

LITERATURA

Baross, J. A., Matches, J. R. (1984): Halophilic microorganisms, chapter 13, SPECK MARVIN L., Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association, Washington, D.C.

Beganović, A. H. (1975): Mikrobiologija mesa i mesnih prerađevina, Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo, 84 - 86, 125.

Garrity, G. M., J. A. Bell, T. G. Lilburn (2003): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 nd edition, Springer-Verlag, New York, USA.

Onishi, H., H. Fuchi, K. Konomi, O. Hidaka, and M. Kamekura (1980): Isolation and distribution of a variety of halophilic bacteria and their classification by salt-response. Agric. Biol. Chem. 44, 1253-1258.

Shah, V. H., and J. D. H. De Sa (1964): Studies on halotolerant and halophilic bacteria. I. Isolation and salt response. Indian J. Exp. Biol. 2, 181-184.

Šoša, B. (1989): Higijena i tehnologija prerade morske ribe, Školska knjiga, Zagreb, 121 - 124.

Ventosa A., J. J. Nieto, A. Oren (1998): Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 504-544.

Vilhelmsson, O., H. Hafsteinsson, and J. K. Kristjánsson (1996): Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from fully cured salted cod (bachalao). J. Appl. Bacteriol. 81, 95-103.

Villar, M., A. P. de Ruiz Holgado, J. J. Sanchez, R. E. Trucco, and G. Oliver (1985): Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). Appl. Environ. Microbiol. 49, 664-666.

Živković, J. (1986): Higijena i tehnologija mesa II dio, Kakvoća i prerada, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 64, 89. ■

PRIMJENA EPR SPEKTROSKOPIJE PRI KONZERVIRANJU NAMIRNICA IONIZACIJSKIM ZRAČENJEM

I DIO. PRECIZNO MJERENJE DOZE IONIZACIJSKOG ZRAČENJA POMOĆU EPR/ALANINSKE DOZIMETRIJE

Maltar-Strmečki¹, N., B. Rakvin²

SAŽETAK

Paramagnetski centri u L-alaninu ozračenom - zračenjem pokazuju izuzetnu stabilnost u vremenu, a njihova koncentracija proporcionalna je dozi ionizacijskog zračenja za veliki raspon doza (0.5-105 Gy). Ove karakteristike

čine osnovu na kojoj se zasniva dozimetrija uz pomoć elektronske paramagnetske rezonancije (EPR/Alaninska dozimetrija). U ovom radu dan je osvrt na primjenu EPR/Alaninske dozimetrije.

Ključne riječi: ionizacijsko zračenje, alanin, EPR

¹Mr. sc. Nadica Maltar-Strmečki, asistent, Zavod za fiziku i biofiziku, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb

²Dr. sc. Boris Rakvin, znanstveni savjetnik, Institut "Ruđer Bošković", Zavod za fizičku kemiju, voditelj Laboratorija za magnetske rezonancije, Bijenička cesta 54, Zagreb, redoviti profesor, Zavod za fiziku i biofiziku, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb

UVOD

U nastojanjima da se iznađu što uspješniji postupci konzerviranja namirnica pažnju privlači i ionizirajuće zračenje. Izlaganjem namirnica djelovanju ionizirajućeg zračenja usporavaju se neki fiziološki procesi i uklanjaju mikroorganizmi koji prate određene namirnice, bilo kao mikroflora ili kao naknadna kontaminacija, a da pritom ne povećavaju znatnije temperaturu, radi čega se konzerviranje ionizirajućim zračenjem naziva još i hladnom sterilizacijom. Ovdje svakako valja naglasiti kako u praktičnoj primjeni hladne sterilizacije nailazimo na mnogobrojne probleme, prije svega prilikom neadekvatne uporabe zračenja (organoleptičke promjene u mesu, stvaranje slobodnih radikala itd.). Primjena ionizacijskog zračenja u konzerviranju namirnica na svjetskom tržištu, zakonska regulativa vezana uz upotrebu tehnologije zračenja i zahtjev potrošača za jasnom deklaracijom ozračenih namirnica naglasila je potrebu i važnost točnog određivanja optimalne doze zračenja.

Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) je spektroskopska metoda (Weil i sur., 1994) koja omogućuje detektiranje spinskih magnetskih momenta nesparenih elektrona. Pomoću nje se mogu detektirati i radikali koji nastaju međudjelovanjem ionizacijskog zračenja i tvari. Paramagnetski sistem tvori nespareni elektron u interakciji s vanjskim magnetskim poljem, te električnim i magnetskim poljem svoje okoline. Mnoštvo istraživanja u fizici, kemiji i biologiji vezano je uz ispitivanje dinamike paramagnetskih sistema i okoline (rešetke) u kojoj se oni nalaze. EPR metoda omogućuje istraživanje strukture i dinamike elektronskih paramagnetskih sistema, kao i njihovog međudjelovanja s rešetkom.

EPR U DOZIMETRIJI

U radu Gordy-a i sur. (1955) prvi su put detektirani signali radikala stvoreni međudjelovanjem ionizacijskog zračenja i tvari. Primjenu EPR spektroskopije u dozimetriji ionizacijskog zračenja nagovijestili su Box i Freud (1959). Bradshaw i sur (1962) predložili su upotrebu alanina kao dozimetra. Od tada do danas EPR dozimetrija (Regulla i Deffner, 1982; McLaughlin, 1993) primjenjuje se u različite svrhe.

Neki materijali na kojima se vrše istraživanja su alanin, kosti, zubna caklina i kvarc.

Tradicionalne metode dozimetrije temelje se na efektima zračenja u anorganskim tvarima. Tipični primjeri su ionizacija u zraku (ionizacijska komorica), depozicija topline u ugljiku ili metalima (kalorimetrija), koloracija u otopini željezova(II) sulfata (Frickeova dozimetrija), luminiscencija u čvrstim tvarima (termoluminiscentna dozimetrija). Nasuprot tome, EPR dozimetrija upotrebljava organske tvari u čvrstom stanju, u našem slučaju aminokiselinu (L-alanin). Biološki važan i kvantitativno mjerljiv efekt zračenja u organskim tvarima je stvaranje radikala. Slobodni radikali, odnosno paramagnetski centri nastali u L-alaninu pod utjecajem ionizacijskog zračenja su dugoživi stabilni produkti zračenja i njihova se koncentracija ne mijenja tijekom vremena. Koncentracija paramagnetskih centara u ozračenom L-alaninu je proporcionalna dozi ionizirajućeg zračenja za veliki raspon doza (od 0.5 do 10^5 Gy). Te karakteristike čine osnovu na kojoj se zasniva dozimetrija uz pomoć elektronske spinske rezonancije (EPR/Alaninska dozimetrija). S druge strane, gustoća L-alanina (u intervalu 1.15-1.32 g/cm³) je pogodna za dozimetriju stoga što je time ispunjen zahtjev da gustoća i elektronska gustoća moraju biti što bliži onima od vode (≈ 1.0 g/cm³) i usko vezani s onima od ljudskog tkiva (hrskavica 1.09 g/cm³, tekuće tvari kao krv, žuč, mozak itd. 1.01-1.06 g/cm³, mast 0.92 g/cm³, kosti 1.9 g/cm³), a to omogućuje vezu apsorbirane doze u materijalu s apsorbiranom dozom u tkivu. To je još jedna prednost L-alanina u odnosu na neke druge dozimetre (gustoća LiF u termoluminiscentnom dozimetru 2.63 g/cm³, a Si u diodnom dozimetru 2.33 g/cm³).

Općenito, kao dozimetar može se koristiti čisti polikristalinični prah L-alanina uvijek iste mase i oblika (Regulla i Deffner, 1982; McLaughlin, 1993). Zbog praktičnih razloga i mogućnosti masovne proizvodnje prah se oblikuje u valjak promjera do 5 mm i visine do 10 mm u sastavu do 90% L-alanina i 10% materijala (parafin, polietilen) koji služi kao vezivni element pri oblikovanju dozimetra, a ne doprinosi EPR signalu. Koncentracija paramagnetskih centara u takvom ozračenom dozimetru detektira se pomoću EPR spektrometra.

PRIMJENA EPR/ALANINSKE DOZIMETRIJE

Mnogi radovi (Kudynski i sur., 1993; Kuntz i sur., 1996; Mehta i Girzikowsky, 1996; Schaecken i Scalliet, 1996; Sharpe i sur. 1996; Haskell i sur., 1998; Wu i sur., 1998; Farnstein i sur., 2000; Nagy i sur., 2000; Sleptchonok i sur., 2000) pokazuju da je L-alanin pogodan za dozimetriju zbog svoje dobre osjetljivosti na utjecaj zračenja, linearne ovisnost EPR signala o dozi, stabilnosti radikala proizvedenih zračenjem i sličnosti s obzirom na biološke sisteme. Važno je naglasiti da se L-alaninski dozimetar lako proizvodi u velikim količinama i omogućuje nedestruktivno očitavanje apsorbirane doze.

EPR/Alaninska dozimetrija omogućuje direktno, točno i brzo, mjerenje apsorbirane doze. Stoga je metoda je pogodna za primjenu u kontroli procesa ozračivanja hrane, kada se ona zrači zbog sterilizacije ili produženja vijeka trajanja (Stachowicz, 1995; Desrosiers, 1996). Moguće ju je koristiti i pri kontroli ozračivanja farmakoloških i medicinskih instrumenata. Osim te industrijske primjene, metoda je pogodna za upotrebu u medicini za kontrolu i dokumentaciju apsorbiranih doza u procesima radioterapije ili kao osobni dozimetar za ljude koji rade s radioaktivnim tvarima, te pri dozimetrijskim proučavanjima nuklearnih nesreća.

Primjena metode pokazana je velikim brojem istraživanja i rezultatima u praktičnoj primjeni (Kudynski i sur., 1993; Desrosiers, 1996; Kuntz i sur., 1996; Mehta i Girzikowsky, 1996; Schaecken i Scalliet, 1996; Sharpe i sur., 1996; Haskell i sur., 1998; Wu i sur., 1998; Farnstein i sur., 2000; Nagy i sur. 2000; Sleptchonoki i sur., 2000; Stachowicz i sur., 1995). EPR/Alaninska dozimetrija zbog svoje dobre prostorne rezolucije upotrebljava se za kreiranje trodimenzionalnih fantoma (Schaecken i Scalliet, 1996) koji služe za studiranje vrlo točnih doznih distribucija. Pokazano je da je točnost mjerenja doze u procesu radioterapije najmanje 3% bolja, što je 2 puta više od ostalih korištenih tehnika pod normalnim kliničkim uvjetima (Mehta i Girzikowsky, 1996). Prednost metode kod radioterapije u tome što je metoda nedestruktivna, može se koristiti isti uzorak svaki put pozicioniran na istom mjestu u procesu frakcione radioterapije, te se po

završetku procesa može odrediti ukupna primljena doza. Prednost EPR mjerenja je u tom pristupu je da greška smanjuje kako se doza povećava.

Problemi koji ograničavaju primjenu i ostaju za rješavanje u daljnjim istraživanjima su: neuniformni pozadinski signal, nedovoljno istražen utjecaj parametara vezanih za pohranu dozimetara na duži rok (Haskel i sur., 1998; Nagy i sur., 2000 Sleptchonok i sur., 2000), interferencija uzrokovana signalima koji nisu relevantni za dozu, te kalibracijski problem. Ti problemi vode na neočekivane greške i smanjuju točnost očitavanja apsorbirane doze. Stoga razvoj metode treba ići u smjeru poboljšanja detekcijske metode i traženju novih materijala.

Na Institutu "Ruđer Bošković" osposobljena je metoda za preciznu dozimetriju u Laboratoriju za magnetske rezonancije. Metoda se bazira na komercijalnim L-alaninskim dozimetrima (Bruker). Točnost metode osigurana je usklađivanjem doze s internacionalnim standardima ozračenim u National Physical Laboratory (NPL) u Londonu, Velika Britanija, uz koje je dobiven certifikat o dozi zračenja.

SUMMARY

APPLICATION OF EPR SPECTROSCOPY IN PRESERVATION OF FOODSTUFF WITH IONIZING RADIATION

1. PART - ACCURATE DETECTION OF IRRADIATION DOSE BY EPR/ALANINE DOSIMETRY

Stability of paramagnetic centers in -irradiated L-alanine at room temperature and its linear dependence of concentration in the wide range of irradiation dose (0.5-105 Gy) are the most important properties of EPR/alanine dosimeter. In this paper, a review is presented about the use of EPR/alanine dosimetry.

LITERATURA

- Brstilo, M., M.Ložkić, Danijela Lamer, A.Gašpar (2003):** LegisBox H. C., Freund H. G., (1959) Paramagnetic resonance shows radiation effects, *Nucleonics*, 17(1), 66-76.
- Bradshaw W. W., D. G. Cadena, E. W. Crawford, H. A. Spetzler, (1962)** The use of alanine as a solid dosimeter, *Radiat. Res.* 17(1), 11-21.
- Desrosiers, F. Marc (1996)** Current status of the EPR method to detect irradiated food o *Appl. Radiat. Isot*, 47, Issues 11-12, 1996, 1621-1628
- Farnstein C., E. Winkler, M. Saravi, (2000)** ESR/Alanine -

dosimetry in the 10-30 Gy range, *Appl. Radiat. Isot.* 52, 1195-1196.

Gordy W., Ard W. B., Shields H., (1955) Microwave spectroscopy of biological substances. I. Paramagnetic resonance in X-irradiated amino acids and proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 41, 983-1004.

Haskell E. H., Hayes R. B., Kenner G. H., (1998) A high sensitivity EPR technique for alanine dosimetry, *Radiat. Prot. Dosim.* 77, 43-49.

Kudynski R., Kudynska J., Buckmaster H. A. (1993) The application of EPR dosimetry for radiotherapy and radiation protection, *Appl. Radiat. Isot.* 44, 903-906.

Kuntz F., Pabst J.Y., Delpech J. P., Wagner J. P., Marchioni E., (1996) Alanine-ESR in vivo dosimetry: a feasibility study and possible applications, *Appl. Radiat. Isot.* 47, 1183-1188.

McLaughlin W. L., (1993) ESR dosimetry, *Radiat. Prot. Dosim.* 47, 255-262.

Mehta K., Girzikowsky R., (1996) Alanine-ESR dosimetry for radiotherapy IAEA experience, *Appl. Radiat. Isot.* 47, 1189-1191.

Nagy V., Puhl J. M., Desrosiers M. F., (2000) Advancement in accuracy of the alanine dosimetry system. Part 2: The influence of the irradiation temperature, *Radiat. Phys. Chem.* 57, 1-9.

Regulla D. F., Deffner U., (1982) Dosimetry by ESR spectroscopy of alanine, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 33, 1101-1114.

Schaeken B., Scalliet P., (1996) One year of experience with alanine dosimetry in radiotherapy, *Appl. Radiat. Isot.* 47, 1177-1182.

Sharpe P. H. G., Rajendran K., Sephton J. P., (1996) Progress towards an alanine/ESR therapy level reference dosimetry service at NPL, *Appl. Radiat. Isot.* 47, 1171-1175.

Sleptchonok O. F., Nagy V., Desrosiers M. F., (2000) Advancement in accuracy of the alanine dosimetry system. Part 1: The effects of environmental humidity, *Radiat. Phys. Chem.* 57, 115-133.

Stachowicz, W., G. Burli ska, J. Michalik, A. Dziedzic-Gocawska and K. Ostrowski (1995): The EPR detection of foods preserved with the use of ionizing radiation o *Radiat. Phys. Chem.* 46, Issues 4-6 1995, 771-777

Weil J. A., Bolton J. R., Wertz J. E. (1994): Electron Paramagnetic Resonance, John Wiley & Sons, New York, 1994.

Wu K., Guo L., Cong J. B., Sun C. P., Hu J. M., Zhou Z. S., Wang S., Zhang Y., Zhang X., Shi Y. M., (1998) Researches and applications of ESR dosimetry for radiation accident dose assessment, *Nucl. Technol. Pub.* 77, 65-67. ■

Omisakin, F., M. Macrae, I. D. Ogden, N. J. C. Strachan (2003): Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. **Koncentracija i učestalost bakterije *Escherichia coli* O157 u fecesu junadi na liniji klanja. *Applied and Environmental Microbiology*, 2444-2447.**

Autori su u periodu od svibnja do srpnja 2002. istraživali učestalost bakterije *Escherichia coli* O157 u fecesu junadi u trenutku privođenja klanju. Uzorci fecesa (n = 589) sakupljeni su iz rektuma zaklane junadi. Od ukupno 44 pozitivna uzorka, u 9 % njih utvrđena je *Escherichia coli* O157 u broju višem od 10⁴ g⁻¹. Tih 9 % je predstavljalo čak 96 % od utvrđenog broja *E. coli* O157 u svim uzorcima. U svim izolatima je utvrđen vt₂ gen, u 39 izolata eaeA, a u 5 izolata vt₁ gen. Utvrđeni visok broj *Escherichia coli* O157 u pojedinim uzorcima fecesa klaoničke junadi ukazuje na povećan rizik i moguću kontaminaciju mesa tijekom klaoničke obrade, te nužnost analize rizika i utvrđivanja kritičnih kontrolnih točaka.

Cleveland McEntire, J., T. J. Montville, M. L. Chikindas (2003): Synergy between Nisin and Select Lactates against *Listeria monocytogenes* is due to the metal cations. **Sinergizam između nizina i laktata protiv bakterije *Listeria monocytogenes* putem metalnih kationa. *Journal of Food Protection* 66, 1631-1636.**

Bakterija *Listeria monocytogenes*, glavni patogen iz hrane, odgovorna je za mnogobrojne pojave oboljenja ljudi. U kontroli patogena iz hrane komercijalno se koriste organske kiseline i antimikrobni peptidi (bakteriocini) poput nizina koje stvaraju bakterije mliječne kiseline. U ovom radu je istražen učinak mliječne kiseline i njezinih soli u kombinaciji sa komercijalnim preparatima nizina na rast bakterije *Listeria monocytogenes* soja Scott A i nizin-rezistentnog soja. Zbog porasta aktivnosti pri nižim pH vrijednostima, nizin je pokazivao veću inhibitornu aktivnost spram *Listeria monocytogenes* kada je korišten u kombinaciji sa mliječnom kiselinom. Većina soli mliječne kiseline, uključujući i kalijev laktat, djelomično su inhibirale