart D.S. (2008), Metabolomics: Applications to food science and nutrition research, *Trends in Food Science & Technology*, 19 (9) 482-493.

Wood P.J. (1997), Functional Foods for Health - Opportunities for Novel Cereal Processes and Products, in: *Cereals – Novel Uses and Processes* (Grant M. Campbell, Colin Webb, Stephen L. McKee, Eds.), Springer Science, New York, pp. 233-241.

www.mn-net.com/tabid/10234/default.aspx

Xinhui L., K. Wei, S. Weimin, S. Qi (2016), A combination of chemometrics methods and GC–MS for the classification of edible vegetable oils, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 155:145-150.

Xu B., P. Li, F. Ma, X. Wang, B. Matthäus, R. Chen, Q. Yang, W. Zhang, Q. Zhang (2015), Detection of virgin coconut oil adulteration with animal fats using quantitative cholesterol by GC×GC–TOF/MS analysis, *Food Chemistry*, 178, 128–135.

Zeković I., L. Lenhardt, T. Dramićanin, M. Dramićanin (2012), Classification of intact cereal flours by front-face synchronous fluorescence spectroscopy, *Food Analytical Methods*, 5(5), 1205–1213.

Ziegler J.U., R.M. Schweiggert, T. Würschum, C. Friedrich, H. Longin, R. Carle (2016), Lipophilic antioxidants in wheat (*Triticum spp.*): A target for breeding new varieties for future functional cereal products, *Journal of Functional Foods*, 20, 594–605.

Ziółkowska A., E. Wąsowicz, H.H. Jeleń (2016), Differentiation of wines according to grape variety and geographical origin based on volatiles profiling using SPME-MS and SPME-GC/MS methods, *Food Chemistry*, 213, 714-720.

Prilog 1

Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa

(„Sl. list SRJ“, br. 52/95 i „Sl. list SCG“, br. 56/2003 – dr. pravilnik, 4/2004 – dr. pravilnik i „Sl. glasnik RS“, br. 43/2013 – dr. Pravilnik, 68/2016 - dr. pravilnik)

Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa je stupio na snagu 19. avgusta 2016. godine, a počće da se primenjuje 1. januara 2018. godine. Prema pomenutom Pravilniku *Žitarice* su prehrambena zrna biljaka, uglavnom gajena - kultivisana, namenjena za ljudsku upotrebu i industrijsku preradu, koja pripadaju porodici Graminea (*Gramineae*), i to: (1) pšenica (*Triticum aestivum* L.), (2) durum pšenica (*Triticum durum* Desf.), (3) patuljasta pšenica (*Triticum aestivum compactum* L.), (4) spelta (*Triticum aestivum spelta* L.), (5) raž (*Secale cereale* L.), (6) tritikale (*Triticale* Wittmack), (7) ječam (*Hordeum vulgare* L.), osim ječma za pivarsku industriju (*Hordeum vulgare convar. Distichon*), (8) ovas (*Avena sativa* L.), (9) pirinač (*Oryza sativa* L.), (10) kukuruz (*Zea mays* L.), (11) proso (*Panicum miliaceum* L.), (12) sirak (*Sorghum bicolor* L.), (13) heljda.

Pekarski proizvodi

Član 72

Pekarski proizvodi, u smislu ovog pravilnika, jesu: hleb, pecivo i druge vrste pekarskih proizvoda.

Član 76

Za proizvodnju pekarskih proizvoda, kao osnovne sirovine mogu se upotrebljavati pšenično, ražano, kukuruzno, ječmeno, ovseno i heljdino brašno, prekrupa žita, voda ili druga dozvoljena tečnost, pekarski kvasac ili druga dozvoljena sredstva za fermentaciju i kuhinjska so.

Član 82

Prema vrsti upotrebljenih sirovina, pekarski proizvodi se mogu stavljati u promet kao:

- 1) osnovne vrste hleba i peciva;
- 2) specijalne vrste hleba i peciva;
- 3) druge vrste pekarskih proizvoda.

Član 83

Pod nazivom „osnovne vrste hleba i peciva“ mogu se stavljati u promet hleb i pecivo koji su izrađeni od osnovnih sirovina predviđenih u članu 76 ovog pravilnika. Prema vrsti upotrebljenih osnovnih sirovina, osnovne vrste hleba i peciva stavljaju se u promet kao:

- 1) pšenični hleb i pšenično pecivo;
- 2) ražani hleb i ražano pecivo;

- 3) hleb i pecivo od brašna hibrida raži i pšenice;
- 4) kukuruzni hleb;
- 5) heljdin hleb;
- 6) mešani hleb i mešano pecivo.

Pšenični i speltin hleb

Član 36

Pšenični hleb sadrži najmanje 90% pšeničnog brašna, od ukupno upotrebijene količine brašna za proizvodnju istog, osim pšeničnog integralnog hleba koji sadrži najmanje 80% pšeničnog integralnog brašna ili integralne pšenične prekrupe od ukupno upotrebijene količine brašna. Speltin hleb, proizvodi se od najmanje 70% speltinog brašna ili drugih mlinskih proizvoda od spelte ili integralnog speltinog brašna, računato na ukupno upotrebijenu količinu brašna.

Član 84

Pri proizvodnji pšeničnog hleba, u deklaraciju nije obavezno unositi podatke o količini i vrsti sledećih dodatnih sirovina: do 3% brašna od krompira ili do 10% kivanog očišćenog krompira ili kaše od krompira, do 5% ražanog brašna, do 2% skroba ili do 5% kukuruznog brašna ili kukuruznog griza.

Ražani hleb

Član 37

Ražani hleb se proizvodi od najmanje 70% raženog brašna različitih tipova, računato na ukupno upotrebijenu količinu brašna.

Član 85

Pri proizvodnji ražanog hleba i ražanog peciva, u deklaraciju nije obavezno unositi podatke o količini i vrsti sledećih dodatnih sirovina: do 20% pšeničnog brašna i do 3% brašna od krompira ili do 10% kivanog očišćenog krompira, odnosno kaše od krompira.

Hleb od tritikalea

Član 86

Pri proizvodnji hleba i peciva od brašna hibrida raži i pšenice (tritikalea), u deklaraciju nije obavezno unositi podatke o količini i vrsti sledećih dodatnih sirovina: do 20% pšeničnog brašna ili do 3% brašna od krompira ili do 10% kivanog očišćenog krompira, odnosno kaše od krompira.

Kukuruzni hleb

Član 37

Kukuruzni hleb se proizvodi od najmanje 60% kukuruznog brašna ili drugih mlinskih proizvoda od kukuruza, računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna.

Član 87

Pri proizvodnji kukuruznog hleba, u deklaraciju nije obavezno unositi podatke o količini i vrsti sledećih dodatnih sirovina: do 20% pšeničnog brašna, ili do 20% ražanog brašna, ili do 3% brašna od krompira, ili do 10% kuvanog očišćenog krompira, odnosno kaše od krompira.

Heljdin hleb

Član 37

Heljdin hleb se proizvodi od najmanje 30% heljdinog brašna, računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna.

Mešani hleb

Član 38

Mešani hleb se proizvodi od mešavine dve ili više vrsta brašna različitih žita, prekrupe, pahuljica i drugih sastojaka.

Mešani hleb se razvrstava i stavlja u promet kao:

- 1) mešani pšenični hleb, ako sadrži najmanje 51% m/m pšeničnog brašna ili pšeničnih pahuljica računato na ukupnu količinu brašna;
- 2) mešani ražani hleb, ako sadrži najmanje 30% m/m raženog brašna ili raženih pahuljica računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna;
- 3) mešani kukuruzni hleb, ako sadrži najmanje 20% m/m kukuruznog brašna ili drugih mlinskih proizvoda od kukuruza računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna;
- 4) mešani ječmeni hleb, ako sadrži najmanje 15% m/m ječmenog brašna ili ječmenih pahuljica računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna;
- 5) mešani heljdin hleb, ako sadrži najmanje 15% m/m brašna ili drugih mlinskih proizvoda od heljde, računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna;
- 6) mešani ovseni hleb, ako sadrži najmanje 15% m/m ovsenog brašna ili ovsenih pahuljica računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna;

7) mešani hleb od prosa, ako sadrži najmanje 15% m/m prosenog brašna ili drugih mlinskih proizvoda od prosa računato na ukupnu količinu brašna;

8) mešani hleb od spelte, ako sadrži najmanje 30% m/m speltinog brašna ili speltinih pahuljica računato na ukupno upotrebljenu količinu brašna;

9) mešani hleb od celog zrna, ako sadrži najmanje 20% m/m različitih vrsta integralnih brašna ili prekrupe, računato na ukupnu količinu brašna;

10) mešani hleb od više vrsta brašna od različitih žita, ako sadrži najmanje tri vrste brašna od različitih žita.

Mešani hleb iz stava 2. tačka 10) ovog člana, u promet se stavlja pod nazivom "Mešani hleb od..." iza čega se navode nazivi upotrebljenih vrsta brašna, po opadajućem redosledu, a na osnovu mase upotrebljenih sirovina. Ako je mešani hleb proizveden od četiri ili više vrsta brašna, upotrebljene vrste brašna u nazivu proizvoda mogu se zameniti navođenjem broja vrsta upotrebljenog brašna.

Član 89

Mešani hleb i mešano pecivo mogu se proizvoditi i stavljeni u promet kao hleb i pecivo umešeni od mešavine pšeničnog, ražanog, ječmenog, ovsenog, heljadinog, sojinog i kukuruznog brašna i brašna od prosa.

Mešani hleb može se stavljeni u promet pod nazivima: „ražani mešani hleb“, „heljadin mešani hleb“, odnosno „kukuruzni mešani hleb“ – ako je za proizvodnju takvog hleba upotrebljeno najmanje 30% odnosno vrste brašna; „ječmeni mešani hleb“ i „ovseni mešani hleb“ – ako je za proizvodnju takvog hleba upotrebljeno najmanje 20% odnosno vrste brašna; „sojin mešan hleb“ – ako je za proizvodnju takvog hleba upotrebljeno najmanje 10% sojinog brašna, i „mešani hleb sa prosom“ – ako je za proizvodnju takvog hleba upotrebljeno najmanje 20% brašna od prosa.

Pravilnik o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa

(„Sl. list SFRJ“, br. 74/88)

Žita i mlinski proizvodi (tačke 22, 23 i 24)

22. Dokazivanje prisustva brašna drugih žita u pšeničnom brašnu - mikroskopsko ispitivanje

Princip

Princip se zasniva na mikroskopskoj analizi, kojom se dokazuje zastupljenost drugih vrsta brašna (ražanog, ječmenog, pirinčanog, heljdinog, ovsenog, prosenog, krompirovog i brašna pasulja) u pšeničnom brašnu.

Postupak

Odmeri se 20 g pšeničnog brašna, koje se sa 10 ml destilovane vode zamesi u porculanskoj posudi pomoću porculanskog tučka dok se ne dobije homogena masa. Od testa se formira lopta, iz koje se ispira izvesna količina lepka. Voda sa ispranim škrobom naspe se u kupastu čašu i ostavi da miruje oko 12 h. Za vreme mirovanja u čaši se jasno izdvajaju tri sloja:

- prvi, površinski, bele ili više-manje sive boje, vrlo tečan, sadrži najmanja škrobna zrnca i malo sasvim lakih celuloznih delova;
- drugi, jasno sive boje, sastavljen je od mnogih ostataka celuloze srednje veličine;
- poslednji, veoma beo sloj, vrlo čvrst, sadrži samo krupna škrobna zrnca.

Radi mikroskopskog ispitivanja najpre se odstrani voda koja pliva, a zatim se postepeno, u posebne čaše, dekantuju (odvoje pažljivim odlivanjem) sva tri sloja, koji se zatim podvrgnu mikroskopskoj analizi, i to svaki sloj više puta. Prema obliku i veličini škrobnih zrnaca utvrdiće se da li je pšeničnom brašnu dodata neka druga vrsta brašna i koja je to vrsta.

23. Dokazivanje i određivanje kukuruznog brašna u pšeničnom brašnu

a) Dokazivanje

Kukuruzno brašno u pšeničnom brašnu dokazuje se prisustvom zeina, tipičnog proteina kukuruza, koji daje biuret-reakciju (ljubičasto obojenja) sa bakar-sulfatom u alkalnoj sredini i koji se rastvara u vrućem amil-alkoholu, za razliku od drugih u etanolu topljivih belančevina od kojih se na taj način može odvojiti.

1. Odmeri se 20 g brašna sa 50 ml 96%-nog etanola, greje se na vodenom kupatilu na temperaturi od 75°C i češće meša; 10 ml filtrata promeša se sa 2 ml 1 M natrijum-hidroksida i 10 kapi 2%-tnog rastvora bakar-sulfata. Ako smesa sadrži bar 5% kukuruznog brašna, pojavljuje se ljubičasta boja.

2. Odmeri se 10 g brašna i 15 min kuva sa 25 ml izoamil-alkohola, a zatim, još vruće, brzo filtrira. Ako u filtratu postoji i 1% kukuruznog brašna, on će se pri hlađenju zamutiti usled nataloženog zeina.

b) Određivanje

Princip

Određivanje kukuruznog brašna u pšeničnom brašnu zasniva se na fotometrijskom ispitivanju zeina biuret-reakcijom.

Aparati i pribor

Koriste se sledeći aparati i pribor:

- 1) fotokolorimetar;
- 2) tikvice, zapremine 50 ml i 100 ml;
- 3) levak, prečnika 8 cm do 10 cm;
- 4) odmerni tikvica zapremine 50 ml;
- 5) filter-papir;
- 6) pipeta, zapremine 10 ml;
- 7) pipete, graduisane, zapremine 1 ml i 5 ml;
- 8) sahatno staklo.

Reagensi i sredstva

Kao reagensi se koriste:

- 1) 96%-ni etanol;
- 2) rastvor natrijum-hidroksida $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$;
- 3) 5%-ni rastvor bakar-sulfata;
- 4) aktivni ugalj.

Postupak

Odmeri se 15 g brašna i 1 h estrahuje u tikvici, zapremine 100 ml pokrivenoj sahatnim staklom sa 75 ml etanola u vodenom kupatilu, na temperaturi od 75°C i često meša. Posle toga se ostavi još 1 h. Zatim se još jedanput promeša, pa se odjedanput, po mogućnosti potpuno, nalije na filtrir-papir. Prvih nekoliko kapi filtrata vrati se na filtrir. Na 10 ml filtrata, koji mora biti potpuno bistar, doda se (u tikvicu zapremine 50 ml) 4 ml rastvora 1 M natrijum-hidroksida i 0,8 rastvora bakar-sulfata, promeša i ponovo zagreva 15 min na vodenom kupatilu, na temperaturi od 75°C. Tada se doda 0,5 g aktivnog uglja u prahu, promeša se, filtrira kroz naborani filter-papir u odmernu tikvicu zapremine 50 ml i dopuni vodom do

oznake. Filtrati moraju biti bistri, i to: kod čistog kukuruznog brašna tamno ljubičasti, a kod pšeničnog brašna svetložutozeleni. Intenzitet plavoljubičaste boje filtrata proporcionalan je količini zeina i određuje se fotokolorimetrijski, a iz baždarene krive očita se količina kukuruznog brašna. Baždarena kriva načini se na uobičajen način sa 0, 20, 30, 40 itd. do 100% kukuruznog brašna u smesi sa pšeničnim brašnom: za te smese kukuruznog i pšeničnog brašna primenjuje se opisani postupak. Pošto količina zeina u kukuruzu varira, rezultati su približni, osim ako se raspolože istim kukuruznim brašnom koje je zamešano sa uzorkom, pa se ono koristi za paralelna određivanja. Ta metoda može se primeniti za žuti kukuruz i za beli kukuruz. U brašnu se može dokazati 0,5%, a u hlebu tek 5% dodatnog kukuruznog brašna. Stajanjem od 1 h, posle grejanja, i filtriranjem kroz filtrir-papir odstranjuju se neke rastvorene belančevine pšenice, koje daju slabu biuret-rekaciju. Aktivnim ugljem odstranjuje se kriptoksantin, koji tu reakciju ometa.

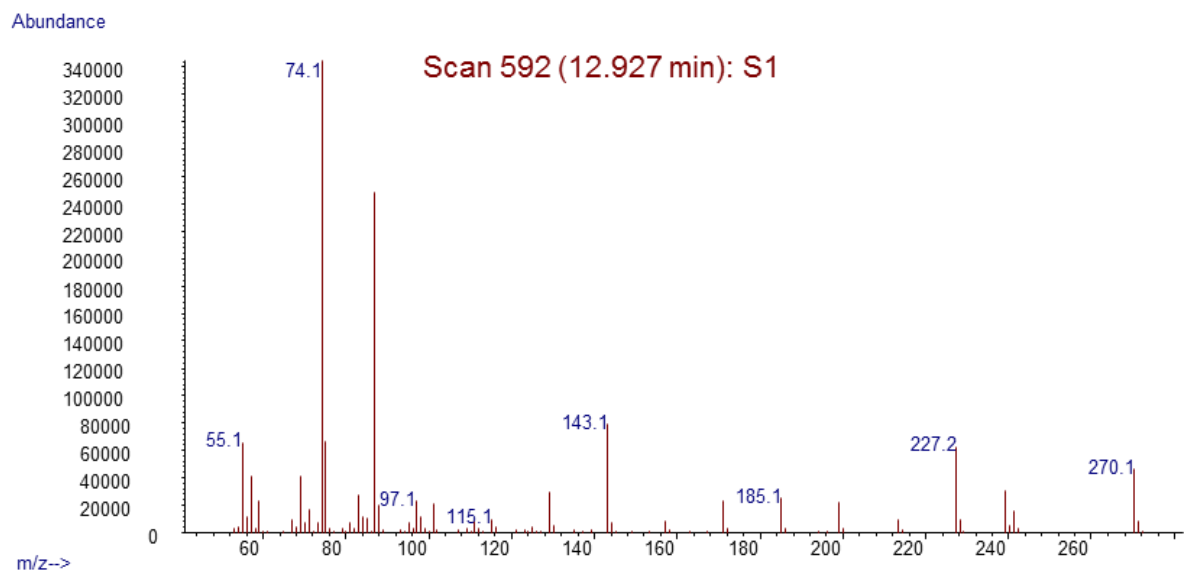
24. Dokazivanje sojinog brašna u pšeničnom brašnu

Soja sadrži specifični ferment ureazu, koje nema u žitaricama. Ureaza se dokazuje razgradnjom uree na amonijak. Odmeri se u epruveti 1 g pšeničnog brašna, doda se 5 ml 2%-nog rastvora uree, homogenizuje u ujednačenu suspenziju, doda nekoliko kapi neutralnog 1%-nog etanolskog rastvora fenolftaleina i stavi u termostat, na temperaturi od 37°C do 40°C. Ako se posle jednog sata pojavi crvena boja usled nastalog amonijaka, dokazano je prisustvo sojinog brašna.

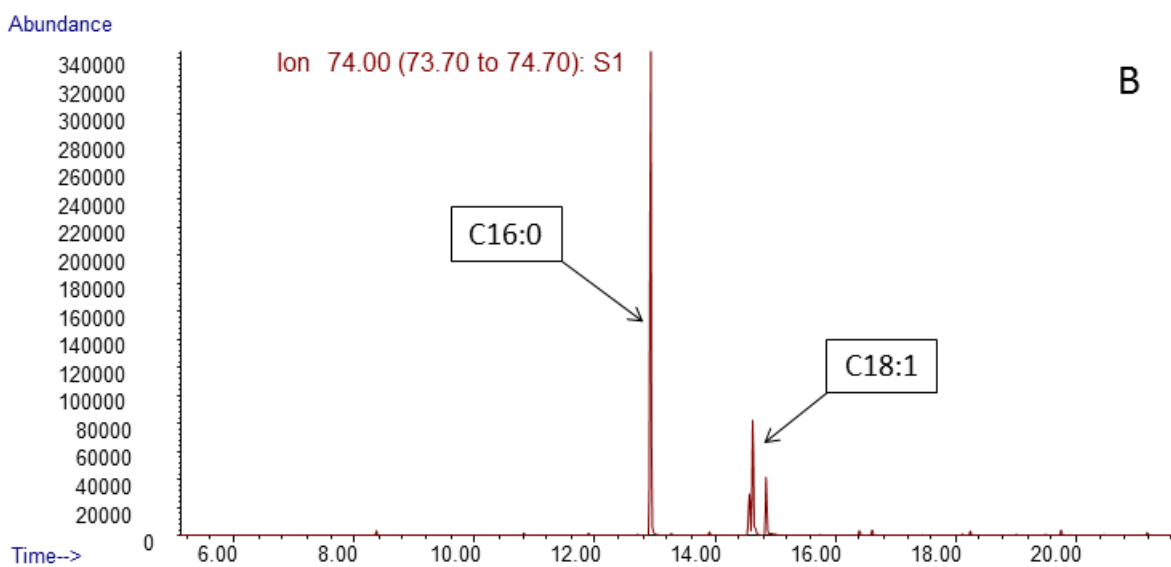
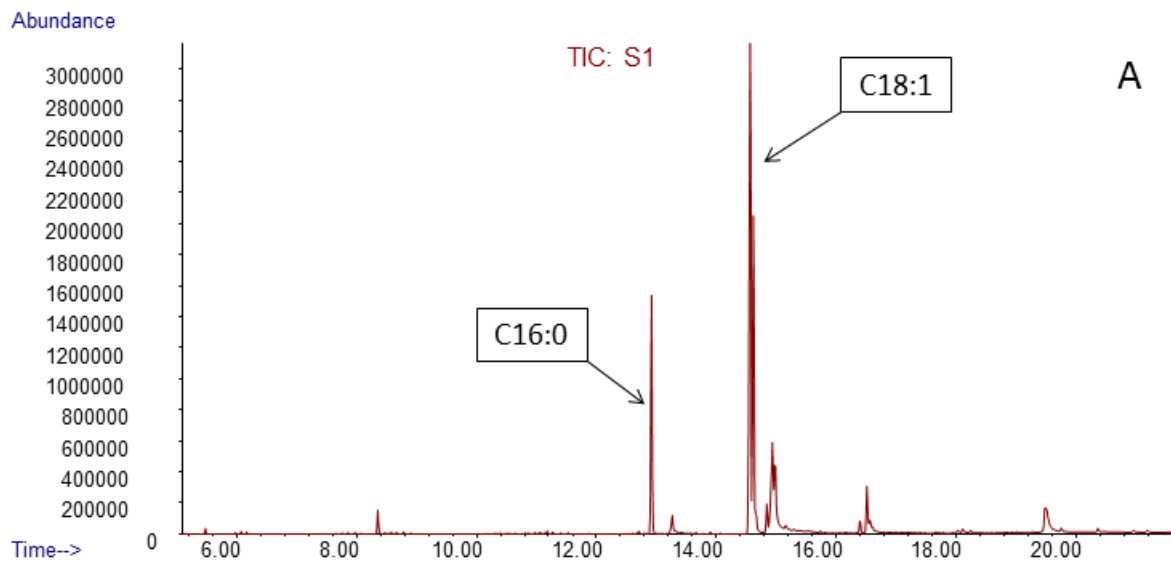
(<http://www.slglasnik.com/>;

http://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik_o_kvalitetu_zita_mlinskih_i_pekarskih_proizvoda_i_testenina.html).

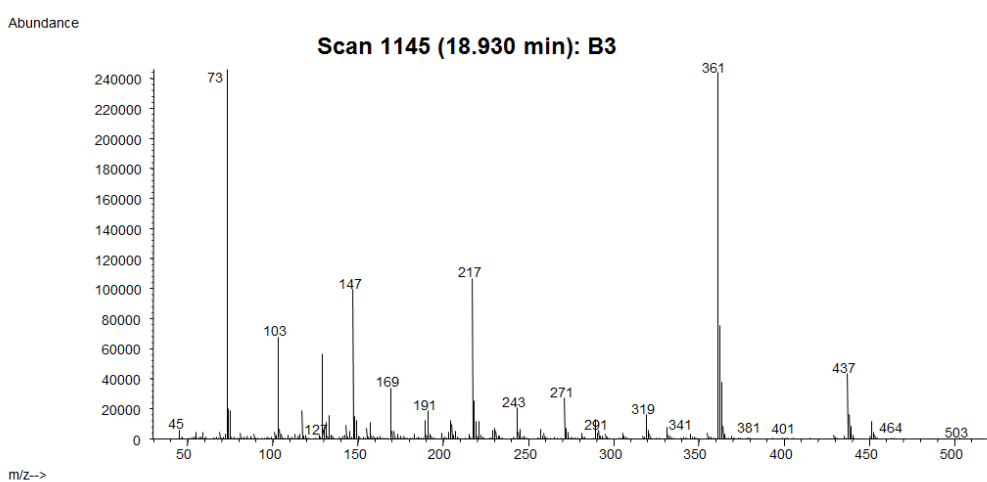
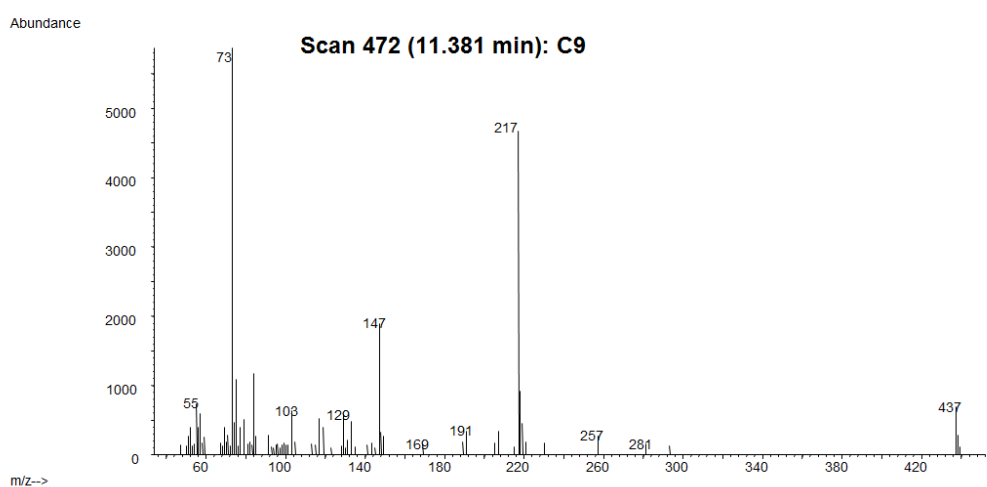
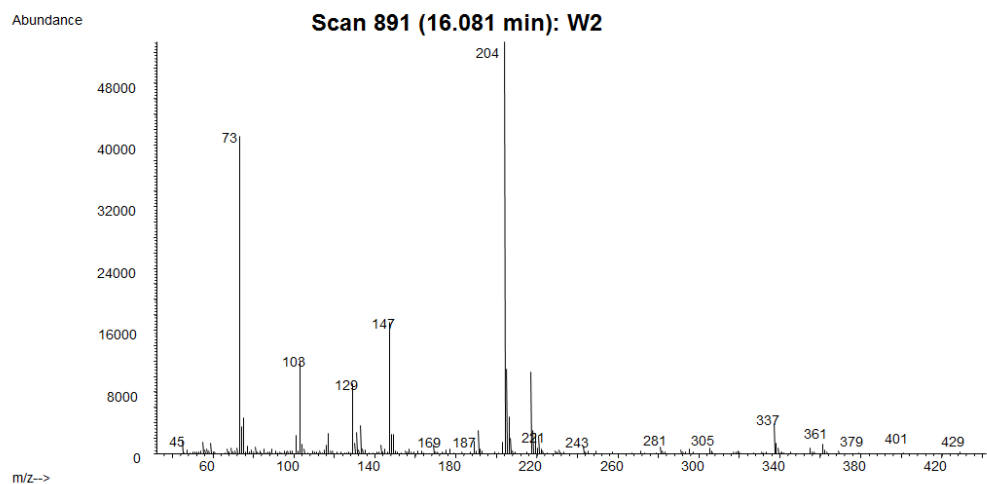
Prilog 2



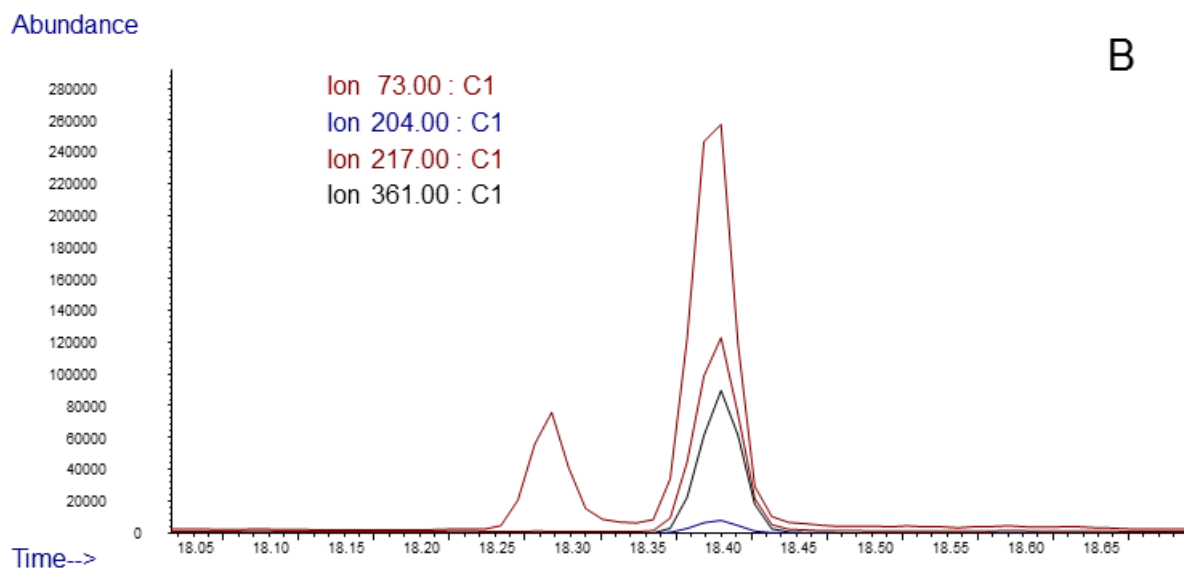
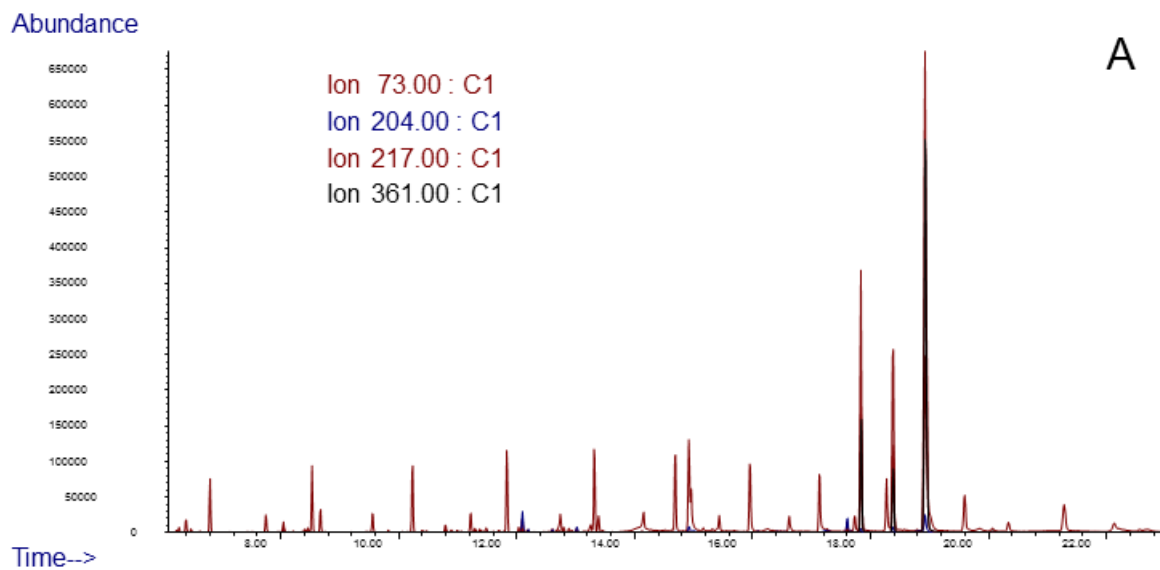
Slika I Maseni spektar metil-estra palmitinske kiseline, sa karakterističnim jonom 74 m/z , u uzorku brašna spelte genotipa Austrija (S1)



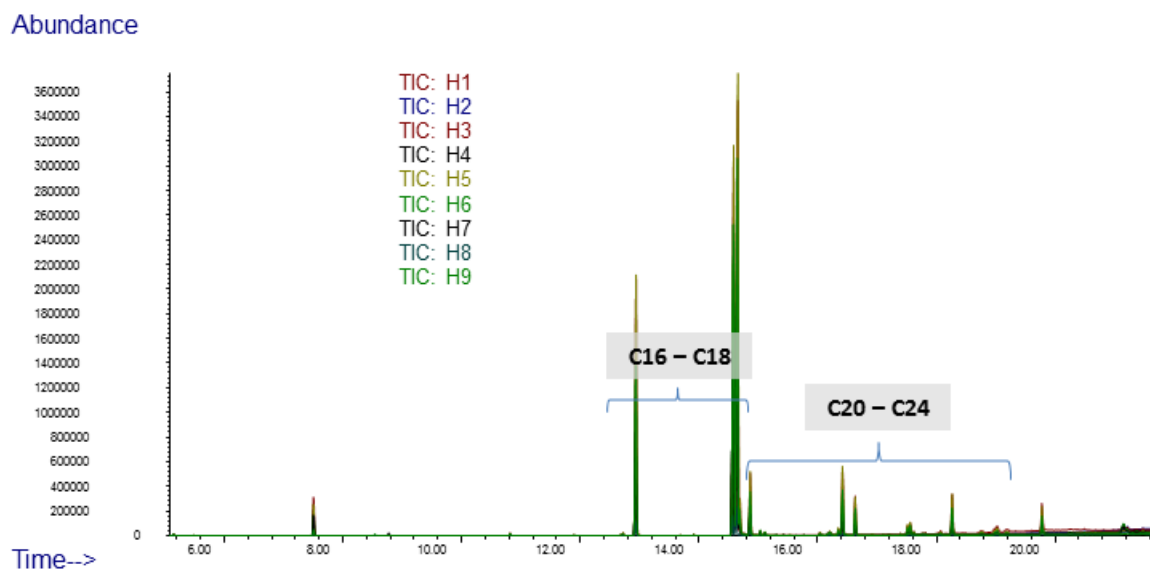
Slika II (A) TIC hromatogrami i (B) jonski 74 m/z hromatogrami liposolubilnog ekstrakta uzorka brašna spelte (genotip S1 - Austrija)



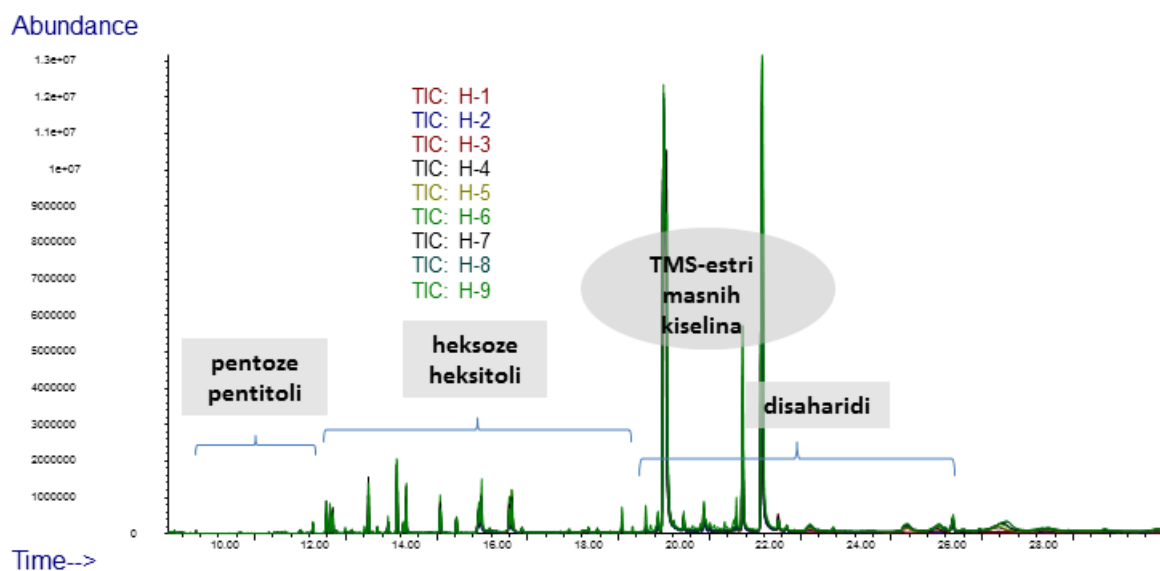
Slika III Maseni spektri i karakteristični fragmentni joni pikova nekih prostih šećera: molekul heksapiranoze (16.08 min), molekul pentafuranoze (11.38 min) i molekul disaharida (18.93 min), u 3 nasumično odabrana genotipa različitih cerealija (pšenica – W2, kukuruz – C9 i ječam – B3)



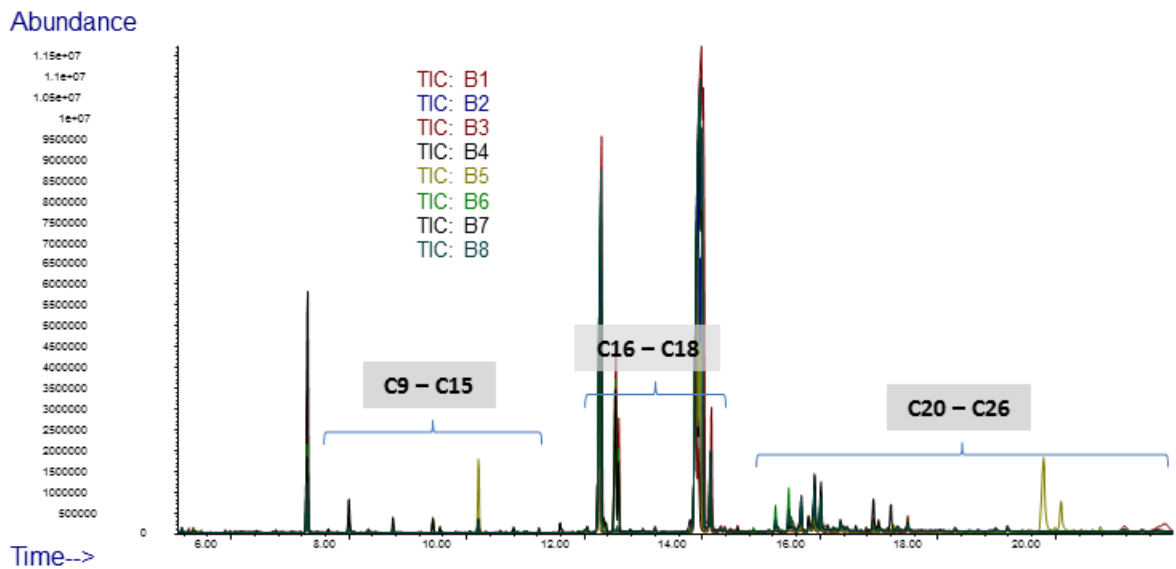
Slika IV (A) Preklapljeni jonski hromatogrami karakterističnih jona ($73\ m/z$, $204\ m/z$, $217\ m/z$ i $361\ m/z$) jednog hidrosolubilnog ekstrakta nasumično izabranog uzorka brašna kukuruza (C1);
(B) Uvećan prikaz dva pika, od kojih je jedan uzet u razmatranje za analizu (desno), a drugi nije (levo)



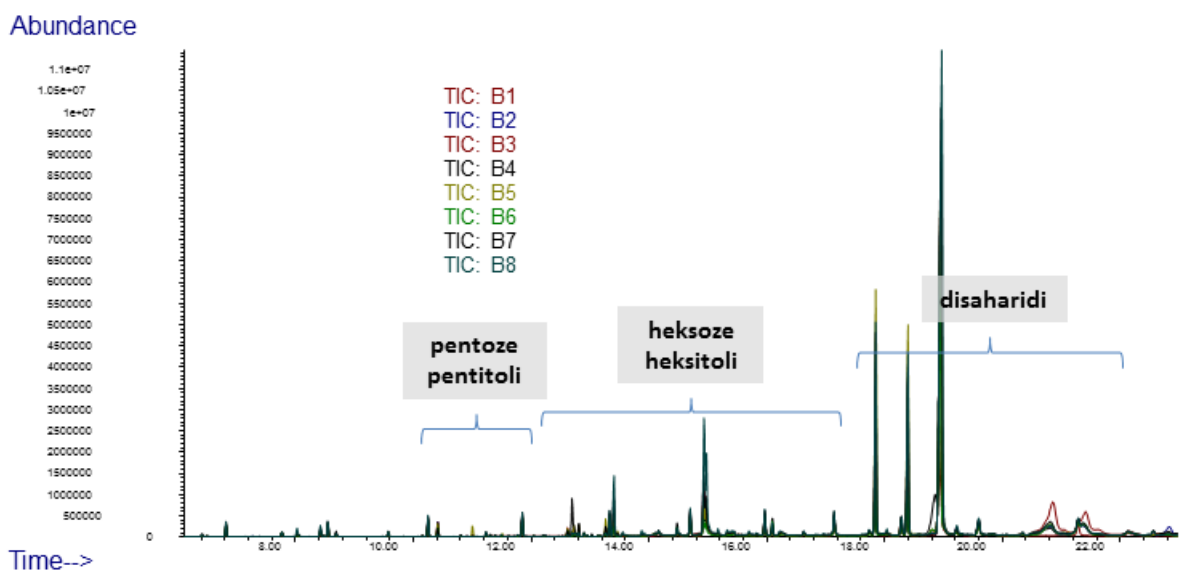
Slika V Preklopljeni TIC hromatogrami liposolubilnih komponenata uzoraka brašna svih analiziranih genotipova heljde



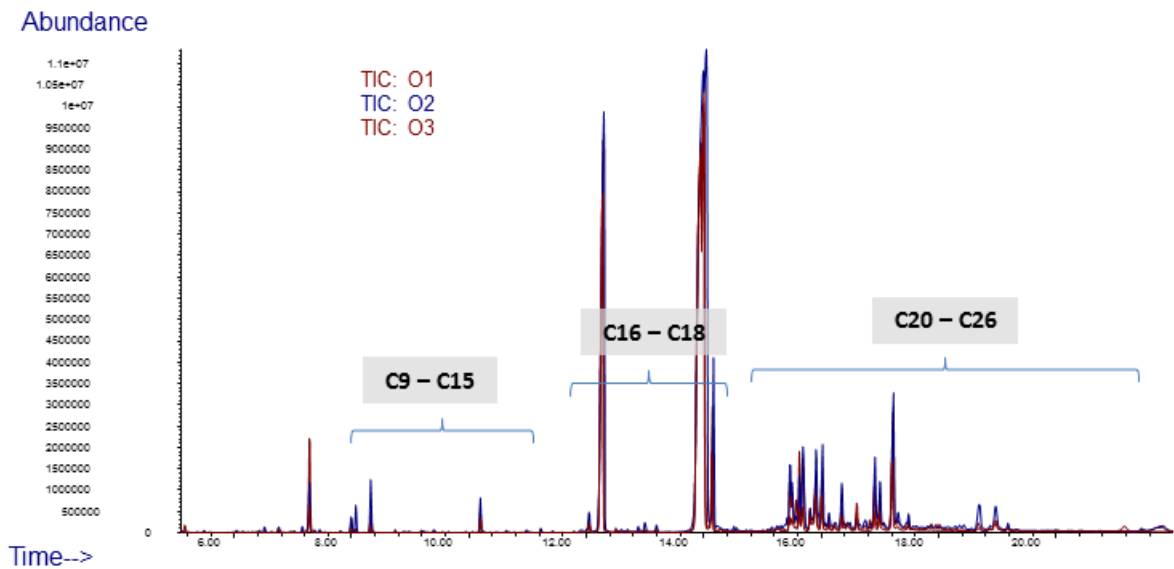
Slika VI Preklopljeni TIC hromatogrami hidrosolubilnih komponenata uzoraka brašna svih analiziranih genotipova heljde



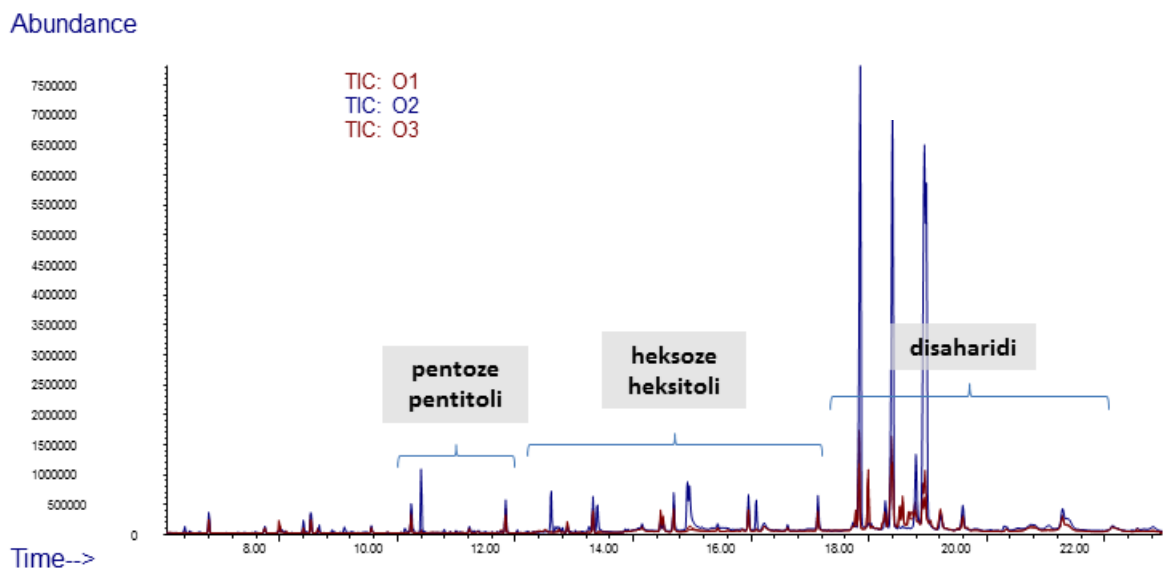
Slika VII Preklopljeni TIC hromatogrami liposolubilnih komponenata uzoraka brašna svih analiziranih genotipova ječma



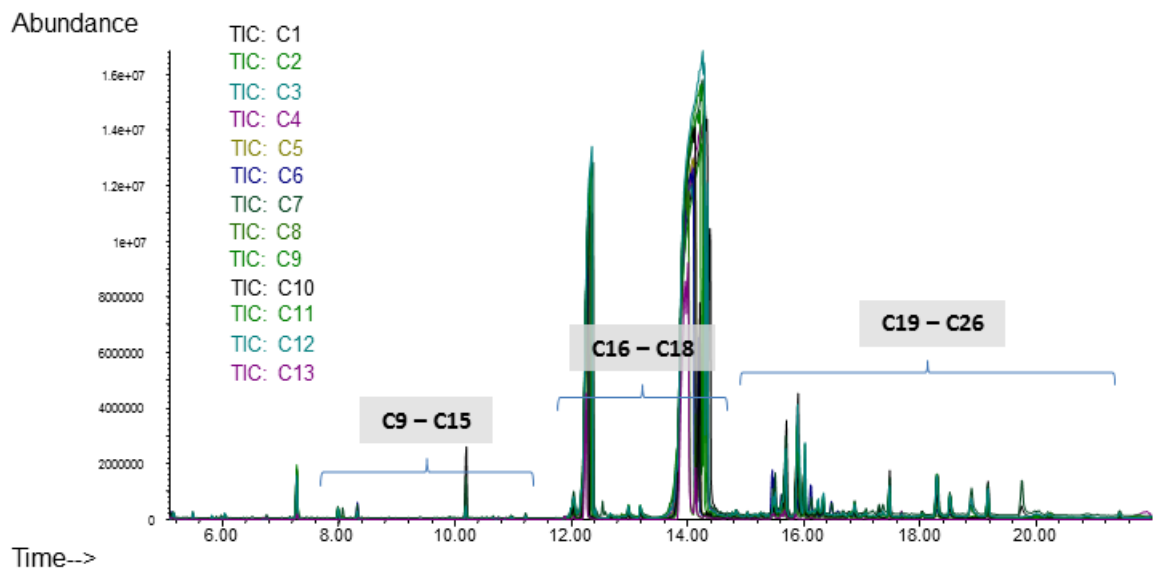
Slika VIII Preklopljeni TIC hromatogrami hidrosolubilnih komponenata uzoraka brašna svih analiziranih genotipova ječma



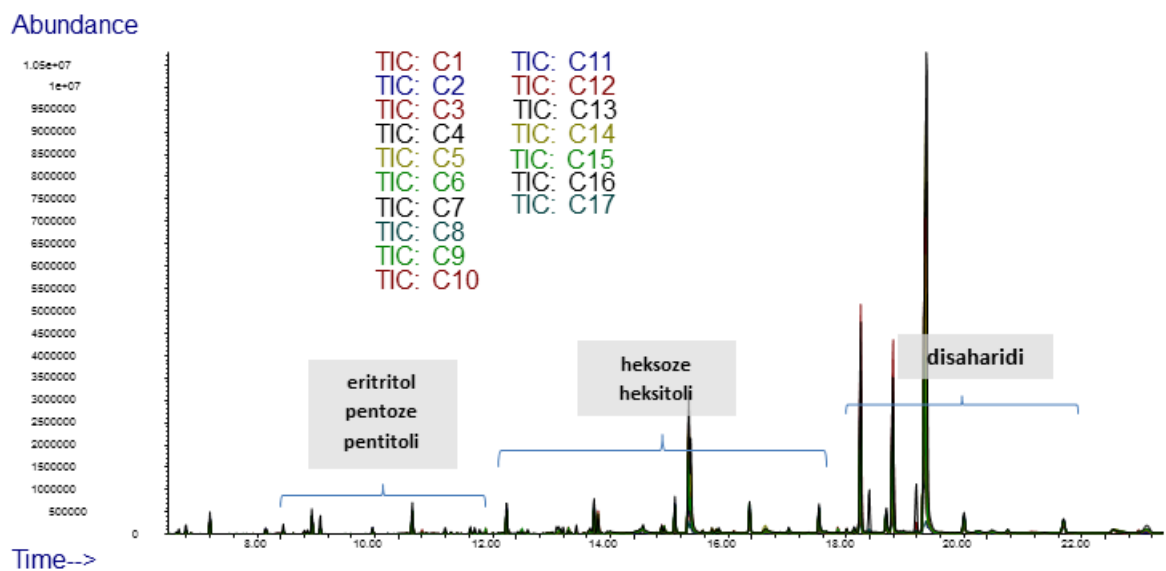
Slika IX Preklopljeni TIC hromatogrami liposolubilnih komponenata uzoraka brašna 3 analizirana genotipa ovsa



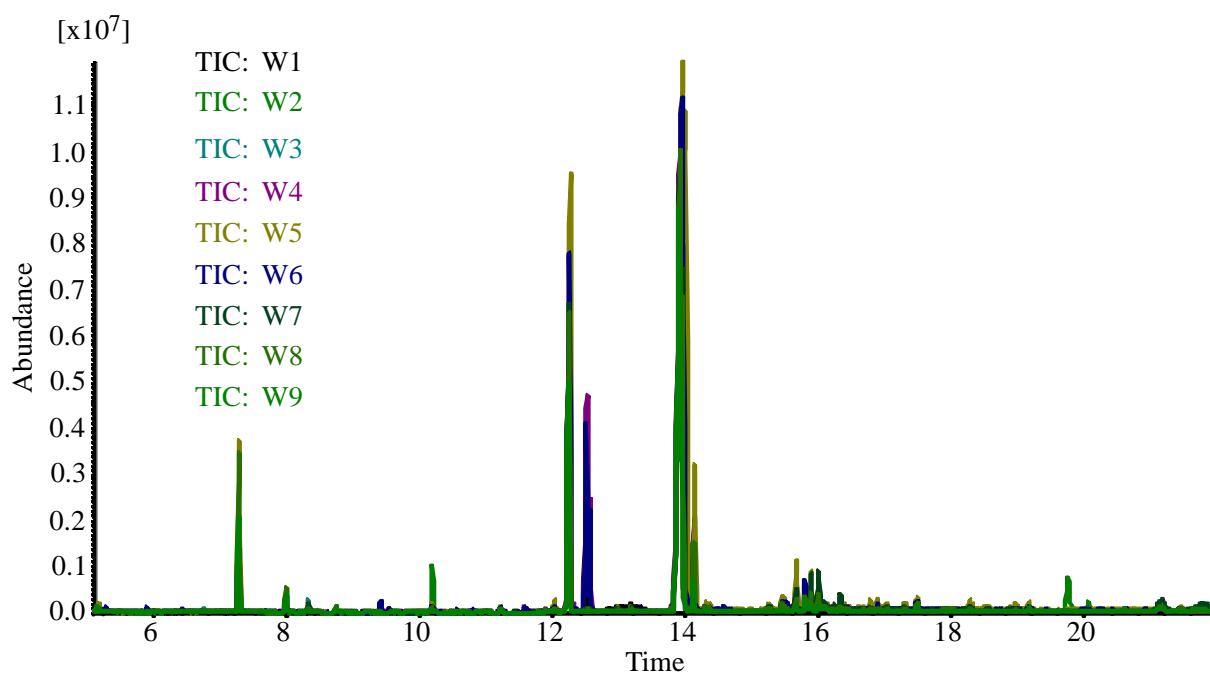
Slika X Preklopljeni TIC hromatogrami hidrosolubilnih komponenata uzoraka brašna 3 analizirana genotipa ovsa



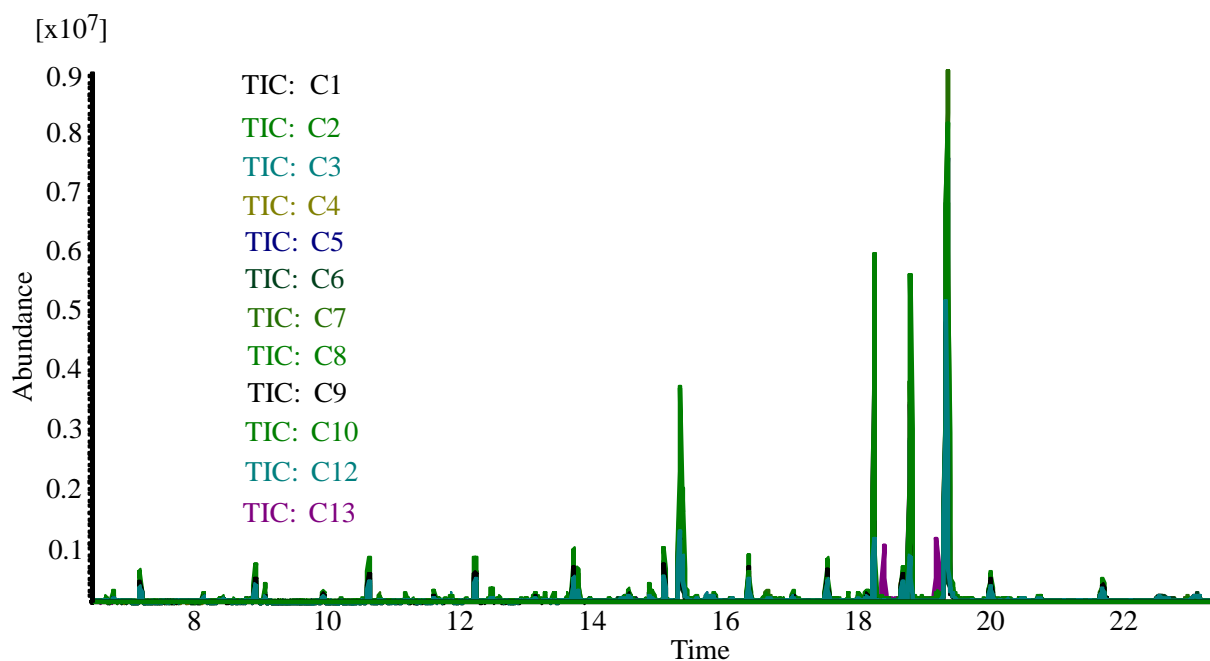
Slika XI Preklopljeni TIC hromatogrami liposolubilnih komponenta uzoraka brašna 13 analiziranih hibrida kukuruza



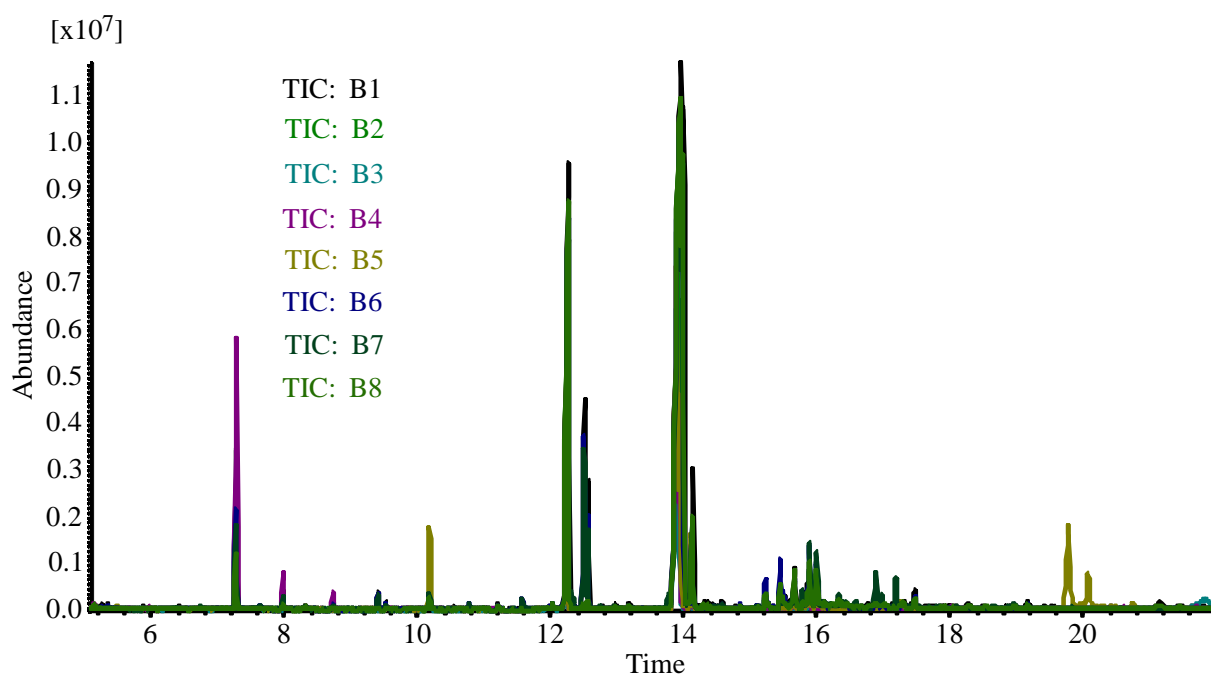
Slika XII Preklopljeni TIC hromatogrami hidrosolubilnih komponenta uzoraka brašna svih analiziranih hibrida kukuruza



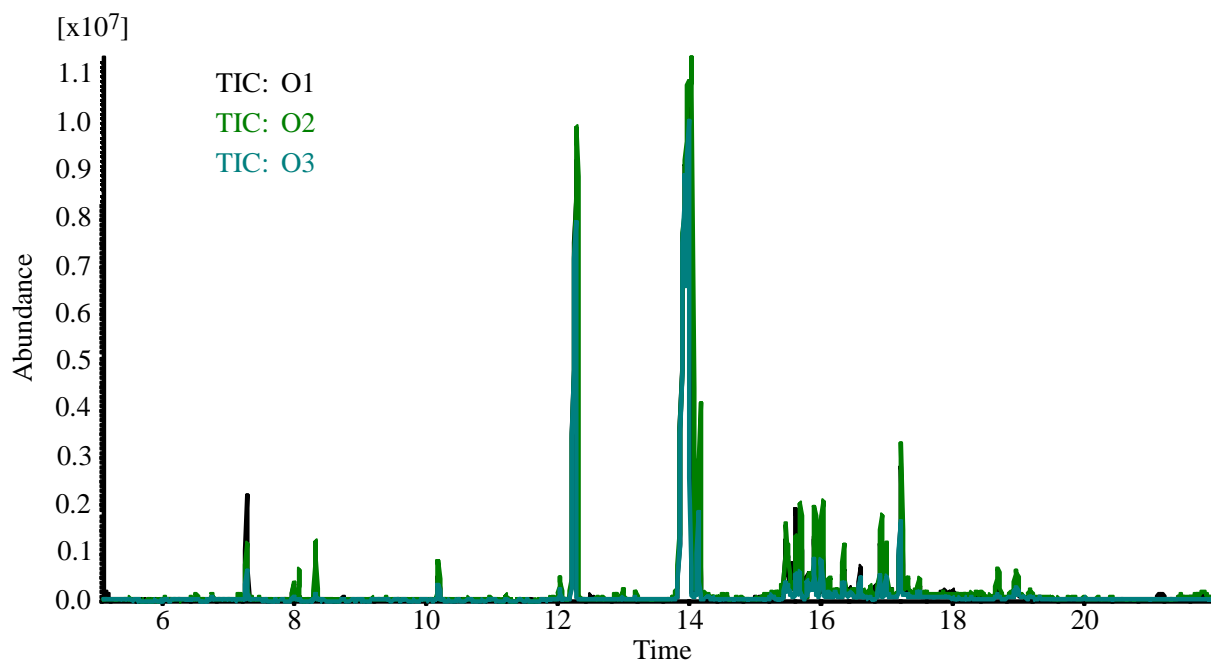
Slika XIII Preklopljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 9 genotipova pšenice



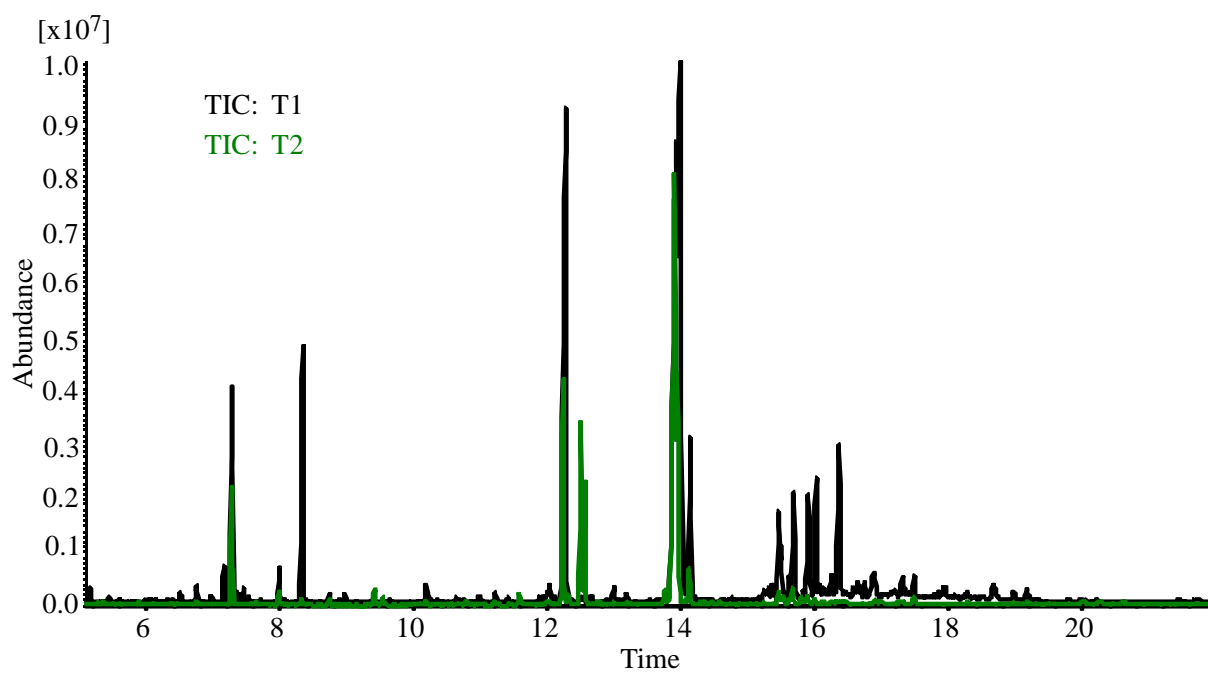
Slika XIV Preklopljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 13 hibrida kukuruza



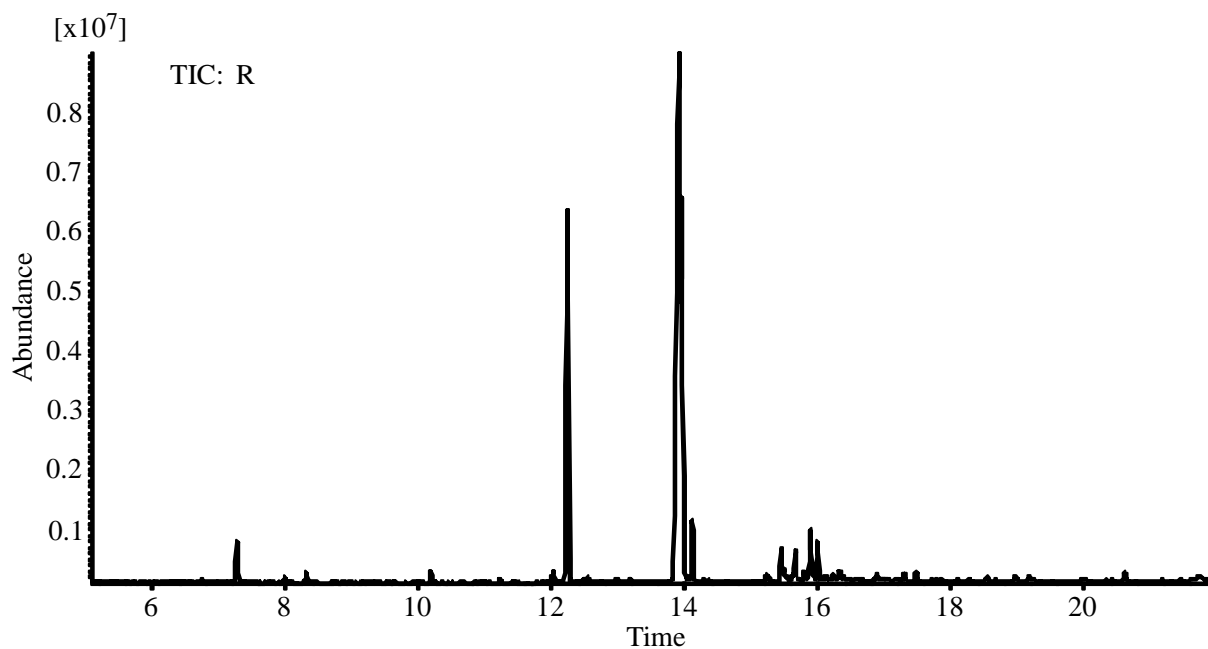
Slika XV Preklapljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 8 genotipova ječma



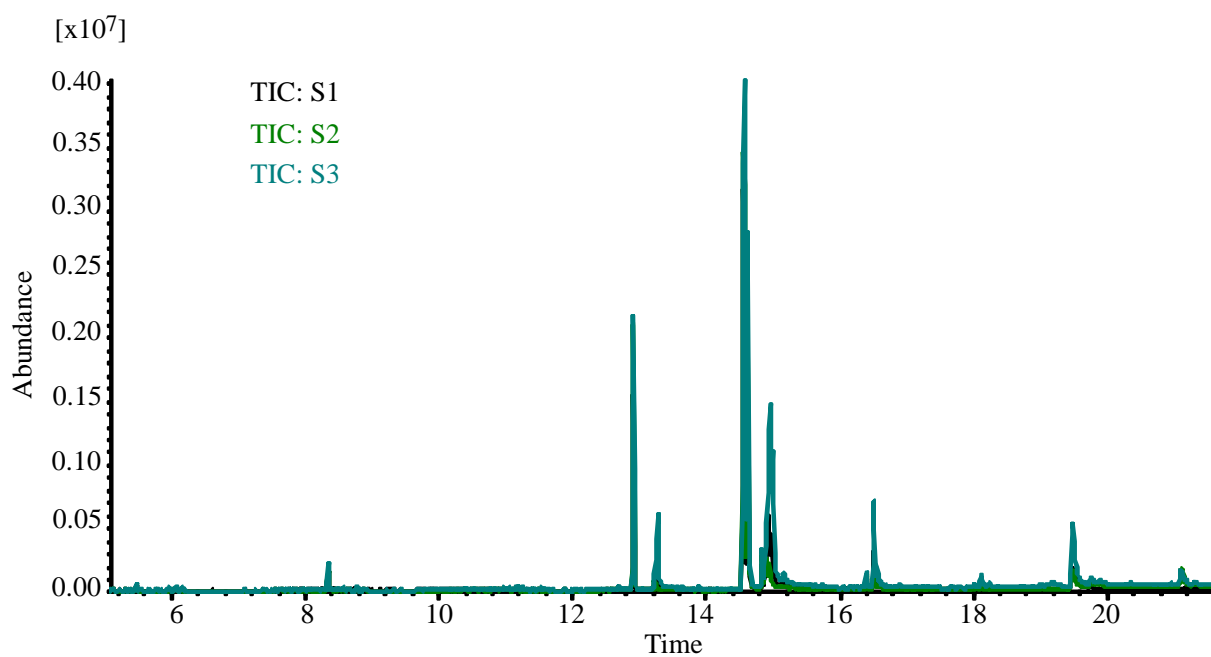
Slika XVI Preklapljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 3 genotipa ovs



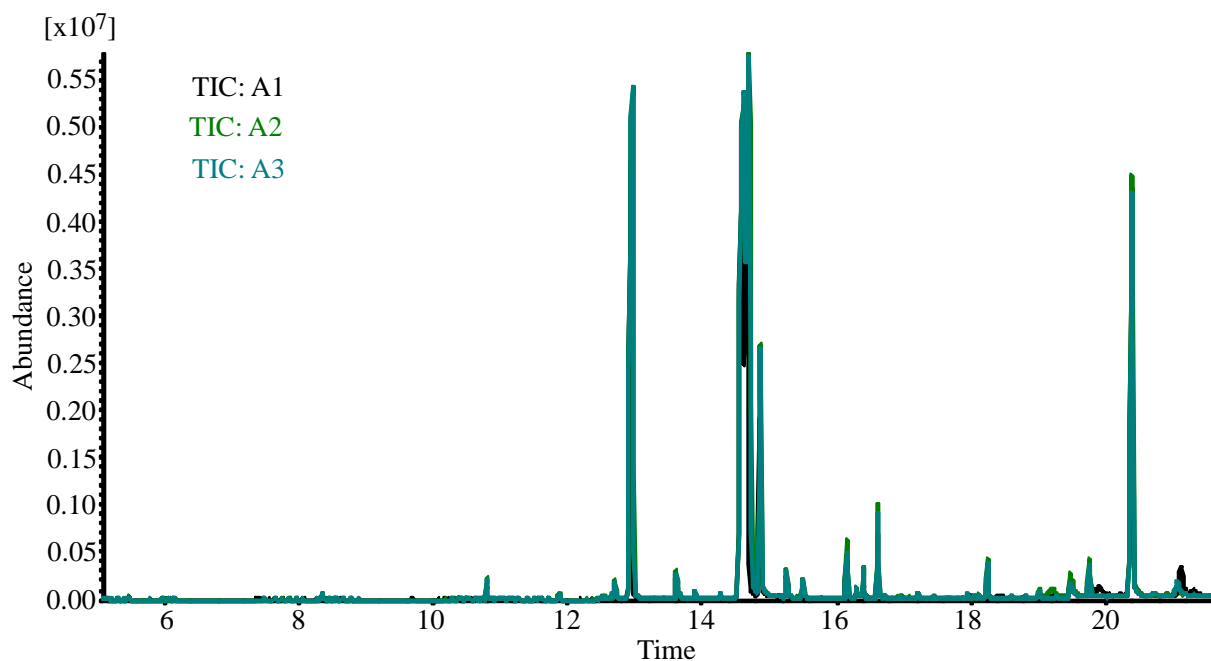
Slika XVII Preklopljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 2 genotipa tritikalea



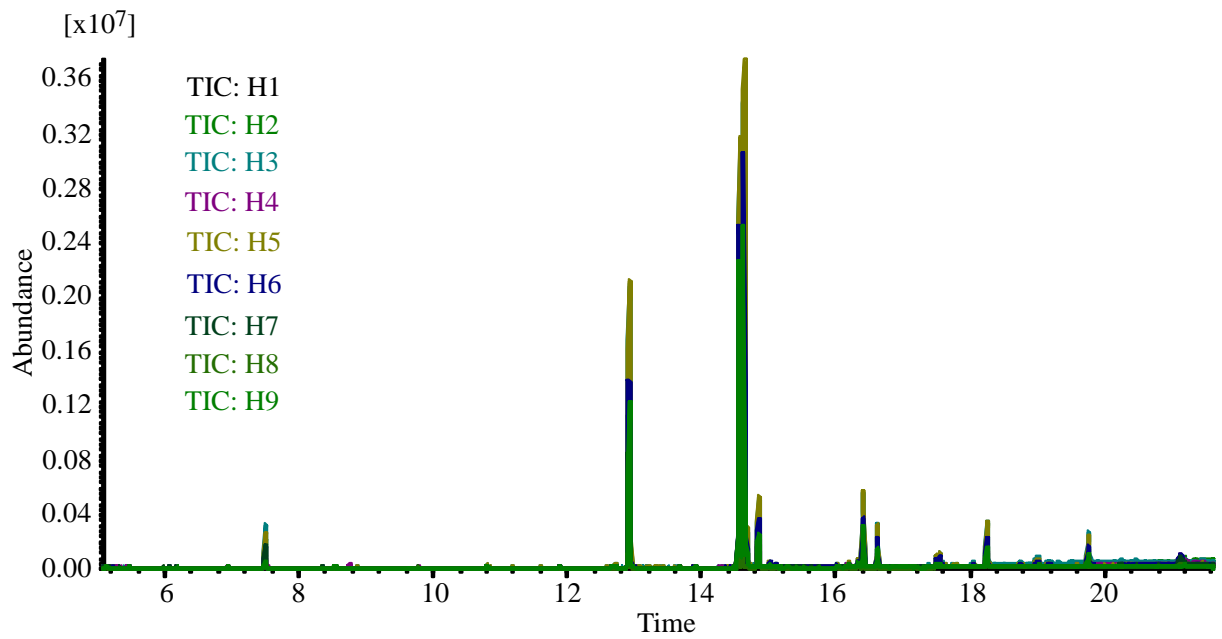
Slika XVIII TIC hromatogram komponenata prisutnih u liposolubilnom ekstraktu uzorka brašna genotipa raži



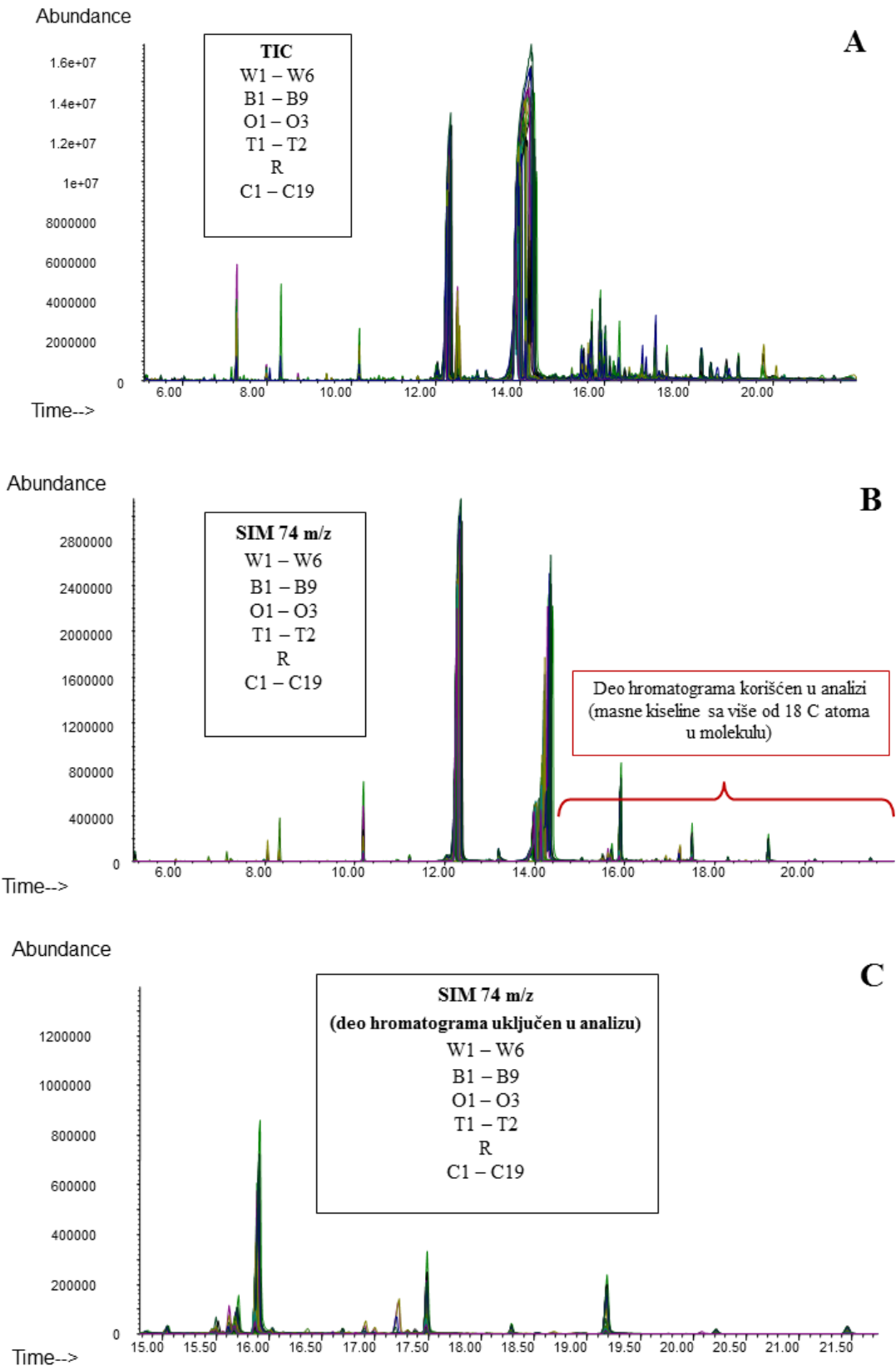
Slika XIX Preklapljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 3 genotipa spelte



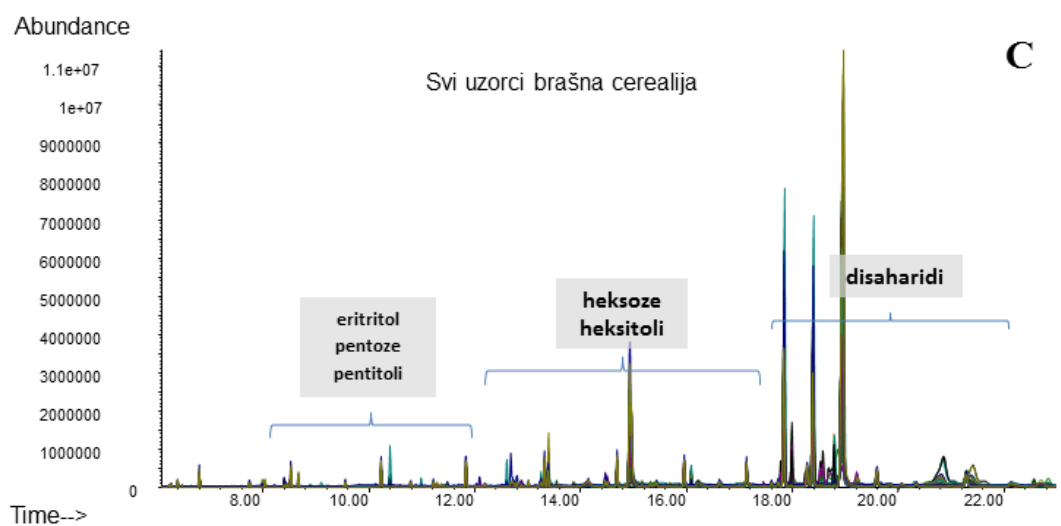
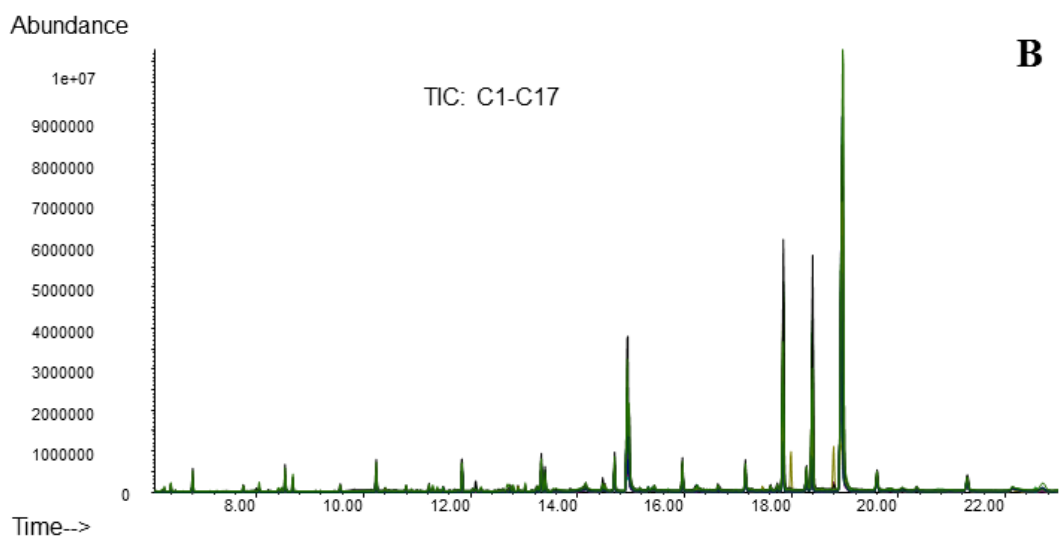
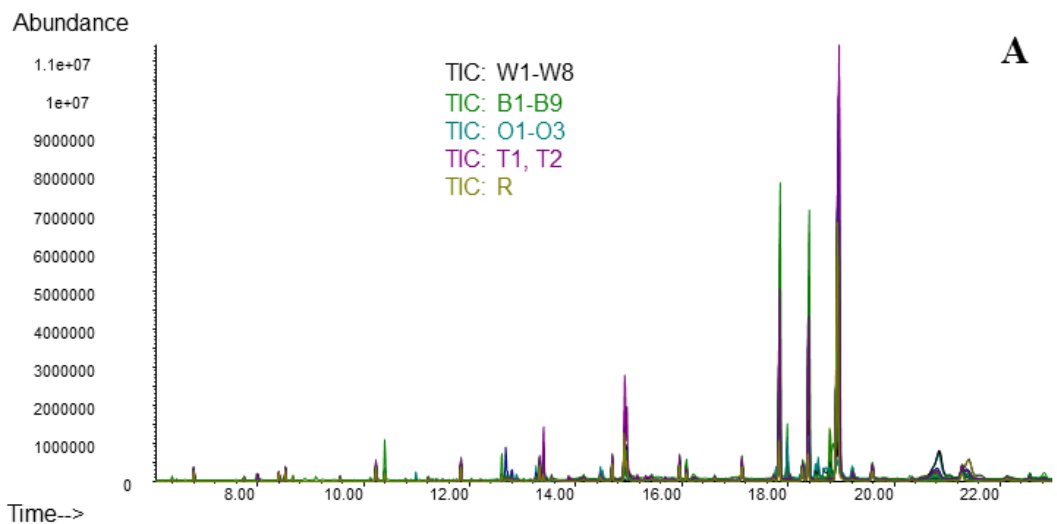
Slika XX Preklapljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 3 genotipa amarantusa



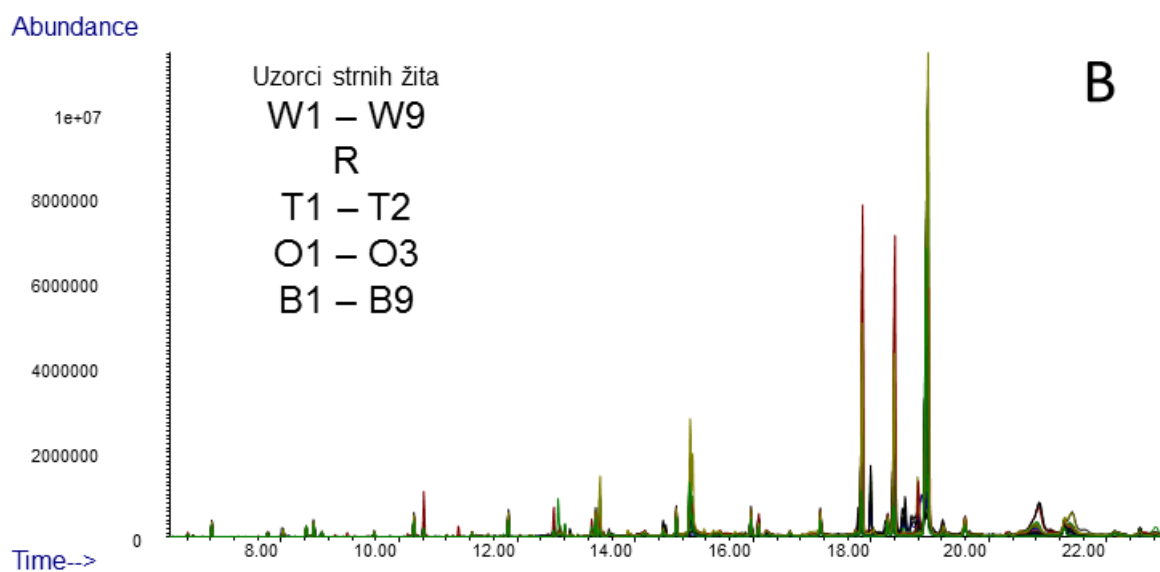
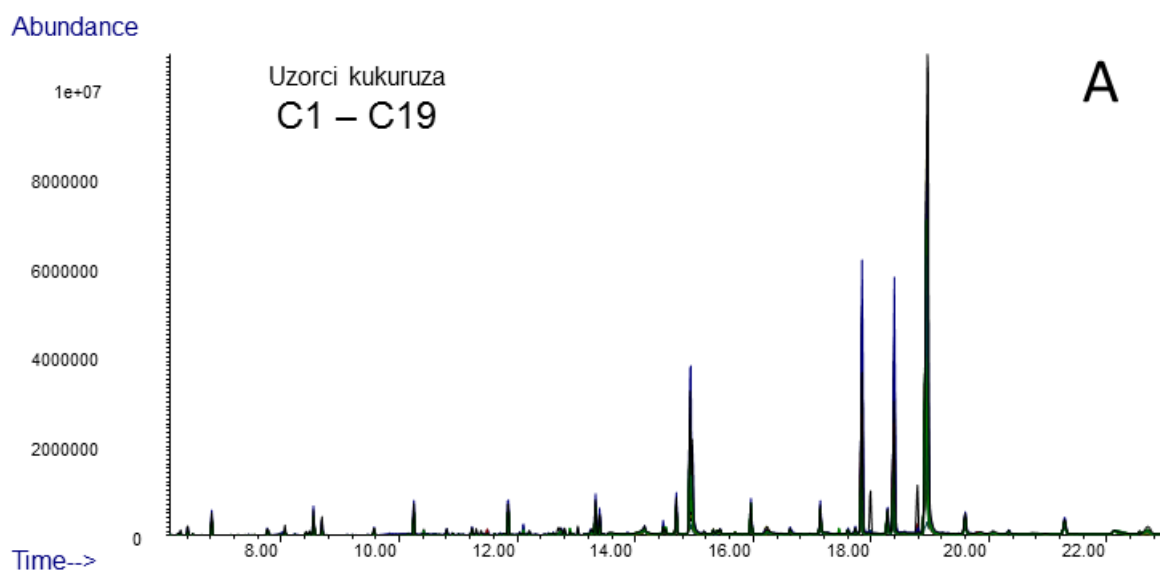
Slika XXI Preklapljeni TIC hromatogrami komponenta prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna 9 genotipova heljde



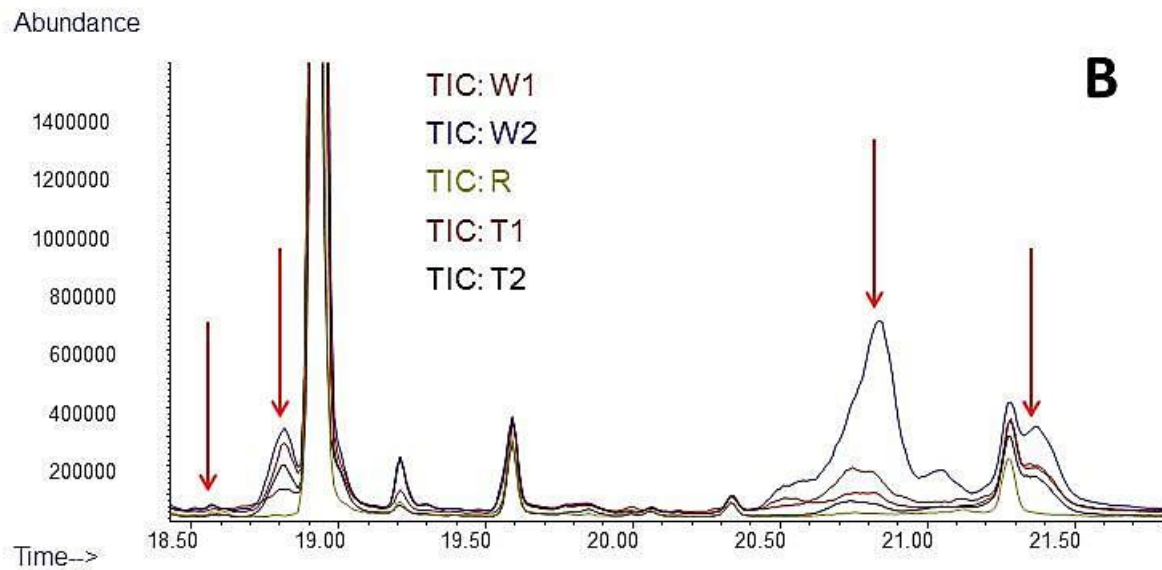
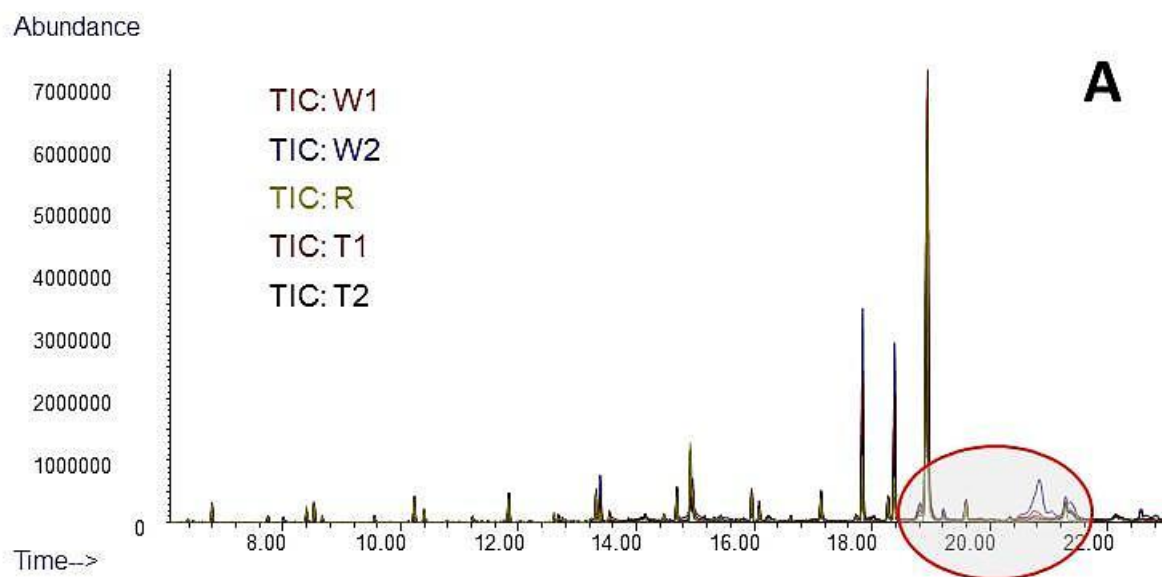
Slika XXII Preklapljeni (A) TIC hromatogrami i (B, C) jonski hromatogrami komponenta prisutnih u liposolubilnim ekstraktima uzoraka brašna različitih genotipova strnih žita i hibrida kukuruza



Slika XXIII Preklapljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima uzoraka brašna različitih genotipova (A) strnih žita, (B) hibrida kukuruza i (C) svih analiziranih vrsta cerealija

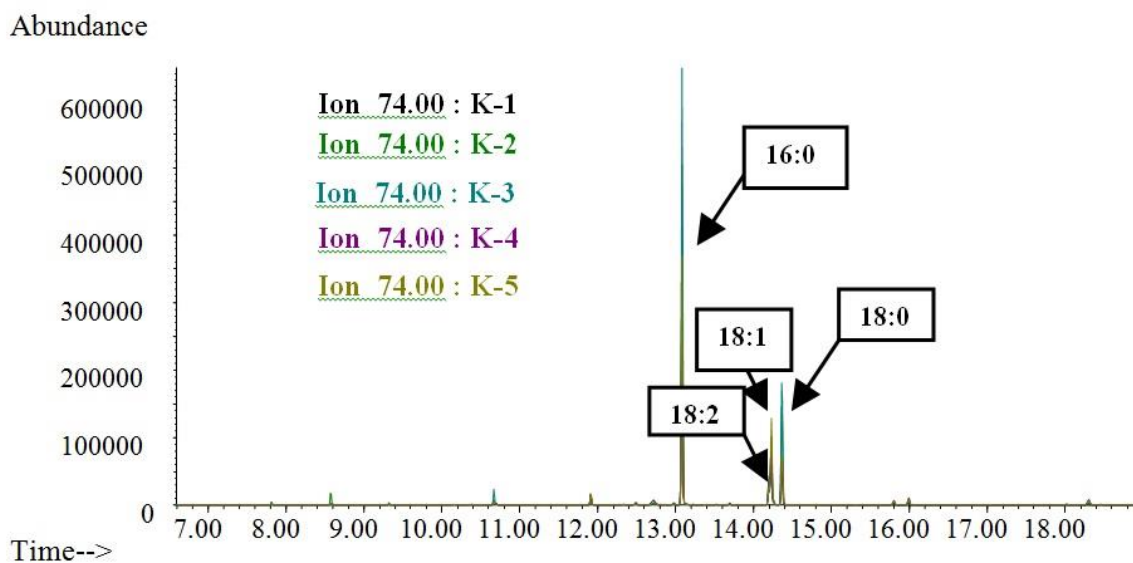


Slika XXIV Preklopljeni TIC hromatogrami komponenata prisutnih u hidrosolubilnim ekstraktima uzoraka brašna različitih genotipova (A) strnih žita (B) i hibrida kukuruza

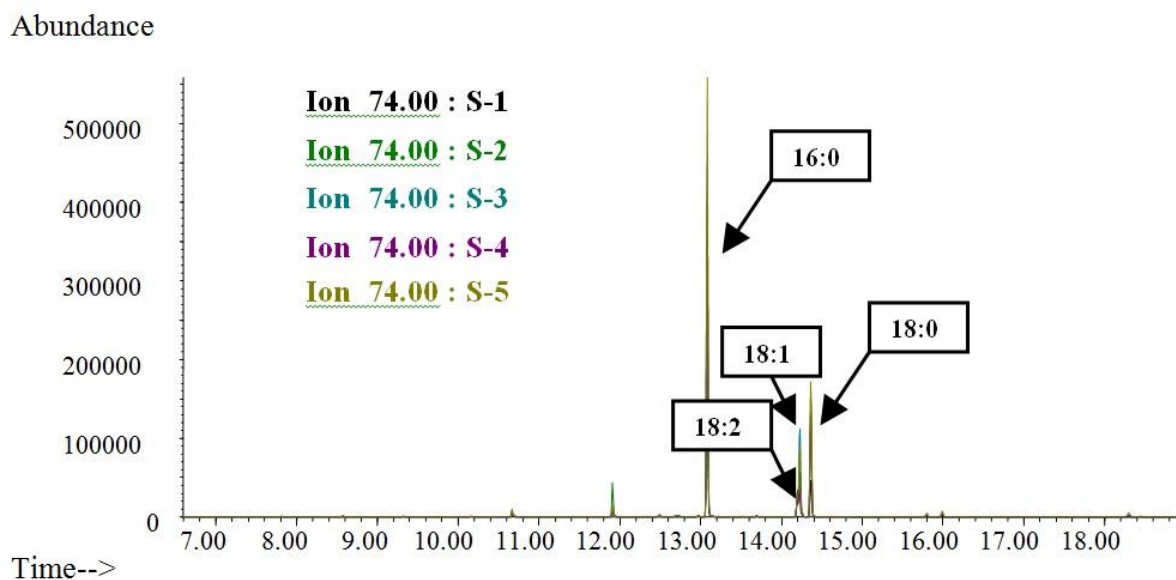


Slika XXV (A) Preklapljeni TIC hromatogrami hidrosolubilnih komponenata uzoraka brašna pšenice (W), raži (R) i tritikalea (T);

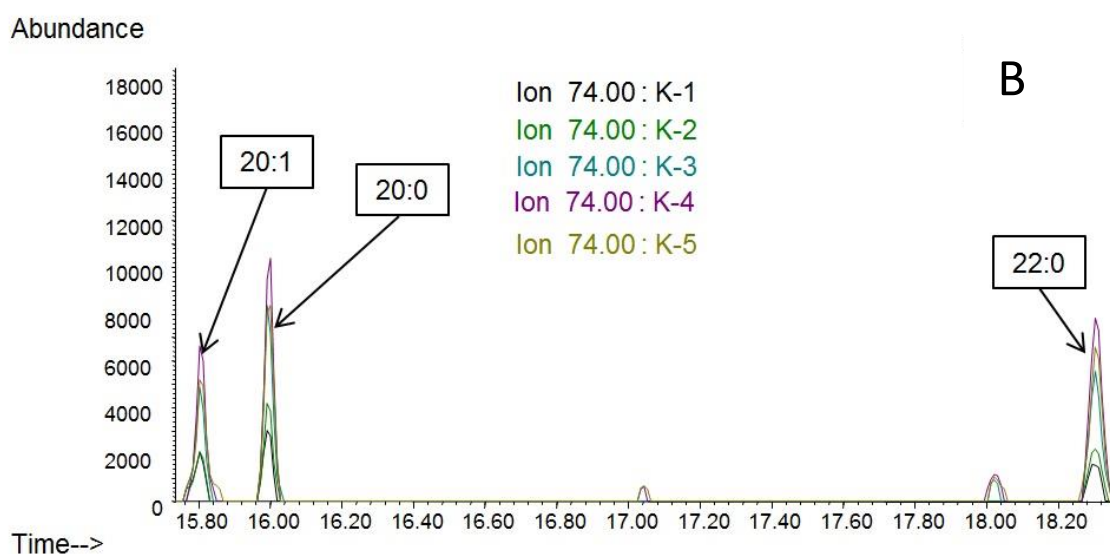
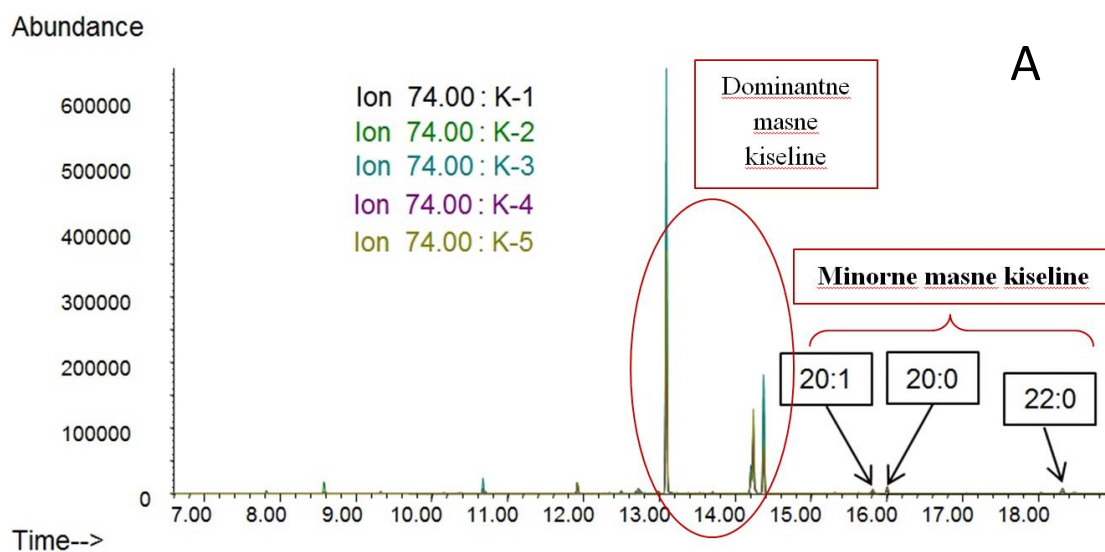
(B) Uvećan deo hromatograma na kom eluiraju pikovi izabrani kao faktori razlikovanja



Slika XXVI Preklopljeni jonski hromatogrami kora hleba sa različitim udelom heljdinog brašna (K-kora, uzorci kora K1, K2, K3, K4 i K5 sadrže redom 0, 20, 40, 50 i 60% brašna heljde)

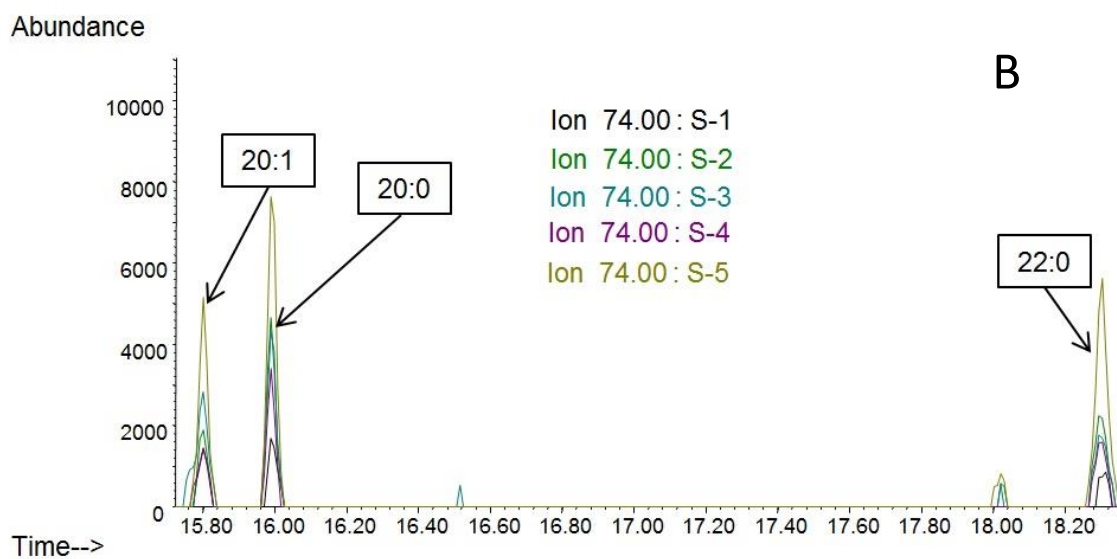
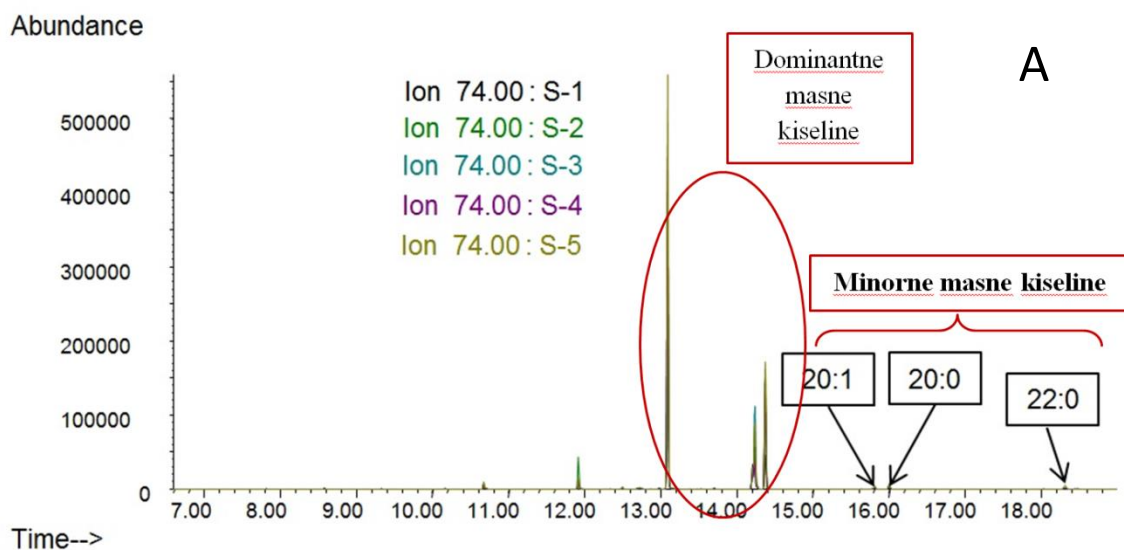


Slika XXVII Preklopljeni jonski hromatogrami sredina hleba sa različitim udelom heljdinog brašna (S-sredina, uzorci sredina S1, S2, S3, S4 i S5 sadrže redom 0, 20, 40, 50 i 60% brašna heljde)

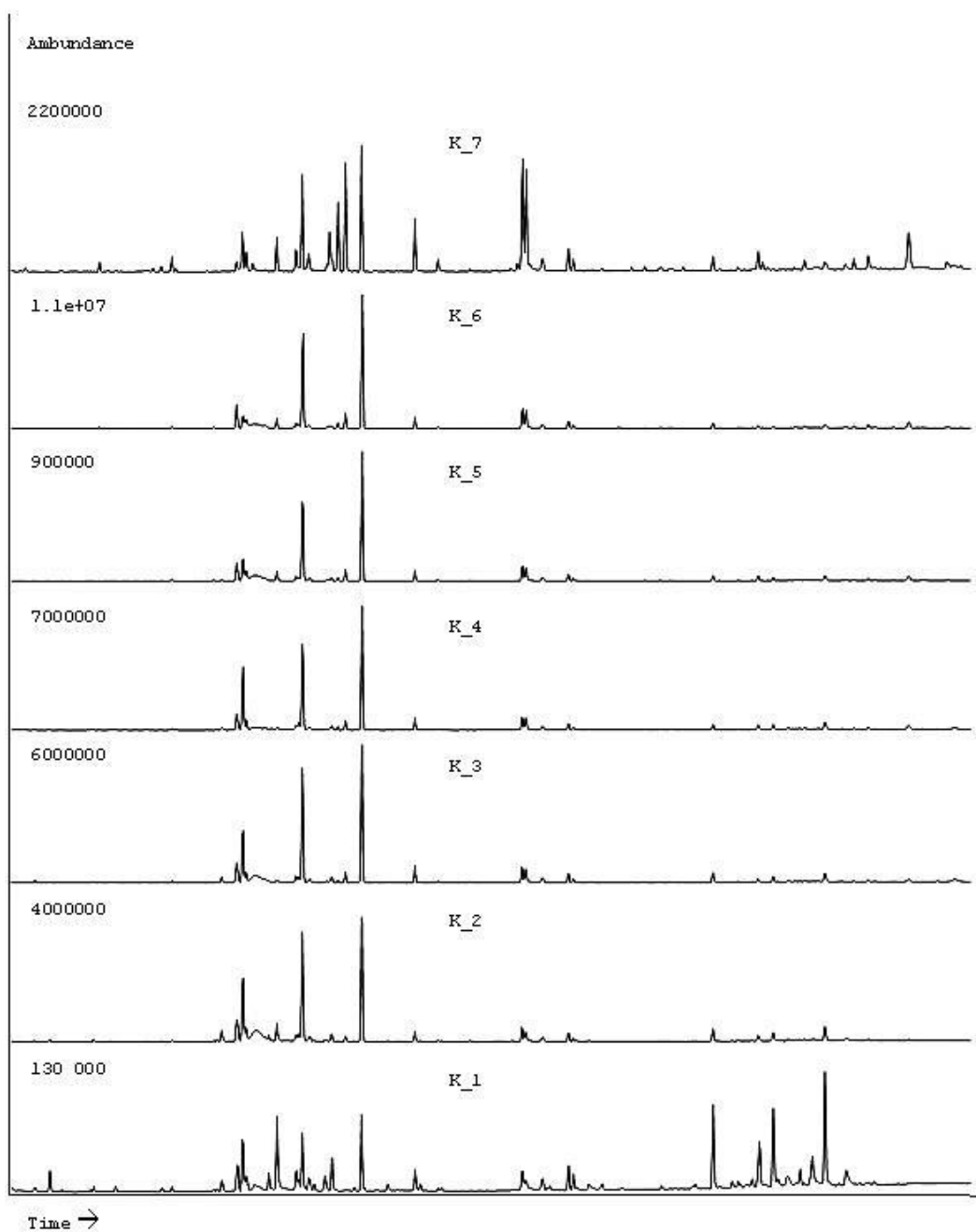


Slika XXVIII (A) Preklopljeni jonski hromatogrami kora uzoraka hleba sa različitim udelom heljdinog brašna (K-kora, uzorci kora K1, K2, K3, K4 i K5 sadrže redom 0, 20, 40, 50 i 60% brašna heljde);

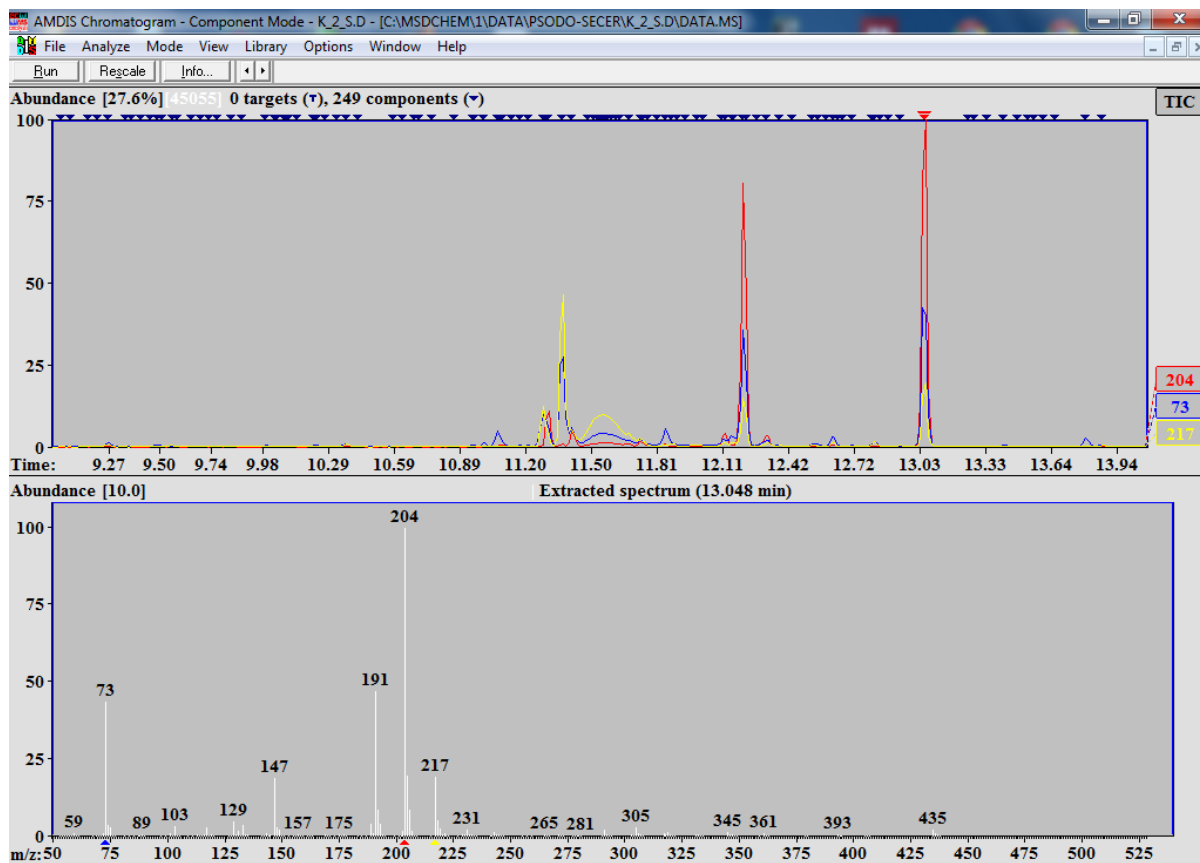
(B) Uvećani preklopljeni jonski hromatogrami kora uzoraka hleba sa metil-estrima karakterističnih minornih masnih kiselina



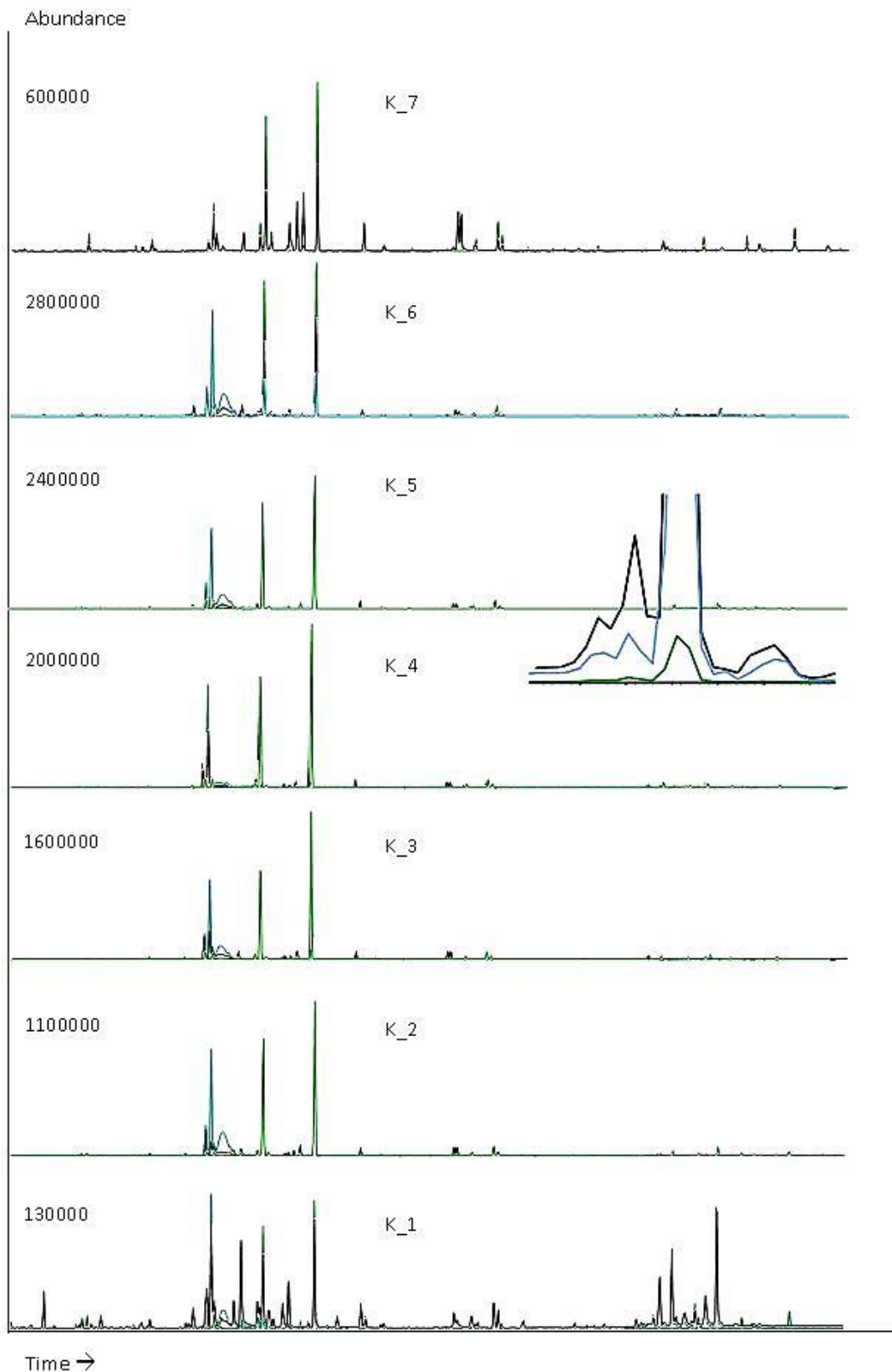
Slika XXIX (A) Preklopljeni jonski hromatogrami sredina uzoraka hleba sa različitim udelom heljdinog brašna (S-sredina, uzorci sredina S1, S2, S3, S4 i S5 sadrže redom 0, 20, 40, 50 i 60% brašna heljde);
 (B) Uvećani preklopljeni jonski hromatogrami sredina uzoraka hleba sa metil-estrima karakterističnih minornih masnih kiselina



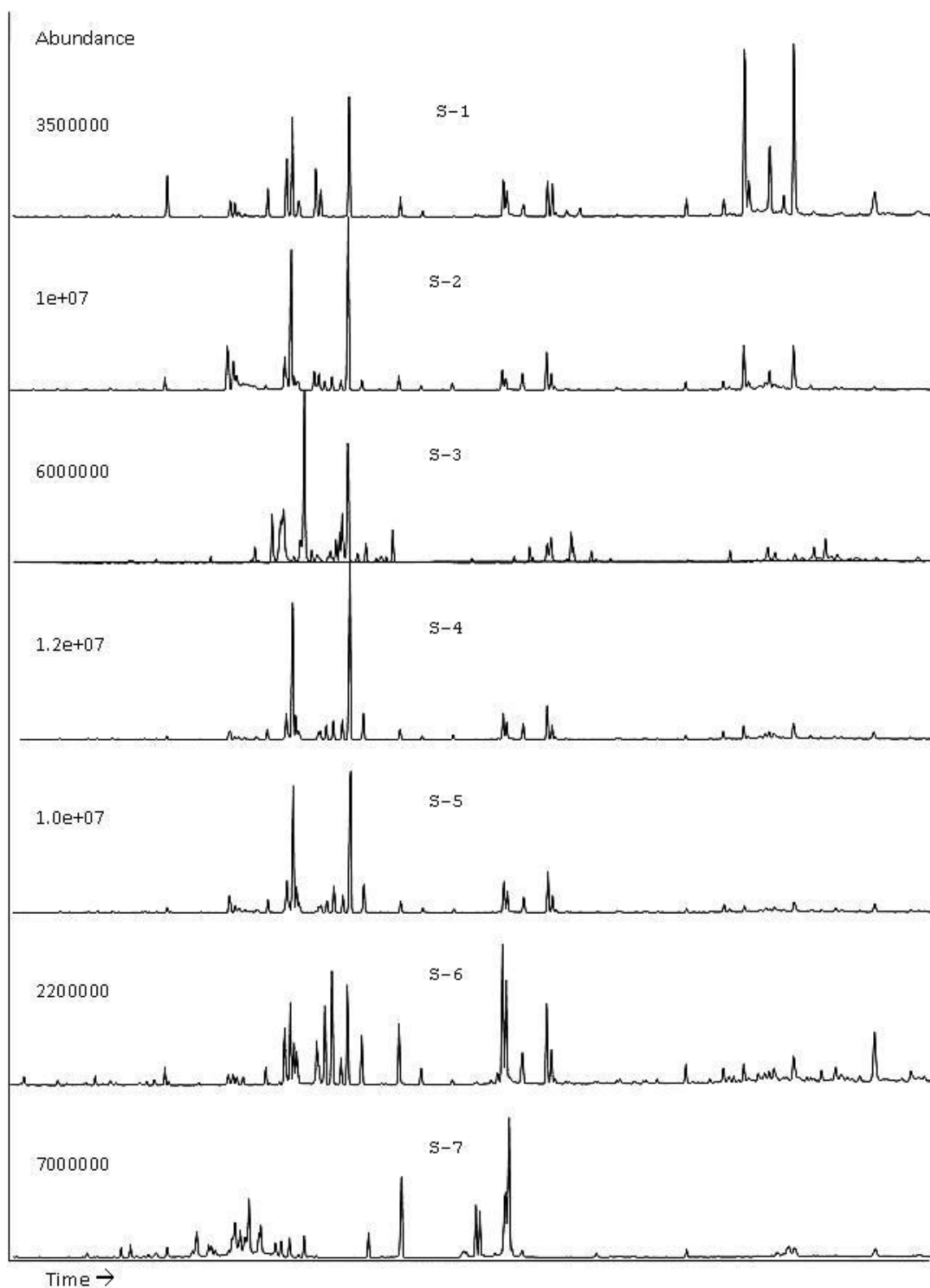
Slika XXX TIC hromatogrami kora svih 7 uzoraka proizvedenog hleba (K1-K7) od pšeničnog brašna sa dodatkom heljde (uzorci kora K1, K2, K3, K4, K5, K6 i K7 sadrže redom 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% brašna heljde)



Slika XXXI Primena AMDIS programa u postupku izdvajanja masenog spektra pika ugljenohidratne komponente, koji eluira na 13.048 min, sa karakterističnim fragmentnim jonima od 73 m/z , 204 m/z i 217 m/z



Slika XXXII Jonski hromatogrami masa 73 m/z , 204 m/z i 217 m/z svih 7 uzoraka proizvedenog hleba (K1-K7) od pšeničnog brašna sa dodatkom heljde (uzorci kora K1, K2, K3, K4, K5, K6 i K7 sadrže redom 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% brašna heljde)



Slika XXXIII TIC hromatogrami sredina 7 uzoraka proizvedenog hleba (S1-S7) od pšeničnog brašna sa dodatkom heljde (uzorci sredina S1, S2, S3, S4, S5, S6 i S7 sadrže redom 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% brašna heljde)

Biografija

Kristian (Arpad) Pastor rođen je 24. aprila 1987. godine u Novom Sadu, gde je završio osnovnu i srednju Medicinsku školu sa odličnim uspehom. Dalje školovanje nastavlja na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, gde završava osnovne i master studije. Doktorske akademske studije upisuje na smeru Prehrambeno inženjerstvo 2013. godine. Od 2014. godine angažovan je u zvanju istraživača na naučnoistraživačkom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom *Savremeno oplemenjivanje strnih žita za sadašnje i buduće potrebe*, čiji je nosilac Institut za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Tokom 2015. godine angažovan je i na naučnoistraživačkom projektu Pokrajinskog sekretarijata za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost AP Vojvodine, pod nazivom *Praktična metoda za kontrolu kvaliteta hleba, dobijenog supstitucijom pšeničnog brašna heljdinim brašnom*, čiji je nosilac Tehnološki fakultet u Novom Sadu. Time ostvaruje značajne rezultate, u vidu publikacija u stranim i domaćim naučnim časopisima, kao i izlaganjima na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu. Ostvareni rezultati naučnog rada na pomenutim projektima, usmereni na razvoj savremenih analitičkih metoda određivanja autentičnosti prehrambenih proizvoda, predstavljaju temelj za izradu ove doktorske disertacije. Pored toga, učestvuje i u istraživanjima vezanim za proizvodnju bioetanola iz otpadnih sirovina, superkritičnu proizvodnju biodizela iz algi i mikroalgi, fotokatalitičku degradaciju organskih polutanata primenom cink-oksidnih nanočestica i sintezu koloidnog zlata fizičkim metodama. Od 2014. godine, u proširenom sastavu Katedre za primenjene i inženjerske hemije Tehnološkog fakulteta, učestvuje u izvođenju praktične nastave sa velikim brojem studenata, na predmetu *Opšta i neorganska hemija*. Od početka svog angažovanja na fakultetu usavršava se na seminarima i studentskim razmenama u Beogradu, Petnici, u Beču (Austrija), Teheranu (Islamska Republika Iran) i Maskatu (Sultanat Oman). Član je dve evropske *COST* akcije, Srpskog hemijskog društva i sekretar Hemijskog društva Vojvodine. Tečno govori engleski i nemački jezik, a u životu ga najviše fascinira lepota zvuka i muzike.

Univerzitet u Novom Sadu
Tehnološki fakultet
Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Kristian (Arpad) Pastor, mast. inženjer
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Marijana Ačanski, redovni profesor
Naslov rada: NR	Autentičnost cerealija i pseudocerealija – razvoj novih metoda analize brašna i gotovih pekarskih proizvoda
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

Fizički opis rada: 7 poglavlja / 164 stranice / 11 tabela / 38 slika /
FO 251 referenca / prilog 1 (Pravilnik Sl. glasnika
RS) i 2 (33 slike)

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Prehrambeno inženjerstvo
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Cerealije, pseudocerealije, brašno, hleb, gasna
PO hromatografija, masena spektrometrija,
multivarijantna analiza, autentičnost

UDK

Čuva se: Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom
ČU Sadu

Važna napomena: Nema
VN

Izvod:
IZ

U ovoj doktorskoj disertaciji analizirano je brašno strnih žita (pšenice, spelte, ječma, raži, tritikalea, ovsa), prosolikog žita (kukuruz) i pseudocerealija (heljde i amarantusa) primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) u kombinaciji sa multivarijantnom analizom, u cilju ispitivanja mogućnosti za određivanje autentičnosti navedenih biljnih vrsta. U tu svrhu, iz brašna navedenih cerealija i pseudocerealija ekstrahovani su mali molekuli (lipidi i šećeri). Lipidne komponente brašna ekstrahovane su heksanom. Nakon višestrukog obezmašćivanja istih uzoraka brašna heksanom i sušenja, usledila je ekstrakcija šećernih komponenata 96%-tnim etanolom. Dobijeni heksanski i etanolni ekstrakti derivatizovani su odgovarajućim reagensima. Za derivatizaciju lipidnih komponenata korišćen je rastvor TMSH (trimetilsulfonijum hidroksida, 0,2 M u metanolu). Time se masne kiseline prevode u odgovarajuće metil-estre. Za derivatizaciju šećernih komponenata korišćen je etanolni rastvor natrijum-hidroksida i hidroksilamin-hidrohlorida u kombinaciji sa BSTFA (bis-(trimetilsilil-trifluoroacetamidom). Na taj način su prosti šećeri prevedeni u odgovarajuće trimetilsilil-oksime. Ovako pripremljeni ekstrakti uzoraka brašna su analizirani na GC-MS uređaju.

Dobijeni hromatogrami međusobno pokazuju veliku sličnost, a naročito u okviru uzoraka iste botaničke vrste. U obradi hromatograma i masenih spektara, korišćen je *MSD Productivity ChemStation* program uz primenu *Wiley 275* biblioteke masenih spektara. Dobijeni podaci analizirani su na tri načina. Prvi način podrazumeva kreiranje numeričkih matrica u modu ukupne jonske struje (*TIC*). Drugi postupak podrazumeva kreiranje numeričkih matrica izolovanjem karakterističnih fragmentnih

jona sa hromatograma (kod lipida 74 m/z , a kod šećera 73 m/z u kombinaciji sa bar jednim od sledećih jona: 204 m/z , 217 m/z , i 361 m/z). Kod trećeg načina obrade podataka, analiza je urađena kreiranjem matrica primenom binarnog sistema (1/0), gde „1“ označava prisustvo određene komponente, a „0“ označava njeno odsustvo u posmatranom uzorku. Tako dobijeni podaci podvrgnuti su multivarijantnoj analizi primenom statističkih programa – *PAST* i *STATISTICA*. U sva tri slučaja ispitivani uzorci grupisani su u međusobno jasno odvojene grupe, prema odgovarajućoj biljnoj vrsti. Uočeno je jasno razlikovanje pseudocerealijske (heljde i amarantusa) i prosolikog žita (kukuruza) od grupe strnih žita (pšenice, spelte, ječma, raži, tritikalea i ovsa). Primenjenim metodama postiže se manje selektivna klasifikacija biljnih vrsta u okviru strnih žita, sa izuzetkom uzoraka ovsa i spelte. Ovi rezultati pokazuju da je novim navedenim postupcima moguće utvrditi autentičnost brašna različitih botaničkih vrsta cerealijske i pseudocerealijske.

Na isti način tretirani su i uzorci proizvedenog hleba (kore i sredine) u kojima je pšenično brašno supstituisano sa 0, 20, 40, 50, 60, 80 i 100% heljdinog brašna. Multivarijantnom analizom GC-MS podataka dobijaju se jasno odvojeni klasteri u skladu sa porastom udela brašna heljde u kori i sredini hleba. Najbolji rezultati postignuti su korelacijom sastava i sadržaja ugljenohidratnih komponentata u kori hleba.

Krajnji ishod razvoja ovih novih originalnih metoda je mogućnost njihove praktične primene u cilju rutinskih kontrola kvaliteta brašna i gotovih pekarskih proizvoda u laboratorijama, proizvodnim pogonima i inspekcijским službama. Posebna pogodnost primene predloženih metoda je to što su one semi-kvalitativnog i semi-kvantitativnog karaktera, pa se mogu izvoditi bez tačne identifikacije eluirajućih malih molekula (lipida i prostih šećera), kao i njihove kvantifikacije primenom analitičkih standarda.

Datum prihvatanja teme od strane

Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:
KO

Prof. dr Snežana Kravić

Vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, predsednik

Dr Ankica Kondić-Špika

Naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, član

Prof. dr Marijana Ačanski

Redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, mentor

University of Novi Sad

Faculty of Technology

Key word documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monograph documentation

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

Author:

AU

MSc Kristian (Arpad) Pastor

Mentor:

MN

Prof. Dr. Marijana Ačanski, full professor

Title:

TI

Authenticity of cereals and pseudocereals -
development of new methods for the analysis of
flour and final bakery products

Language of text:

LT

Serbian, latin

Language of abstract:

LA

English/Serbian

Country of publication:

CP

Republic of Serbia

Locality of publication:

LP

AP Vojvodina

Publication year:

PY

2018.

Publisher:

PU

Author's reprint

Publication place:

PP

Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

Physical description: PD	7 chapters / 164 pages / 11 tables / 38 figures / 251 references / attachment 1 (Rulebook of the Official Gazette of Republic of Serbia) and attachment 2 (33 figures)
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Food Engineering
Subject, Key words SKW	Cereals, pseudocereals, flour, bread, gas chromatography, mass spectrometry, multivariate analysis, authenticity
UC	
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology in Novi Sad
Note: N	None

Abstract:

AB

In this doctoral thesis various flour samples of small grains (wheat, spelt, barley, rye, triticale, oats), corn and pseudocereals (buckwheat and amaranth) were analyzed using gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) in combination with multivariate analysis, in order to examine the possibilities for determining the authenticity of the plant species listed. Small molecules (lipids and sugars) were extracted from flour samples of the above-mentioned cereals and pseudocereals. The lipid components of the flour were extracted with hexane. The extraction of sugar components from the same flour samples was performed with 96% ethanol solution, after multiple defatting with hexane and drying of the samples. The obtained hexane and ethanol extracts were derivatized with appropriate reagents. For the derivatization of the lipid components, a solution of TMSH (trimethylsulfonium hydroxide, 0.2 M in methanol) was used. Thus, the fatty acids were converted into the corresponding methyl esters. For the derivatization of the sugar components, an ethanol solution of sodium hydroxide and hydroxylamine hydrochloride combined with BSTFA (bis- (trimethylsilyl trifluoroacetamide) was used. Thus, the free sugars were converted into the corresponding trimethylsilyl oximes. The derivatized extracts prepared in this manner were analyzed on a GC -MS device.

The obtained chromatograms were very similar, and especially within the samples of the same botanical species. In the processing of the chromatograms and mass spectra, MSD Productivity ChemStation program was used with the Wiley 275 Mass Spectra Library. The obtained data were processed in three ways. The first method involves the creation of numerical matrices in the total ion current mode (TIC). The second method involves the creation of numerical matrices by isolating characteristic ion fragments

from the TIC chromatograms (74 m/z for the lipid components, and 73 m/z in combination with at least one of the following ions: 204 m/z , 217 m/z , and 361 m/z , for the sugar components). In the third way of data processing, the analysis was done by creating a matrix using a binary system (1/0), where “1” denotes the presence of a particular component, and “0” denotes its absence in the observed sample. The data thus obtained were subjected to multivariate analysis using statistical programs - PAST and STATISTICA. In all three cases, the analyzed samples were grouped in clearly separated groups according to the appropriate plant species. A clear distinction was observed between pseudocereals (buckwheat and amaranth), corn and the group of small grains (wheat, spelt, barley, rye, triticale, oats). The applied methods achieved a less selective classification of plant species within the group of small grains, with the exception of oats and spelt samples. These results show that it is possible to determine the authenticity of flour of various botanical species of cereals and pseudocereals, applying new methods described in this doctoral thesis.

The samples of produced bread (crust and crumbs) in which wheat flour was substituted with 0, 20, 40, 50, 60, 80 and 100% of buckwheat flour were treated in the same way. Multivariate analysis of GC-MS data provided clearly separated clusters in accordance with the increase in the share of buckwheat flour in bread crusts and crumbs. The best results were achieved by correlating the composition and content of the carbohydrate components in bread crusts.

The ultimate outcome of the development of these new original methods is the possibility of their practical application for the purpose of routine quality control of flour and bakery products in laboratories, production facilities and inspection services. A particular advantage of applying the proposed methods is that they are semi-qualitative and semi-quantitative. Therefore, they can be performed without the exact identification of eluting small molecules (lipids and free sugars), nor their quantification using analytical standards.

Accepted on Senate on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

Dr Snežana Kravić

Associate professor, Faculty of Technology
Novi Sad, University of Novi Sad, chairman

Dr Ankica Kondić-Špika

Principal Research Fellow, Institute of Field and
Vegetable Crops Novi Sad, member

Dr Marijana Ačanski

Full professor, Faculty of Technology Novi Sad,
University of Novi Sad, mentor

