Primjena gama zračenja u prevenciji izloženosti mikotoksinima

Bazijanec, Davor

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:670162

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Davor Bazijanec

Primjena γ zračenja u prevenciji izloženosti mikotoksinima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na povjerenju i podršci te prenesenom iskustvu i znanju. Također zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj ljubavi, podršci i razumijevanju kroz cijeli studij.

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 PLIJESNI 1
1.2 MIKOTOKSINI 2
1.2.1 Aflatoksini 3
1.2.1.1 Zdravstvene posljedice izloženosti aflatoksinima 5
1.2.2 Okratoksini 6
1.2.3 Zeralenon 6
1.2.4 Fumonizini 7
1.3 SPRJEČAVANJE IZLOŽENOSTI MIKOTOKSINIMA 7
2 OBRAZLOŽENJE TEME 10
3 MATERIJALI I METODE 11
4 REZULTATI I RASPRAVA 12
4.1 ELEKTROMAGNETSKO ZRAČENJE 12
4.1.1 Ionizirajuće zračenje 12
4.1.1.1 Vrste ionizirajućeg zračenja 12
4.1.1.2 Mjerenje ionizirajućeg zračenja 14
4.1.1.3 Utjecaj ionizirajućeg zračenja na stanice i žive organizme 14
4.2 PRIMJENA γ ZRAČENJA U ZAUSTAVLJANJU RASTA PLIJESNI 17
4.2.1 Ispitivanja *in vitro* 17
4.2.2 Ispitivanja na prirodno kontaminiranim uzorcima hrane 17
4.2.3 Ispitivanja utjecaja γ zračenja na rast plijesni i kvalitetu namirnica 19
4.2.4 Ispitivanja utjecaja γ zračenja na rast plijesni i proizvodnju mikotoksina 21
4.3 PRIMJENA γ ZRAČENJA U REDUKCIJI KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA 23
4.3.1 Ispitivanja na prirodno kontaminiranim uzorcima hrane 23
4.3.2 Ispitivanja na umjetno kontaminiranim uzorcima hrane 24
5 ZAKLJUČCI 28
6 LITERATURA 29
7 SAŽETAK/SUMMARY 33
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD 35

1 UVOD

1.1 PLIJESNI

Plijesni su velika skupina mikroskopskih gljivica čije je tijelo građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila, hifa, koje su nitaste građe i obično bezbojne. Isprepletene niti hifa tvore micelij koji se kao paučinasta, prašnjava prevlaka rasprostire po podlozi. Razmnožavaju se većinom pomoću spora, iako se mogu razmnožavati i vegetativno, gdje nove kolonije nastaju od fragmenata hifa (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Plijesni imaju važan gospodarski značaj za čovjeka, neke se koriste u proizvodnji antibiotika i u prehrambenoj industriji, primjerice u proizvodnji sira ili određenih fermentiranih suhomesnatih proizvoda. Međutim, većinom plijesni uzrokuju štete u gospodarstvu. Danas je poznato oko 100 000 vrsta plijesni. Od njih, više od 400 vrsta se smatra toksičnima, a za 5% je poznato da proizvode toksične tvari, koje se nazivaju mikotoksinima, a koje imaju neželjen učinak kako na životinje tako i na čovjeka (Oliveira i sur., 2013).

Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO, engl. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*), pretpostavlja se da je 25% usjeva diljem svijeta kontaminirano plijesnima i, posljedično, mikotoksinima te se gubitci mjere u milijardama dolara (Iqbal i sur., 2013). Plijesni su klasificirane kao drugi po štetnosti uzročnik propadanja proizvoda tijekom skladištenja, odmah nakon insekata i drugih štetočina (CAST, 1989). Ekonomski gubitci nastaju zbog smanjenog uroda, zbog smanjene kvalitete proizvoda ili oštećenja proizvoda. Tako je u nekim saveznim državama SAD-a procijenjen gubitak od 100 milijuna dolara, do ukupno 1,6 milijardi dolara zbog kontaminacije plijesnima i mikotoksinima. Afrička poljoprivreda pretrpi godišnje gubitke od 670 milijardi dolara zbog internacionalnih barijera i zabrana u trgovanju aflatoksinima kontaminirane hrane (Oliveira i sur., 2013).

Plijesni, s obzirom na vrijeme kontaminacije na biljkama i plodovima jesu: plijesni s polja, plijesni u skladištima i plijesni uznapredovalog kvarenja. Plijesni polja su rodovi *Alternaria, Helminthosporium, Cladosporium, Fusarium*, rodovi plijesni u skladištima su *Penicillium* i *Aspergillus*, dok su plijesni uznapredovalog kvarenja iz rodova *Papulospora*, *Sordaria*, *Mucor, Chaetomium* i *Rhisopus* (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Najvažniji parametri koji utječu na rast plijesni su: voda i relativna vlažnost zraka, temperatura za vrijeme rasta biljke i tijekom uskladištenja plodova te oštećenje zrna (kukci i

mehanička oštećenja uzrokovana načinom prikupljanja i manipulacijom urodom) (Ožegović i Pepeljnjak, 1995). Ipak, najbitniji čimbenici koji utječu na rast plijesni su temperatura i sadržaj vode (a_w) zrna. Plijesni uglavnom rastu u temperaturnom rasponu 10-40 ^oC i kod a_w vrijednosti iznad 0,7. Minimalne a_w vrijednosti čestih mikotoksinogenih plijesni ipak mogu varirati. Primjerice *Aspergillus flavus* raste u a_w rasponu od 0,78-0,8; *A. fumigatus* 0,85-0,94; *A. parasiticus* 0,78-0,82; *Fusarium* spp. 0,85-0,87, a *Penicillium chrysogenum* 0,78-0,81 (Bhat i sur., 2010).

1.2 MIKOTOKSINI

Mikotoksini su toksični, sekundarni metaboliti plijesni za koje se smatra da nemaju ulogu u rastu i razvoju plijesni, nego im služe kao obrana od drugih mikroorganizama (Pitt, 2000). Kemijska struktura mikotoksina je vrlo različita, a njihova masa je u rasponu od 50 do 500 Da.

Bolesti koje uzrokuju mikotoksini nazivaju se mikotoksikoze. Mikotoksikoze su, dakle, alimentarna trovanja ljudi i životinja toksičnim proizvodima plijesni (mikotoksinima) čija težina ovisi o toksičnosti samog mikotoksina, trajanju izloženosti, dobi, spolu te dosta slabo razjašnjenim sinergističkim efektima koji uključuju genetske predispozicije i interakcije s ostalim toksičnim tvarima. Tako loš vitaminski status, malnutricija, ekscesivno uzimanje alkohola te trenutne infekcije, mogu biti čimbenici koji utječu na težinu kliničke slike mikotoksikoze. Isto tako, mikotoksikoze mogu povećati osjetljivost na mikrobne infekcije, pogoršati posljedice malnutricije ili sinergistički djelovati s drugim toksinima (Bennet i Klich, 2003).

Od 1960ih godina do sada, otkriveno je oko 400 različitih mikotoksina. U ljudi i životinja mikotoksini mogu imati akutnu ili kroničnu toksičnost. Kronična toksičnost može se manifestirati kao karcinogeni, mutageni i teratogeni učinak. Sa zdravstvene strane, važni mikotoksini koji se mogu nalaziti u hrani su: aflatoksini, okratoksini, trihoteceni, fumonizini, zeralenon (Bhat i sur., 2010). Sa akutnim mikotoksikozama povezuju se aflatoksini, fumonizini i ergot alkaloidi, kako u čovjeka, tako i kod stoke. Kako su mikotoksini generalno dosta male molekule (do 500 Da) one ne aktiviraju imunološki sustav te je ljudski organizam trajno nezaštićen od mikotoksina (Pitt, 2000).

Mikotoksikoze, naročito akutne, češće su u veterinarskoj praksi zbog toga što se životinje u uzgoju hrane krmivom koje je biljnog podrijetla, a kontaminirano je mikotoksinima. Dok

životinje direktno obole, uzimajući takvu, onečišćenu hranu, ljudi obole indirektno hraneći se proizvodima životinja koji sadrže mikotoksine (mlijeko, meso, jaja).

Mikotoksikoze se odlikuju sljedećim značajkama:

- nekontagioznašću (ne prenose se na ljude i životinje)
- uvijek su u vezi s hranom
- ne liječe se antibioticima
- slične su avitaminozama (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

1.2.1 Aflatoksini

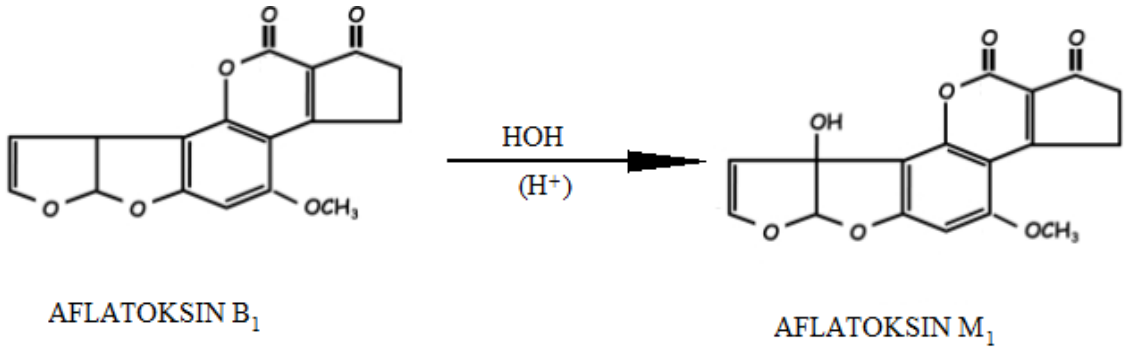
Aflatoksini su visoko toksični, teratogeni, mutageni i kancerogeni spojevi difuranokumarinske strukture koje proizvodi nekoliko vrsta *Aspergillus* plijesni poliketidnim metaboličkim putem. Najznačajnije plijesni koje proizvode aflatoksine su *A. flavus* i *A. parasiticus* (Bennet i Klich, 2003).

Aflatoksini, kao sekundarni metaboliti *Aspergillus spp.*, su veoma česta pojava u tropskim i subtropskim regijama gdje su temperatura i vlaga zraka optimalni za rast plijesni i produkciju toksina. Iako, plijesni koje proizvode aflatoksine pokazuju veoma velike varijacije u području životnih uvjeta za rast i produkciju aflatoksina. Primjerice, minimalna temperatura na kojoj raste *A. parasiticus* je 6-8 ^{o}C, dok je maksimalni raspon 44-66 ^{o}C, s optimalnim rasponom 25-35 ^{o}C. *A. flavus* pak proizvodi aflatoksine u rasponu od 12-42 ^{o}C, a optimalni raspon je 28-30 ^{o}C (Bhat i sur., 2010). *A flavus* i *A. parasiticus* pokazuju naročit afinitet prema orašastim plodovima (naročito kikiriki) i uljaricama. Stoga su tri najznačajnija usjeva na kojima nalazimo aflatoksine žitarice, kikiriki i sjemenke pamuka (Pitt, 2000).

Do sada je identificirano 18 tipova aflatoksina. Oni važniji uključuju aflatoksin B1, B2, G1, G2 i M1. Plijesan *A. flavus* uglavnom proizvodi aflatoksin B1 i B2, dok *A. parasiticus* proizvodi aflatoksin B1, B2, G1, G2, čija se imena, uzgred, temelje na fluorescenciji aflatoksina pod plavim (*Blue*) ili zelenim (*Green*) svjetlom i njihovoj relativnoj mobilnosti na tankoslojnom kromatogramu (brojevi 1 ili 2 u nazivu) (Bennet i Klich, 2003). Od tih 18 vrsta aflatoksina Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, engl. *International Agency for Research on Cancer*) je 1987. godine klasificirala (a potom i potvrdila 2002 godine) 4 aflatoksina (aflatoksin B1, B2, G1, G2) u Grupu 1 karcinogena, dok je aflatoksin M1 klasificiran kao mogući karcinogen u ljudi (Grupa 2B) (IARC, 2002).

Trenutne procjene govore da čovjek dnevno unese između 0 i 30 000 ng/kg/d aflatoksina, a prosječni unos je 10-200 ng/kg/d (Bhat i sur., 2010). Mlijeko i mliječni proizvodi kontaminirani aflatoksinima su ozbiljan problem i briga za javno zdravlje, ponajviše zbog toga što mlijeko konzumiraju najrizičnije skupine, a to su novorođenčad i djeca koja su osjetljivija na negativne utjecaje okoline od odraslih, pa tako i na aflatoksine.

Za razliku od spomenutih aflatoksina B1, B2, G1, G2, djeca su najizloženija aflatoksinu M1, putem mlijeka. Nakon što mliječne krave konzumiraju hranu kontaminiranu aflatoksinima, aflatoksin B1 prolazi reakcije biotransformacije u jetri, te prelazi u hidroksilirani oblik, aflatoksin M1 (Slika 1). Otkriveno je da se između 0,14% i 0,95% unesenog aflatoksina metabolizira i izluči u mlijeko u obliku aflatoksina M1, s time da taj postotak varira ovisno o zdravlju životinje, stupnju mliječnosti, hranidbi i metabolizmu same životinje (Bhat i sur., 2010).



Slika 1. Hidroksilacija aflatoksina B_1 u organizmu krave (Prilagođeno prema Ožegović i Pepeljanjak, 1995)

Koncentracija aflatoksina M1 izlučenog u mlijeku izražena na kilogram mlijeka, s obzirom na uzetu količinu aflatoksina B1 može se izraziti formulom:

aflatoksin M1 (ng/kg mlijeka) = 1,19 aflatoksin B1 (µg/dan) + 1,9

To znači da se ne bi prekoračila ukupna tolerirana količina aflatoksina M1 u mlijeku, tj. manje od 0,05µg/kg koliko je propisano Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (Narodne novine, broj 146/12), u ishrani stada koncentracija aflatoksina B1 u krmivu ne smije prijeći količinu od 40 µg/dan (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Prema FAO i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, engl. *World Health Organisation*), maksimalna dozvoljena količina aflatoksina u hrani za ljude iznosi 15 µg/kg za

ukupne aflatoksine te 5 μg/kg za aflatoksin B1, dok je u mliječnim proizvodima maksimalna dozvoljena količina aflatoksina M1 0,5 μg/kg. Europska unija također je definirala maksimalne prihvatljive količine za aflatoksine u žitaricama, kikirikiju i sušenom voću od 4 μg/kg za ukupne aflatoksine s maksimumom od 2 μg/kg za sami aflatoksin B1 (Commission Directive 2003/100/EC).

1.2.1.1 Zdravstvene posljedice izloženosti aflatoksinima

Kod aflatoksina razlikujemo stanja uzrokovana akutnom ili kroničnom izloženosti aflatoksinima.

Akutno trovanje aflatoksinima naziva se aflatoksikoza i nastaje konzumiranjem izrazito kontaminirane hrane gdje se dnevni unos aflatoksina mjeri u miligramima, pa su stoga dosta rijetke. Akutna trovanja aflatoksinima opisana su tek nakon stvarnih izbijanja afkatoksikoza uzrokovanih hranom kontaminiranom aflatoksinima, kao što je bilo u Indiji 1974. godine. Tada se u Indiji pojavio hepatitis u gotovo 400 ljudi od kojih je 100 umrlo, što je bila posljedica konzumiranja kukuruza za koji je nađeno da je imao i do 15 mg/kg aflatoksina. Smatra se da su odrasle osobe unosile i do 2-6 mg aflatoksina dnevno na temelju čega se zaključilo da je letalna doza za odraslog čovjeka 10-20 mg aflatoksina (Pitt, 2000). Akutnu aflatoksikozu obilježavaju ikterus, povraćanje, anoreksija, ascites i edem donjih ekstremiteta te je primijećeno da se javlja 2 puta češće kod muškaraca nego kod žena. Smrt nastupa naglo, a prethodi joj krvarenje iz probavnog trakta. Utvrđeno je da subletalne doze aflatoksina izazivaju perzistentne hepatitise koji traju i po nekoliko godina (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

Mnogo veći problem predstavlja kronično izlaganje aflatoksinima koje dovodi do karcinoma jetre. Postoje radovi koji govore o tome da su aflatoksini nađeni čak i u majčinom mlijeku te isto tako u krvi pupčane vrpce majki u nekim afričkim zemljama i nekim regijama Kine, u Turskoj, UAE, Australiji i Tajlandu (Bhat i sur., 2010). Dugotrajna izloženost aflatoksinima kroz hranu smatra se važnim rizičnim faktorom za nastanak hepatocelularnog karcinoma, posebno u osoba izloženih hepatitisu B (Bennet i Klich, 2003). Za mogući karcinogeni mehanizam navodi se delecijska mutacija p53 tumor-supersijskog gena i aktivacija dominantnih onkogena.

Za aflatoksine se smatra da su kofaktori i da djeluju sinergistički u povećanoj incidenciji hepatocelularnog karcinoma u osoba sa hepatitis B virusom (HBV, *Hepatitis B virus*). HBV interferira s mogućnošću hepatocita da metaboliziraju aflatoksine što onda rezultira da aflatoksin M1-DNA adukt egzistira dulje vrijeme u jetri i povećava vjerojatnost oštećenja

tumor-supresijskih gena (Bhat i sur., 2010). U osoba s HBV aflatoksini djeluju 30 puta potentnije te povećavaju relativni rizik od nastanka karcinoma 12 puta. U područjima gdje se HBV i izloženost aflatoksinima pojavljuju zajedno, hepatomi su predominantni tip karcinoma i čine 64% svih karcinoma i uzrok su smrtnosti 10% ukupne muške populacije tih područja (Williams i sur., 2004).

1.2.2 Okratoksini

Okratoksini su grupa mikotoksina koje proizvode primarno plijesni *Aspergillus* i *Penicillium* vrste. Najčešći je okratoksin A koji je i najtoksičniji od svih okratoksina. Spomenute plijesni ga proizvode najčešće prilikom neprikladnog skladištenja žitarica, kave, sušenog voća ili začina. Na pokusnim životinjama je pokazano da je okratoksin A nefrotoksičan, karcinogen i teratogen te djeluje imunosupresivno. Prema IARC, svrstan je u skupinu 2B karcinogena (mogući karcinogeni za čovjeka) (IARC, 2002).

Iz razloga što su uočene morfološke sličnosti u lezijama u bubregu koje su inducirane kod okratoksinom A tretiranih svinja i endemske nefropatije, ovaj se mikotoksin smatra uzročnikom endemske nefropatije. Endemska neforpatija je kronična i fatalna bolest bubrega koja se pojavljuje kod ruralnog stanovništva u Hrvatskoj (uz Savu i Dunav), Srbiji, Bugarskoj te Rumunjskoj. Smatra se da od nje boluje 20 000 ljudi. Bolest nema akutnu fazu, a prvi simptomi uključuju glavobolju, umor, gubitak težine. Blaga proteinurija bez hipertenzije, uz aplastičnu ili normokromnu anemiju razvija se tek kroz nekoliko godina. U uznapredovalom stadiju bolesti veličina i težina bubrega su značajno smanjeni, uz difuznu fibrozu korteksa, ali bez znakova upale (Peraica i sur., 1999).

1.2.3 Zeralenon

Zeralenon je mikotoksin kojeg proizvode plijesni roda *Fusarium*, prvenstveno *Fusarium graminearum* te ga najčešće nalazimo na kukuruzu i pšenici. Kemijska struktura zeralenona je slična strukturi estrogena. To objašnjava estrogeno djelovanje zeralenona. Zeralenon kod životinja uzrokuje neplodnost, vulvularni edem, prolaps vagine i rektuma te hipertrofiju mliječnih žlijezda (Bhat i sur., 2010). U Portoriku, zeralenon je nađen u krvi djece koja su ušla u preuranjeni pubertet, a potvrđeno je da su bila izložena hrani kontaminiranoj zeralenonom. Stoga je preuranjeni pubertet u tih djevojčica povezan s izloženošću zeralenonu (Pepeljnjak i Ožegović, 1995).

1.2.4 Fumonizini

Fumonizini su grupa mikotoksina koja je prvi put opisana i okarakterizirana u usporedbi s drugim mikotoksinima dosta kasno, tek 1988. godine. Proizvode ih plijesni roda *Fusarium*. Najčešći proizvođači fumonizina su *F. verticilloides, F. proliferatum* i *F. nyγi*. S toksikološke strane, najznačajniji je fumonizin B1 (Peraica i sur., 1999). Njihov mehanizam toksičnosti temelji se na interferenciji metabolizma sfingolipida, zbog njihove strukturne sličnosti sa sfingolipidima.

Potvrđeno je da fumonizini uzrokuju leukoencefalomalaciju konja i plućni edem kod svinja. U pokusnih životinja imaju heapatotoksičan i karcinogeni efekt. Kod ljudi, smatra se da postoji veza između fumonizina i karcinoma jednjaka. Također, fumonizini mogu uzrokovati defekte neuralne cijevi kod pokusnih životinja, pa se to stavlja u kontekst klastera slučajeva anencefalije i spine bifide u južnom Teksasu (slučajevi iz sredine 1990ih godina) za koje se uzrokom smatra fumonizinima kontaminirani kukuruz. IARC je nakon evaluacije rizika za ljude, svrstala fumonizine u skupinu 2B; mogućih karcinogena za ljude (IARC, 2002).

1.3 SPRJEČAVANJE IZLOŽENOSTI MIKOTOKSINIMA

Pošto su mikotoksini sveprisutni i predstavljaju globalni problem, do sada su istraživane i korištene mnoge metode dekontaminacije hrane koje grubo možemo podijeliti na fizikalne i kemijske metode.

Pod fizikalnim metodama smatra se fizičko odvajanje oštećenih plodova (oštećeni plodovi imaju veću vjerojatnost da su kontaminirani) koje je moguće kada je kontaminacija samo djelomična. Ovo je najraširenija metoda dekontaminacije za kikiriki i pistacije.

Blanširanje i elektroničko sortiranje prema boji mogu smanjiti kontaminaciju aflatoksinima do ispod 5 μg/kg. Može se koristiti i fluorescentno sortiranje koje se bazira na fluorescenciji kojične kiseline, koja je metabolit *A. flavus* te se može koristiti u dekontaminaciji hrane (kukuruz, sjemenke pamuka, suhe smokve) od aflatoksina.

Također flotacija je jedno od rješenja za kontaminirani kukuruz i kikiriki, jer oštećena (a vjerojatno i kontaminirana) zrna plutaju na vodi. Ovom metodom se može smanjiti aflatoksine i do 90%.

Ispitivan je i utjecaj elektromagnetskog zračenja. Pronađeno je da je sunčeva svjetlost najučinkovitija u detoksikaciji aflatoksina B1 te bi se u tropskim predjelima mogla koristiti kao učinkovita metoda dekontaminacije posebno kokosa, kikirikija i kukuruza (Peraica i sur., 2002). U Tablici 1 prikazane su navedene metode i njihova učinkovitost.

Tablica 1: Pregled fizikalnih metoda dekontaminacije primjenjivih za aflatoksine u prehrambenoj industriji (prilagođeno prema Peraica i sur., 2002).

Metoda	Mikotoksin	Vrsta hrane	Efikasnost
Automatsko uklanjanje oštećenih ljuski	Aflatoksini	Pistacio, kikiriki	90-100%
Fluorescentno sortiranje	Aflatoksini	Kukuruz, sjemenke pamuka, suhe smokve	90-100%
Flotacija	Aflatoksini	Kukuruz, kikiriki	90-100%
Sunčeva svjetlost	Aflatoksini	Pšenica	90-100%

Što se tiče kemijske dekontaminacije, istraživana su razna organska otapala (etanol, izopropanol) te je pronađeno da su vrlo efikasna u uklanjanju aflatoksina iz različitih vrsta hrane, ali nisu praktična za industrijsku uporabu zbog visoke cijene i problema s njihovim uklanjanjem iz hrane. Isto tako, ispitivan je utjecaj kiselina, alkalnih supstanci, oksidansa i reducensa.

Kemijska dekontaminacija pokazala se veoma efikasnom, ali ne i zadovoljavajućim jer su neke od ovih tvari ostavljale toksične spojeve u tretiranoj hrani, dok su druge smanjivale njenu nutritivnu vrijednost. Tako se vodikov peroksid te amonijak (pri različitim temperaturama i tlaku) najčešće koriste u dekontaminaciji stočne hrane jer ne ostavljaju ili generiraju toksične supstance tokom dekontaminacije. Jedini problem kod amonijaka je to što smanjuje nutritivnu vrijednost stočne hrane jer smanjuje razinu lizina i aminokiselina koje sadrže sumpor. Natrijev bisulfit se također koristi u redukciji aflatoksina B1 te se pokazao kao vrlo učinkovit u dekontaminaciji kukuruznih krmiva (Peraica i sur., 2002). Neke od kemijskih metoda dekontaminacije prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2: Pregled kemijskih metoda dekontaminacije za aflatoksine primjenjivih u prehrambenoj industriji (prilagođeno prema Peraica i sur., 2002).

Metoda	Mikotoksin	Vrsta hrane	Efikasnost
Vodikov peroksid	Aflatoksini	Kikiriki	90-100%
Natrijev klorid	Aflatoksini	Kikiriki	90-100%
Natrijev bisulfit	Aflatoksin B1	Stočna hrana na bazi kukuruza	90-100%
Amonifikacija	Aflatoksini	Kukuruz, kikiriki brašno	90-100%
Amonifikacija pri povišenom tlaku (4 bar) i okolnoj temperaturi	Aflatoksini	Kukuruz, kikiriki brašno, sjemenke pamuka	90-100%
Amonifikacija pri atmosferskom tlaku i povišenoj temperaturi	Aflatoksini	Kikiriki brašno	90-100%

Još jedna od mogućnosti sprječavanja izloženosti mikotoksinima kod životinja, i to prvenstveno životinja u uzgoju, je dodatak adsorbenata u stočnu hranu. Cilj upotrebe adsorbenata je da oni već u gastrointestinalnom sustavu vežu mikotoksine i da se tako spriječi apsorpcija mikotoksina. Od svih ispitivanih, najučinkovitiji u apsorpciji aflatoksina pokazali su se natrij-kalcij alumosilikati koji se koriste u prevenciji aflatoksikoze domaćih životinja. Pokazano je da natrij-kalcij aluminosilikati smanjuju koncentraciju aflatoksina M1 u mlijeku. Nažalost, slabo adsorbiraju ostale mikotoksine. Zeoliti su se pokazali kao dobri adsorbensi za aflatoksin B1 te zeralenon. Primjer zeolita je bentonit koji se pokazao kao učinkovit adsorbens aflatoksina, ali ne i ostalih mikotoksina. Najčešće se koristi natrijev bentonit jer ima bolja adsorptivna svojstva naspram kalcijevog. U novije vrijeme istražuju se i mananooligosaharidi iz staničnog zida kvasaca koji su se pokazali kao učinkoviti adsorbensi aflatoksina, okratoksina te fuminozina B1. Istraživan je i aktivni ugljen, ali se ne koristi kako zbog visoke cijene, tako i zbog utjecaja na apsorpciju vitamina i minerala kod životinja. U industrijskim procesima koristi se i Fullerova zemlja koja se pokazala kao efektivan adsorbens aflatoksina B1 iz ulja kikirikija, te je u uporabi u Indiji kao uspješna metoda dekontaminacije (Peraica i sur., 2002).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Plijesni i njihovi toksični metaboliti mikotoksini predstavljaju važan problem u poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji s ekonomskog aspekta, ali i zbog njihovog utjecaja na zdravlje ljudi i životinja. Prema FAO, smatra se da je 25% ukupnih poljoprivrednih usjeva u većoj ili manjoj mjeri kontaminirano mikotoksinima, što dodatno daje na značenju ovom problemu. Rastu plijesni i sintezi mikotoksina pogoduju visoke temperature i velika vlažnost zraka, pa je tako najvećim dijelom pogođena Afrička poljoprivreda koja trpi ogromne gubitke zbog nemogućnosti izvoza mikotoksinima kontaminirane hrane što dodatno pridonosi njihovoj teškoj ekonomskoj situaciji. Utvrđeno je da su neki od mikotoksina toksični te karcinogeni, mutageni ili teratogeni, stoga korištenje hrane kontaminirane mikotoksinima za prehranu ljudi može dovesti do niza javnozdravstvenih problema. Primjerice u nekim afričkim državama pojavnost mikotoksinima uzrokovanog karcinoma jetre predstavlja oko dvije trećine ukupnih karcinoma. Da kontaminacija aflatoksinima nije samo problem poljoprivrednika i krajnjih korisnika proizvedene hrane u Africi uvjerili smo se i 2013. godine kada je u mlijeku u Hrvatskoj i zemljama regije pronađena nedozvoljena količina aflatoksina M1 što je uzrokovalo velike ekonomske gubitke proizvođačima mlijeka.

U sprječavanju kontaminacije hrane plijesnima i mikotoksinima te dekontaminacije već kontaminirane hrane trenutno nema jednostavnog i uniformnog rješenja. γ zračenje je već dugo korištena i priznata metoda sterilizacije različitih predmeta i materijala, ali i hrane, čija je prednost da zbog svoje velike energije prodire kroz većinu materijala. Cilj ovoga rada je istražiti prema dostupnoj literaturi, da li je moguće γ zračenjem, kao fizikalnom metodom sterilizacije i dekontaminacije spriječiti nastanak mikotoksina u hrani djelovanjem na same plijesni te da li je moguće γ zračenjem dekontaminirati već prisutne mikotoksine u hrani. U ovom radu naglasak je stavljen na aflatoksine kao najviše istraživane mikotoksine koji pripadaju skupini 1 karcinogena te tako predstavljaju najveću prijetnju zdravlju ljudi.

3 MATERIJALI I METODE

Pri izradi ovog diplomskog rada korištene su knjige i znanstveni časopisi. Pretraživanje *online* baza podataka je obavljeno elektroničkim putem pomoću računala koje ima *online* pristup bazama podataka, a korištene baze podataka su: baza s cjelovitim tekstom (*Science Direct*) te bibliografska baza podataka (*PubMed* i *Google Scholar*).

Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana uz problematiku ovoga diplomskog rada kako bi se donijeli konačni zaključci. Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, i časopisu. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga diplomskog rada. Kao ključne riječi korišteni su izrazi *„mycotoxins“ „decontamination“, „aflatoxins“* te *„gamma irradiation“*.

Relevantni članci proučavani su analitično i kritično, s naglaskom na istraživanje postojećih znanja o predmetu istraživanja. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji su prikazani ovim diplomskim radom.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 ELEKTROMAGNETSKO ZRAČENJE

Elektromagnetsko zračenje je fizikalna pojava širenja električnih i magnetskih valova, odnosno ultrasitnih čestica zvanih fotoni. Fotoni su čestice bez mase koje se gibaju brzinom svjetlosti (3 x 10^8 m/s) i sadrže određenu količinu energije. Energija valova, odnosno fotona, veća je što je veća frekvencija titraja valova i što je kraća valna duljina. Valovi se šire kao zrake velike energije te mogu iz ljuske atoma izbaciti elektrone i tako ionizirati atom te se stoga zovu ionizirajuće zrake. Na osnovu mogućnosti ioniziranja elektromagnetski spektar dijeli se na dva dijela: neionizirajuće i ionizirajuće zračenje. Ionizirajuće zrake: rendgenske (X-zrake), γ zrake, kozmičke zrake, mogu štetno djelovati na žive stanice. Zrake manje energije: radiovalovi, mikrovalovi, vidljiva svjetlost, infracrvene i ultraljubičaste zrake nemaju tu jakost da izbace elektron iz atoma (i da ga ioniziraju) te se zato zovu neionizirajuće zrake. Njihovo djelovanje na organska tkiva, zbog slabe energije, može biti štetno pri dugom izlaganju, ali je mnogo manje štetno od ionizirajućeg zračenja (Librenjak, 2004).

4.1.1 Ionizirajuće zračenje

Atomi i molekule normalno se nalaze u neutralnom stanju, tj. broj pozitivnih protona u jezgri jednak je broju negativnih elektrona u elektronskom omotaču. Ako atom, uslijed sudara s drugom česticom (npr. fotonom, drugim elektronom, jezgrom helija), izgubi elektron, rezultirajući atom naziva se ion i njegova svojstva se uvelike razlikuju od originalnog atoma. Ionizirajuće zračenje, zračenje koje ima dovoljno energije da izbaci elektron iz ljuske, može biti produkt radioaktivnog raspada, nuklearne fisije, nuklearne fuzije, ekstremno toplih objekata i ubrzanih naboja. Nivo energije na kojem fotoni postaju ionizirajući, odnosno snažno reagiraju s nabijenim česticama kao što su elektroni, pozitroni i α čestice, nalazi se u ultraljubičastom dijelu elektromagnetskog spektra. Neutroni, s druge strane, slabo reagiraju s elektronima pa ne mogu direktno ionizirati atome, ali mogu reagirati s atomskom jezgrom (ovisno o jezgri i brzini neutrona) i tako proizvesti nestabilne radioaktivne jezgre koje pri raspadu emitiraju ionizirajuće zračenje (Librenjak, 2004).

4.1.1.1 Vrste ionizirajućeg zračenja

Glavne vrste ionizirajućeg zračenja nastaju kao rezultat spontanog raspada radioaktivnih atoma. Do procesa radioaktivnog raspada dolazi kako bi se jezgra radioaktivnog atoma

stabilizirala te ona emitira subatomske čestice i visokoenergetske fotone. Jezgre takvih atoma mogu mijenjati strukturu i time emitirati energiju u tri glavna oblika: α čestice, β čestice i γ zrake (Librenjak, 2004).

α čestice

α čestica identična je jezgri helija, a sastoji se od dva protona i dva neutrona. To je relativno teška i visoko-energetska subatomska čestica sa pozitivnim nabojem +2 zbog svoja dva protona. Brzina α čestice u zraku je otprilike jedna dvadesetina brzine svjetlosti. Prirodni izvori α čestica imaju atomski broj najmanje 82, uz neke iznimke. Najvažniji α emiteri su: americij-241, plutonij-236, uran-238, torij-232, radij-226, radon-222 (Librenjak, 2004).

β čestice

β čestice su ekvivalentne elektronima. Razlika je u tome što β čestice potječu iz jezgre, a elektroni se nalaze u omotaču. β čestice imaju električni naboj -1. Masa β čestice iznosi otprilike 1/2000 mase protona ili neutrona. Brzina pojedinačne β čestice ovisi o tome koliko energije ima i varira u širokom opsegu. Iako β čestice emitiraju radioaktivni atomi, one same po sebi nisu radioaktivne. Njihova energija u obliku brzine nanosi štetu živim stanicama tako što razbija kemijske veze i stvara ione. Radioaktivni raspad tehnecija-99, koji ima previše neutrona da bi bio stabilan, je primjer β raspada. Ostali značajniji β emiteri su: fosfor-32, tricij, ugljik-14, stroncij-90, kobalt-60, jod-129 i 131, cezij-137 (Librenjak, 2004).

γ zračenje

γ zraka je paket elektromagnetske energije, tj. fotona. γ fotoni su fotoni s najviše energije u elekromagnetskom spektru. Emitiraju ih jezgre nekih radioaktivnih atoma. γ fotoni nemaju masu ni električni naboj, ali imaju vrlo visoku energiju, otprilike 10 000 puta veću od energije fotona u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Zbog visoke energije, γ čestice putuju brzinom svjetlosti i u zraku mogu prijeći stotine tisuća metara prije nego što potroše energiju. Mogu proći kroz mnogo vrsta materijala uključujući i ljudsko tkivo. Vrlo gusti materijali, poput olova, obično se koriste za zaštitu od γ zračenja. Radioaktivni elementi koji emitiraju γ zrake su najrašireniji i najkorišteniji izvori ioniziranog zračenja. Moć prodiranja γ zraka ima mnogo upotreba. Iako γ zrake mogu prodrijeti kroz mnoge materijale, one ne čine te materijale radioaktivnim. Najkorišteniji emiteri γ zraka su kobalt-60, cezij-137 (liječenje karcinoma, mjerenje i kontrola toka tekućina u industrijskim procesima, istraživanje podzemnih izvora nafte) i tehnecij-99m (dijagnostičke studije u medicini) (Librenjak, 2004).

X-zrake

X-zrake su elektromagnetsko zračenje slično svjetlosti, ali s višom energijom. Strojevi za generiranje X-zraka imaju vakuumiranu staklenu cijev na čijim krajevima su postavljene elektrode, negativna katoda i pozitivna anoda. Na elektrode je doveden visoki napon koji može biti u rasponu od nekoliko tisuća volti do nekoliko stotina tisuća volti. Razlika potencijala tada elektrone nakupljene na katodi ubrzava prema anodi te oni udaraju u metalnu ploču s velikom energijom. Pri sudaru s metalnom pločom elektrone će privući pozitivno nabijena jezgra atoma metala, pri čemu se smanjuje energija elektrona, tj. dolazi do emisije X-zraka, koje imaju veliku moć prodiranja (Librenjak, 2004).

4.1.1.2 Mjerenje ionizirajućeg zračenja

Postoje četiri u osnovi različita pristupa mjerenju ionizirajućeg zračenja i najmanje osam različitih mjernih jedinica u kojima se ta mjerenja mogu izraziti:

- aktivnost izvora – broj raspada u sekundi. U SI sustavu mjerna jedinica je bekerel (Bq) koja označava jedan raspad u sekundi. Druga mjerna jedinica za aktivnost izvora je kiri (Ci) originalno definiran kao aktivnost jednog grama radija-226, a danas se definira kao $3{,}7 \times 10^{10}$ raspada po sekundi, što znači da je $1\ Ci = 3{,}7 \times 10^{10}$ Bq.
- zračenje kojem je neki objekt izložen. Mjerna jedinica je rendgen (R); označava količinu X-zračenja ili γ zračenja potrebnu da nastane jedan jedinični naboj po cm^3 suhog zraka u standardnim uvjetima.
- zračenja koje je neki objekt apsorbirao. Mjerne jedinice su gray (Gy) i rad. Gray se definira kao 1 J apsorbiranog zračenja po kilogramu materijala. Rad (engl. *radiation absorbed dose*) je količina apsorbiranog zračenja koja predaje 0,01 J energije po kilogramu izloženog materijala.
- doza zračenja. Mjerne jedinice su rem i sivert (Sv). Rem (engl. *roentgen equivalent in man*) je definiran kao količina apsorbiranog zračenja koja proizvodi isti biološki učinak kao jedan rad terapijskih X-zraka. Sievert je mjerna jedinica za dozni ekvivalent i vrijedi Sv = J/kg (Librenjak, 2004).

4.1.1.3 Utjecaj ionizirajućeg zračenja na stanice i žive organizme

Prolaskom ionizirajućeg zračenja kroz tvar dolazi do procesa u kojima se energija zračenja pohranjuje u tvari. Zračenje može izravno ili neizravno ionizirati atome i molekule tvari kroz koju prolazi ostavljajući u tvari parove pozitivnih i negativnih iona. Negativno nabijeni elektroni i pozitivno nabijene jezgre stvorene ionizirajućim zračenjem mogu

uzrokovati oštećenje živog tkiva. Ako je doza zračenja dovoljno velika, učinak se može vidjeti gotovo odmah, u obliku radijacijskog trovanja. Niže doze pak mogu uzrokovati karcinom (Librenjak, 2004).

Kao posljedica djelovanja zračenja, u stanicama živog organizma nastaju dvije vrste oštećenja, izravna i neizravna. Najveći dio stanice čini voda (oko 70 do 80%), tako da izlaganjem stanica živog organizma zračenju dolazi do promjena na molekulama vode. Konkretno, zračenjem se voda raspada na slobodne radikalne OH^- i H^+ (radioliza vode), a tako nastali slobodni radikali reagiraju s makromolekulama u stanici poput proteina, ugljikohidrata i lipida te dovode do oštećenja njihove strukture. Ovako nastala oštećenja, posredovana slobodnim radikalima nastalim radiolizom vode, nazivaju se neizravnima. S druge strane, izravna oštećenja nastaju kada zračenje direktno djeluje na makromolekule u stanici poput DNA, RNA, lipida, proteina, ugljikohidrata i steroida te na njima uzrokuje promjene koje čine te molekule disfunkcionalnima. Tako promijenjene makromolekule, prvenstveno DNA, mogu uzrokovati nastanak novih oštećenja. Dakle, sve vrste ionizirajućih zračenja u interakciji sa stanicama živih organizama mogu izazvati promjene u njihovoj funkciji, poremećaje u dijeljenju, promjene na genima i u konačnici smrt same stanice (Janković, pristupljeno 2015).

Osjetljivost (radiosenzibilnost) tkiva na zračenje je različita. Prema Bergonie-Tribondeau zakonu stanice su osjetljive na zračenje proporcionalno brzini njihove diobe, a obrnuto proporcionalno stupnju njihove diferencijacije. To znači da su na zračenje najosjetljivije stanice koje se intenzivno dijele i koje imaju intenzivnije metaboličke procese, a manje su osjetljive visoko diferencirane stanice i stanice sa sporijim metaboličkim procesima (Janković, pristupljeno 2015).

Jačina bioloških oštećenja ovisi o:

- vrsti zračenja: svaka vrsta zračenja ima svoju karakterističnu radiobiološku efikasnost (RBE), α čestice izazivaju ionizaciju tkiva dvadeset puta veću od β zraka; težinski faktor radijacije
- vremenskoj raspodijeli doze: biološka oštećenja su izravno proporcionalna vremenu trajanja izlaganja radijaciji
- topografskoj raspodijeli doze: biološka oštećenja su proporcionalna volumenu ozračenog tijela

- apsorbiranoj dozi zračenja: biološka oštećenja su posljedica djelovanja sveukupnog zračenja kojem je tijelo bilo izloženo, bez obzira na doze, vrijeme izlaganja i volumen tkiva – efektivna životna doza zračenja
- individualnoj osjetljivosti na zračenje: svaki organizam je različito osjetljiv na zračenje, razlozi uglavnom nepoznati
- životnoj dobi: mlađi organizmi su u pravilu osjetljiviji na zračenje od odraslih, a najosjetljiviji su organizmi u fetalnom razvoju (Janković, pristupljeno 2015).

4.2 PRIMJENA γ ZRAČENJA U ZAUSTAVLJANJU RASTA PLIJESNI

Proveden je cijeli niz istraživanja kako bi se utvrdio utjecaj γ zračenja na rast plijesni. Neka od njih bila su na uzgojenim plijesnima *in vitro,* a neka na hrani umjetno ili prirodno zagađenoj plijesnima. Neka od njih navedena su u daljnjem tekstu.

4.2.1 Ispitivanja *in vitro*

Istraživanje na dvije vrste termorezistentnih plijesni, *Aspergillus fumigatus* i *Paecilomyces variotii* proveli su Gumus i suradnici (2008). U tom istraživanju utvrđeno je da je doza potrebnog zračenja za kompletnu eliminaciju plijesni u uzorku povezana s brojem spora u uzorku. Tako je za inaktivaciju *A. fumigatus* u koncentraciji 10^4-10^7 cfu/mL bila potrebna doza zračenja od 7 kGy, dok je 5 kGy bilo dovoljno za koncentraciju 10^3-10^4 cfu/mL. Doza se spustila i na 3 kGy za potpunu inaktivaciju 10^2 cfu/mL spora *A. fumigatus.* Što se tiče druge vrste plijesni, *P. variotii*, za potpunu inaktivaciju 10^6 cfu/mL spora bila je potrebna doza od 5 kGy, dok se ona spustila na 3 kGy za 10^3-10^5 cfu/mL te čak na 1 kGy za koncentraciju od 10^2 cfu/mL spora. To istraživanje pokazalo je da je *P. variotii* osjetljivija na izloženost γ zračenju nego *A. fumigatus.*

Markov i suradnici (2014) istraživali su utjecaj γ zračenja na plijesni uzgojene *in vitro* i to na germinaciju, sporulaciju i rast aflatoksinogenih plijesni (*A. parasiticus*, *A.flavus* i *A. niger*). *In vitro* eksperiment je obuhvaćao ozračivanje *A. parasiticus*, *A. flavus* i *A. niger* γ zračenjem u dozama do 5 kGy. Rezultati nakon 7 dana inkubacije pokazali su da su doze od 2, 3 i 5 kGy zaustavile germinaciju spora svih ispitivanih plijesni. Iste doze zaustavile su i sporulaciju *A. parasiticus*, dok je samo doza od 5 kGy zaustavila sporulaciju *A. flavus* i *A. niger*. Što se tiče rasta plijesni, 9 dana nakon ozračivanja, samo je doza od 5 kGy uspjela smanjiti rast plijesni za 90%. Ovo je istraživanje potvrdilo da γ zračenje učinkovito zaustavlja rast plijesni *in vitro.* U ovome istraživanju također je ispitivan umjetno kontaminirani kukuruz s mješavinom aflatoksikogenih plijesni. Uzorci kukuruza su kontaminirani istraživanim plijesnima do koncentracije 10^6 spora/g te ozračivani dozama od 5 i 10 kGy. Nakon 15 dana pri temperaturi od 28 °C nije primijećena proliferacija plijesni, te je potvrđeno da zračenje zaustavlja rast plijesni.

4.2.2 Ispitivanja na prirodno kontaminiranim uzorcima hrane

Studiju na začinima koji su bili prirodno kontaminirani plijesnima proveli su Legnani i suradnici (2001). U toj studiji proučavan je utjecaj γ zračenja na mikrobiološku kvalitetu crnog

papra, čili papričica, origana, ružmarina i kadulje. Razina ukupne kontaminacije plijesnima iznosila je od 10^3 do 10^5 cfu/g. Primijenjena doza γ zračenja od 5 kGy uspjela je sniziti kontaminaciju plijesnima od 64% za čili papričice do 93% kod uzoraka kadulje. Vrste plijesni koje su zaostale nakon primijenjene doze od 5 kGy su *Aspergillus niger, Penicillium spp, Cladosporium spp* i *Rhizopus spp.* od kojih je prva potencijalno aflatoksinogena. Ipak, nakon primijenjene doze zračenja od 10 kGy, uništene su sve plijesni u uzorcima što pokazuje da γ zračenje učinkovito zaustavlja rast plijesni i na realnim uzorcima namirnica, u ovom slučaju, prirodno kontaminiranim začinima.

Utjecaj γ zračenja na uzorke čili paprika prirodno kontaminiranih s *Aspergillus spp.* proučavali su Iqbal i suradnici (2013). Uzorci čili paprike bili su kontaminirani s od 10^4 do 10^7 cfu/g. Rezultati su pokazali kako primijenjena doza od 6 kGy smanjuje broj plijesni ovisno o uzorku, tako da nakon zračenja ni jedan uzorak nije sadržavao više od 10^2 cfu/g.

Studija koju su proveli Bhat i suradnici (2010) pokazuje kako je dozom od 5 kGy moguće zaustaviti rast plijesni. U svom su istraživanju sjemenke lotusa podvrgnuli γ zračenju, te su nakon zračenja omotač sjemenke te kotiledon nasadili na hranjivu podlogu i kroz 5-7 dana promatrali razvoj plijesni. Naime, doza od 5 kGy smanjila je sve plijesni sa ukupno $5x10^4$ cfu/g koliko je bilo u kontrolnom uzorku na 20 cfu/g nakon zračenja. Isto tako, gledajući svaku vrstu plijesni posebno, udjel *A. parasiticus* se smanjio s 14% prije zračenja na tek 5% nakon primijenjene doze od 5 kGy. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima Gumus i suradnici (2008) te Iqbal i suradnici (2013) koji također govore kako doze γ zračenja od 5-6 kGy mogu potpuno zaustaviti rast plijesni na različitim uzorcima u sličnom obujmu kontaminacije uzroka reda veličine 10^4-10^5 cfu/g.

S nešto manjim dozama γ zračenja Aziz i Moussa (2002) djelovali su na razne vrste voća (breskve, smokve, jagode, grožđe, itd.) kontaminirane plijesnima. Prosječna količina plijesni koja se nalazila na neozračenim (kontrolnim) uzorcima bila je od $4,8x10^4$ do $6,8x10^5$ cfu/g. Nakon ozračivanja dozama od 1,5 i 3,5 kGy ukupna količina plijesni smanjila se na $1,4x10^2$ do $2,5x10^3$ cfu/g, te $1,4x10^1$ do $2,5x10^2$ cfu/g redom. Nakon 28 dana skladištenja ispod 10 °C ponovno je određena količina plijesni, te se njena količina u kontrolnom uzorku povećala na prosječno $6,05x10^6$ cfu/g, dok su uzorci ozračeni dozama 1,5 i 3,5 kGy sadržavali ukupno $4,88x10^2$ te $1,39x10^1$ cfu/g, odnosno isto kao i prije skladištenja. Isto kao i u prethodno spominjanim istraživanjima, primijenjena doza od 5 kGy potpuno je zaustavila rast svih plijesni. Ipak, iz rezultata ove studije vidljivo je i da niže doze γ zračenja (1,5 i 3,5 kGy) mogu

uzrokovati značajno smanjenje ukupne količine plijesni u hrani te ju takvom održati i nakon mjesec dana skladištenja.

Istraživanje na žitaricama proveli su Maity i suradnici (2008). Konkretno, istraživali su utjecaj γ zračenja na rast i razvoj „plijesni s polja“ koje kontaminiraju rižu. Isto tako, proveli su istraživanje utjecaja γ zračenja na klijavost samog sjemena riže. Dakle, na sjemenu riže pronađene su spore sljedećih plijesni: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp. i *Curvularia* spp. Rezultati su pokazali kako radiosenzitivnost navedenih plijesni raste sljedećim redom: *Aspergillus* spp.< *Alternaria* spp.< *Curvularia* spp.< *Trichoderma* spp. Konkretno, za potpunu inhibiciju germinacije spora bile su potrebne doze γ zračenja od 3, 2,5, 2,5 te 2 kGy. Što se tiče klijavosti sjemena riže, nije primijećeno smanjenje klijavosti kod ozračenih uzoraka, ali je primijećeno da je klijanje odgođeno u usporedbi s kontrolom. Naime, nakon 48 sati klijavost uzoraka ozračenih sa 1 kGy bila je 59%, a kod doza većih ili jednakih 2 kGy 0%, u usporedbi s 78% kod kontrole. Nakon 72 sata, i u kontrolnom uzorku i kod ozračenih uzoraka (1 i 2 kGy) klijavost je bila 100%. Važno je napomenuti da je u ovom istraživanju primijećena različita radiosenzitivnost plijesni (različita osjetljivost plijesni na γ zračenje), što je u sukladnosti s ostalim istraživanjima (Gumus i sur., 2008; Markov i sur., 2014).

4.2.3 Ispitivanja utjecaja γ zračenja na rast plijesni i kvalitetu namirnica

U istraživanju koje su proveli Farag i suradnici (1995b) ispitivan je utjecaj γ zračenja kako na mikrobiološke kontaminante, tako i na svojstva ispitivanih začina (kvaliteta eteričnih ulja, pigmentacija) mažurana (*Majorana hortensis* Moench), đumbira (*Zingiber officinale* Roscoe) te paprike (*Capsicum annum L*) prirodno kontaminiranih s $4{,}8\text{x}10^3$, $5{,}7\text{x}10^3$ te $1{,}9\text{x}10^4$ cfu/g ukupnih plijesni. Doza zračenja od 10 kGy bila je dovoljna za kompletnu eliminaciju svih mikroorganizama. Što se tiče utjecaja γ zračenja na kvalitetu samih namirnica primijećen je značajni pad monoterpena kod mažurana i đumbira pri dozama od 20 i 30 kGy, dok je pri manjim dozama (do 10 kGy) ta pojava od manjeg značaja. Kod paprike je također primijećen blagi utjecaj zračenja na kapsaicin kao referentnu komponentu. Utjecaj na pigmentaciju paprike nije primijećen ni kod doze od 30 kGy. Kao optimum nameće se doza od 10 kGy koja eliminira sve mikrobiološke kontaminante, a uzrokuje minimalno smanjenje kvalitete samih začina.

Istraživanje koje se bavilo dekontaminacijom biljnih droga proveli su Aquino i suradnici (2007). Istraživali su utjecaj γ zračenja na kontaminante guarane (*Paullina cupana*). Uzorci cjelovitih zrna i praha guarane sadržavali su ukupno 10^4-10^5 cfu/g plijesni; konkretno, nađene su vrste roda *Aspergillus, Cladosporium, Penicilium* i *Rhizopus*. Nakon ozračivanja dozom 5

kGy smanjenje ukupnih plijesni bilo je gotovo potpuno, te je tek kod nekih uzoraka ostalo do $8x10^1$ cfu/g plijesni. Nakon doze od 10 kGy, plijesni nije bilo niti u jednom uzorku. Također, isti autori su ispitivali i utjecaj γ zračenja na ekstrakt guarane te nisu primijetili značajnu razliku u kvaliteti ekstrakta između ozračenih uzoraka (10 kGy) i kontrolnih uzoraka. U uzorcima guarane, iz roda *Aspergillus* pronađene su vrste *A. flavus* i *A. niger* koje su potencijalno aflatoksinogene, ali u uzorcima nisu pronađeni aflatoksini zbog a_w uzoraka koja se kretala od 0,4-0,5. Za rast i razvoj *Aspergillus spp.* potreban je aw od 0,80 i više tako da su zaključili kako je bitno pakirati završni proizvod u kontroliranoj atmosferi i u prikladno pakiranje koje čuva proizvod od vanjskih utjecaja.

Lima i suradnici (2011) su istraživali utjecaj γ zračenja na plijesni te produljenje roka trajanja, a isto tako i na očuvanje nutritivnih vrijednosti jedne vrste graha (*Vigna unguiculata L. Walp*). Rezultati su pokazali kako je doza od 1 kGy bila dovoljna za eliminaciju *A. niger*, doza od 2,5 kGy za *A. ochraceus*, a za *A. flavus* doza od 5 kGy, dok su plijesni roda *Rhizopus, Penicillium i Fusarium* eliminirane tek dozom od 10 kGy. Ispitivanja senzornih i nutritivnih svojstava hrane pokazala su da nije bilo utjecaja na aminokiseline, pa i one osjetljivije na γ zračenje (aromatske) kod doza do 10 kGy ni nakon 6 mjeseci skladištenja. Ipak, kod doza od 5 i 10 kGy primijećeno je smanjenje reduktivnog potencijala oligosaharida rafinoze i stahioze. Autori su zaključili da je doza od 5 kGy dovoljna za kontroliranje mikrobioloških kontaminanata, a da najmanje utječe na degradaciju nutritivnih vrijednosti ispitivane namirnice.

Slične su rezultate dobili i Aziz i suradnici (2006) koji su zaključili kako je doza od 5 kGy dovoljna za zaustavljanje rasta svih plijesni na istraživanim žitaricama: pšenici (*Triticum vulgare*), ječmu (*Hordeum vulgare*), kukuruzu (*Zea mays*) te sirku (*Sorghum biocoler*). Također, istraživali su i utjecaj na nutritivne vrijednosti te zaključili kako doza od 10 kGy ne uzrokuje mjerljivu promjenu u aminokiselinskom sastavu, dok se pri istoj dozi smanjuje količina tiamina u uzorcima (22-33%) te riboflavina (10-16%). Nakon zračenja dozom 10 kGy nije primijećen rast kiselinskog broja, ali je zato zračenje povisilo peroksidni broj, ali to nije promijenilo miris ispitivanih žitarica. Ipak, manji pad kvalitete namirnica autori smatraju beznačajnim gubitkom naspram benefita poboljšanja mikrobiološke kvalitete namirnica.

Chiou i suradnici (1990) proveli su istraživanje na uzorcima kikirikija inokuliranim konidijama *A. parasiticus.* Korištene doze γ zračenja bile su do 15 kGy, a zaključeno je da doze od 2,5 do 5,5 kGy mogu zaustaviti rast i smanjiti populaciju *A. parasiticus*, ali ne mogu potpuno

eliminirati iste. Primjenom većih doza (10 kGy i više) primijetili su odsutnost klijavosti kikirikija, promjene u proteinskoj vrijednosti te promjene u stabilnosti kikirikijevog ulja.

4.2.4 Ispitivanja utjecaja γ zračenja na rast plijesni i proizvodnju mikotoksina

Hilmy i suradnici (1995) proveli su istraživanje na mljevenom kikirikiju i indijskom oraščiću umjetno kontaminiranima s 10^8 spora *A. flavus*. Nakon tri dana inkubacije pri relativnoj vlažnosti 91-97% te ozračivanjem uzorka dozom 1 kGy pri istoj vlažnosti, rast micelija i produkcija toksina bila je više-manje inhibirana, ovisno o relativnoj vlažnosti i mediju u postradijacijskoj inkubaciji. Ipak, za doze od 3 kGy i više rezultati su pokazali potpunu inhibiciju rasta micelija te produkcije aflatoksina.

Do zanimljivih rezultata došli su Ribeiro i suradnici (2011) istraživanjem utjecaja γ zračenja na *A. flavus* i *A. ochraceus*. Doza zračenja koju su primijenili iznosila je 2 kGy, te su nakon nje promatrali morfologiju navedenih plijesni i produkciju mikotoksina kod preživjelih plijesni. Primijećeno je nekoliko makroskopskih razlika između ozračenih i kontrolnih uzoraka. Naime, kontrolni uzorak *A. flavus* bio je karakteristične zelene boje, dok je ozračeni uzorak bio blijedo narančaste boje. Primijećene su i manje razlike u veličini konidija i metula ozračenih i kontrolnih uzoraka obiju ispitivanih plijesni. Također, zabilježili su i zanimljivu pojavu mjerenjem koncentracije proizvedenih mikotoksina. Naime, pri istim uvjetima, ozračeni su uzorci naspram kontrolnih uzoraka proizvodili dvostruko više mikotoksina. Kontrolni uzorak *A. flavus* je nakon inkubacije pri istim uvjetima kao i ozračeni uzorak proizveo 8,58±5,25 μg/g dok je ozračeni uzorak proizveo 20,06±1,99 μg/g aflatoksina B1. Kontrolni uzorak A. *ochraceus* proizveo je 76,29±17,81 μg/g, dok je ozračeni uzorak proizveo 150,36±23,16 μg/g okratoksina A.

Sličnu pojavu primijetili su i Ferreira-Castro i suradnici (2007) koji su istraživali utjecaj γ zračenja (2, 5, 10 kGy) na kukuruzu kontaminiranom s *Fusarium verticiloides*, plijesni koja proizvodi fumonizine. Kontrolni uzorci sadržavali su prosječno $6{,}53 \times 10^7$ cfu/g, a uzorci nakon zračenja dozom 2 kGy prosječno $4{,}4 \times 10^4$ cfu/g. Nakon ozračivanja dozom 5 kGy uzorci su sadržavali prosječno $0{,}5 \times 10^2$ cfu/g, dok nakon ozračivanja dozom 10 kGy plijesni više nije bilo. Koncentracija fuminozina B1 28 sati nakon ozračivanja uzoraka iznosila je 6,0 mg/kg za kontrolni uzorak, dok je za uzorak ozračen dozom 2 kGy iznosila 8,3 mg/kg, za uzorak ozračen dozom 5 kGy 4,0 mg/kg, a za uzorak ozračen dozom 10 kGy 1,8 mg/kg. Zanimljiv je podatak da je porastao kapacitet proizvodnje mikotoksina od strane ozračene plijesni, ali samo kod doza do 2 kGy. Autori ovu pojavu objašnjavaju jednostavnim razrjeđenjem tj. smanjenjem

koncentracije plijesni u uzorku (nakon doze od 2 kGy preživjelo je 36% *F. verticiloides*), a koja je izravno povezana s kapacitetom proizvodnje mikotoksina. Pojava da doza do 2 kGy, iako značajno smanjuje broj plijesni u uzorcima, dovodi do povećane proizvodnje mikotoksina ukazuje na opasnosti zračenja uzoraka malim dozama.

U svom istraživanju Odamtten i suradnici (1987) također primjećuju da smanjenje količine inokuluma serijskim razrjeđenjem od 3-4 log ciklusa povećava proizvodnju aflatoksina B1 od strane *A. flavus* za 3-12 puta. U istom su istraživanju primijenili da je γ zračenje doze 3,5 kGy koje je smanjilo A. *flavus* za 3-5 log, nakon inkubacije proizvelo isti efekt povećane proizvodnje aflatoksina. Također, slično su zaključili i Sharma i suradnici (1980) koji su istraživali utjecaj doze 1,5 kGy γ zračenja na uzorke *A. parasiticus*. Doza od 1,5 kGy smanjila je količinu *A. parasiticus* za 4-5 log, ali to smanjenje je dovelo do dvostruko veće proizvodnje aflatoksina, a ista pojava je inducirana i jednostavnom serijskom dilucijom uzorka *A. parasiticus*.

4.3 PRIMJENA γ ZRAČENJA U REDUKCIJI KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA

Brojna su istraživanja koja ispituju utjecaj γ zračenja i na umjetno i na prirodno kontaminirane namirnice mikotoksinima. Neka od njih navedena su u daljnjem tekstu.

4.3.1 Ispitivanja na prirodno kontaminiranim uzorcima hrane

Markov i suradnici (2014) su u svojoj studiji istraživali utjecaj γ zračenja na koncentraciju aflatoksina B1 u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza. Koncentracija aflatoksina B1 mjerena je kompetitivnim ELISA. Na prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza detektirana je koncentracija aflatoksina B1 iznad 20 μg/kg, a koja je maksimalna koncentracija dozvoljena za ishranu životinja (prema Pravilniku NN 146/12). Zračenjem dozama 5 i 10 kGy dobiveni su sljedeći rezultati: doza od 5 kGy smanjila je koncentraciju aflatoksina B1 prosječno za 69,8%, a doza od 10 kGy za 94,5%. To upućuje na mogućnost da se hrana s koncentracijama aflatoksina B1 do 500 μg/kg može dozom zračenja od 10 kGy spustiti na zakonom prihvatljivu razinu.

Iqbal i suradnici (2013) su također istraživali utjecaj γ zračenja na koncentraciju aflatoksina B1 te ukupnih aflatoksina u prirodno kontaminiranim čili paprikama. Koncentraciju mikotoksina odredili su pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High Performance Liquid Cromatography*). Utvrđeno je da su uzorci sadržavali od 12 do 35 μg/kg ukupnih aflatoksina. Potom su zračeni dozama 2, 4, i 6 kGy. Smanjenje aflatoksina B1 je bilo najveće pri dozi od 6 kGy te je iznosilo 86-98%, a za ukupne aflatoksine 81-91% pri istoj dozi.

Akueche i suradnici (2012) ispitivali su utjecaj γ zračenja na degradaciju ukupnih aflatoksina te okratoksina A na uzorcima sezama (*Sesamum indicum L.).* U svojem istraživanju nisu uspjeli primijetiti potpunu korelaciju doze γ zračenja i stupnja degradacije mikotoksina te konzistentno smanjenje količine aflatoksina i okratoksina A u uzorcima ozračenim dozama od 3 do 15 kGy. Ipak, najveće smanjenje aflatoksina primijećeno je pri dozi od 15 kGy, te je za aflatoksine iznosilo 63-85%, a za okratoksin A 42-91%.

Istraživanje na kikirikiju, ali i kukuruzu, proveli su Farag i suradnici (1995) te također utvrdili da niti doza γ zračenja od 20 kGy nije dovoljna za potpunu destrukciju aflatoksina, ali je ona ipak bila značajna pošto su dozom od 20 kGy smanjili koncentraciju aflatoksina B1 za 85% u uzorcima kikirikija te 76% u uzorcima kukuruza.

Na prirodno kontaminiranim uzorcima kikirikija radili su Prado i suradnici (2003). Jedan uzorak je sadržavao 248,0 μg/kg aflatoksina B1, dok je drugi sadržavao 86 μg/kg aflatoksina B1 određenih tankoslojnom kromatografijom. Doze primijenjenog γ zračenja bile su u rasponu od 15-30 kGy te su bile dovoljne da se količina aflatoksina B1 smanji za 55-74%. Zanimljivo, u tom istraživanju nije primijećena povezanost doze sa smanjenjem sadržaja aflatoksina.

Do zanimljivih rezultata došli su Bhat i suradnici (2007) koji su na uzorcima sjemenki biljke *Mucuna pruriens* L. DC., prirodno kontaminiranih aflatoksinom B1, dozom od 10 kGy uspjeli sniziti aflatoksin B1 s 22,5 μg/kg do ispod limita detekcije, koji za tankoslojnu kromatografiju korištenu u ovom istraživanju iznosi 2 μg/kg. Autori ove rezultate pripisuju sekundarnom utjecaju γ zračenja koje se bazira na radiolizi vode i nastanku slobodnih radikala koji destabiliziraju i uništavaju furanski prsten kod aflatoksina B1. Slične rezultate, ali s dozom od 20 kGy dobili su isti autori u svom prethodnom istraživanju u kojem su utvrdili kako je navedena doza dovoljna za potpunu eliminaciju aflatoksina B1 za kikiriki, kukuruz, pšenicu te brašno pamukovih sjemenki (Bhat i sur., 2002).

Aquino i suradnici (2005) su također istraživali utjecaj γ zračenja na smanjenje aflatoksina u uzorcima kukuruza. U uzorcima ozračenim dozama 2 i 5 kGy, primijećeno je smanjenje aflatoksina B1 od 68,9 i 46%, dok je za aflatoksin B2 smanjenje iznosilo 97,6 i 94 % za doze 2 i 5 kGy. Pri primijenjenoj dozi od 10 kGy došlo je do potpune destrukcije aflatoksina B1 i B2. Veća redukcija aflatoksina B1 i B2 pri dozi od 2 kGy naspram doze od 5 kGy tumači se većom a_w tog uzorka. Naime, uzorci ozračeni dozom od 2 kGy imali su prosječni a_w 0,914, dok je za uzorke ozračene s 5 kGy a_w iznosio 0,884. Isto tako možemo spomenuti kako je za uzorke ozračene dozom 10 kGy a_w iznosio 0,944. Navedeni rezultati potvrđuju ulogu sadržaja vode u djelotvornosti γ zračenja zbog radiolize vode koja rezultira stvaranjem slobodnih radikala koji otvaraju furanski prsten aflatoksina.

4.3.2 Ispitivanja na umjetno kontaminiranim uzorcima hrane

Markov i suradnici (2014) su u svojoj studiji također istraživali utjecaj γ zračenja na koncentraciju aflatoksina B1 u umjetno kontaminiranim uzorcima kukuruza, a koncentracija aflatoksina B1 praćena je kompetitivnim ELISA. Umjetno kontaminirani uzorci zrna kukuruza, mljevenog kukuruza te stočne hrane kontaminirani koncentracijama od 50 i 100 μg/kg aflatoksina B1 te su zračeni dozama od 5 i 10 kGy. Kod cjelovitih zrna kontaminiranih s 50 μg/kg aflatoksina B1 i ozračenih dozom od 5 kGy došlo je do sniženja koncentracije aflatoksina B1 za oko 60%, dok je doza od 10 kGy snizila za 84%. Slično je bilo i kod uzoraka zrna

kontaminiranih sa 100 μg/kg aflatoksina B1 gdje je zabilježeno smanjenje od oko 80% pri dozi pod 5 kGy te oko 90% pri dozi od 10 kGy. Kod uzoraka mljevenog kukuruza, te stočne hrane, smanjenje je bilo slično kao i kod cijelih zrna, ali za 5-17% manje učinkovito.

Jalili i suradnici (2012) ozračivali su umjetno kontaminirane uzorke bijelog i crnog papra te mjerili koncentraciju preostalih aflatoksina HPLC-om. Uzorci su umjetno kontaminirani do koncentracije 60 μg/kg za aflatoksin B1 i G1 te 18 μg/kg za aflatoksin B2 i G2. Ispitivan je i utjecaj vlažnosti te je tako vlažnost podešena na 12 i 18%. Uzorci su ozračeni dozama 5, 10, 20 i 30 kGy. Istraživanje je pokazalo kako doze do 10 kGy nemaju značajan utjecaj na koncentraciju aflatoksina, dok tek doza od 30 kGy smanjuje koncentraciju AFB1 u uzorku bijelog papra s 12% vlage za 39,6±1,7% te u uzroku s 18% vlage za 50.6±2,8%. Slično je i za ostale mikotoksine, smanjenje koncentracije nigdje ne prelazi 50%. Gledajući rezultate istraživanja, čini se da vlaga ima značajnu ulogu u destrukciji aflatoksina, odnosno uzorci s više vlage imaju bolju redukciju mikotoksina. Pri zračenju primarna reakcija koja se događa je ionizacija vode na solvatizirani elektron i pozitivno nabijeni radikal vode koji se raspada na hidroksil radikal i vodikov ion. Adicija slobodnih radikala na dvostruku vezu je energetski povoljna i očekivana na aflatoksinu B1 i G1. Solvatizirani elektron se također može adirati na aromatske ili heterocikličke prstenove te na karbonilne skupine laktonskog prstena što se može očekivati kod aflatoksina. Smatra se da su ove reakcije ključne za smanjenje mutagenosti i toksičnosti ovih mikotoksina.

Još jedno istraživanje proveli su Jalili i suradnici (2008) koji su ozračivali umjetno kontaminirane uzorke crnog papra dozama od 0 do 60 kGy. Uzorci su kontaminirani aflatoksinima B1, B2, G1, G2 te okratoksinom A s ukupnom koncentracijom mikotoksina u rasponu od 10 do 100 μg/kg, čija je koncentracija praćena HPLC-om. Za primijenjene doze zračenja do 10 kGy primijećene su redukcije aflatoksina i okratoksina A reda veličine svega 10%. Kod doze od 30 kGy redukcija okratoksina A bila je u rasponu od 17 do 29%, a aflatoksina B1 od 15-32 %. Niti kod doze od 60 kGy, redukcija mikotoksina nije prelazila 50%. Ovo istraživanje pokazuje kako γ zračenje nije efikasno u redukciji mikotoksina.

Istraživanje na umjetno kontaminiranim uzorcima krmiva kontaminiranima sa 965, 421 i 210 μg/kg ukupnih aflatoksina od čega je 894, 395 i 192,1 μg/kg aflatoksin B1, provodili su Herzellah i suradnici (2008). Koncentracija aflatoksina mjerena je ELISA tehnikom, a primijenjene doze zračenja bile su 5, 10, 15, 20 i 25 kGy. Rezultati su pokazali kako primijenjena doza od 10 kGy dovela do smanjenja od 13,9%, 9,7% te 19,1% za uzorke sa 965,

421 i 210 μg/kg ukupnih aflatoksina dok je smanjenje za aflatoksin B1 bilo 12,8%, 18,9% te 21,9%. Tek je kod doze od 25 kGy primijećeno značajnije smanjenje koje se kretalo između 34 i 40% za ukupne aflatoksine te između 32 i 42% za aflatoksin B1. Ovo istraživanje pokazuje da je γ zračenje relativno neuspješna metoda za smanjenje ukupne konventracije aflatoksina

Ghanem i suradnici (2008) su ispitivali utjecaj γ zračenja na degradaciju aflatoksina B1 na različitim uzorcima hrane (kikiriki, pistacio, riža, kukuruz) i stočne hrane (ječam, kukuruz, mekinje) inokulirane s 10^6 spora/100g uzorka *A. flavus.* Uzorci su inkubirani 10 dana na 27 °C te nakon inkubacije ozračeni s 4, 6, i 10 kGy. Kvantifikacija aflatoksina B1 bila je provedena tankoslojnom kromatografijom. Smanjenje aflatoksina B1 bilo je u korelaciji s primijenjenom dozom, te je za 10 kGy smanjenje bilo najveće i iznosilo je 58,6% za kikiriki, 68,8% za pistacio 84,6% za pistacio u ljuski, 81,1% za kukuruz te 87,8% za rižu. U uzorcima stočne hrane, pri dozi od 10 kGy smanjenje aflatoksina B1 iznosilo je 90% za ječam, 86% za mekinje i 84% kukuruz. Autori su primjetili da je degradacija aflatoksina B1 u negativnoj korelaciji sa sadržajem ulja u uzorcima. Tako je kod kikirikija, koji sadrži najviše ulja smanjenje aflatoksina B1 pri dozi 10 kGy bilo 58,6%, dok je za kukuruz, koji sadrži najmanje ulja, smanjenje aflatoksina dosezalo do 80%.

Nešto drugačije rezultate dobili su Vita i suradnici (2014) koji su promatrali redukciju aflatoksina B1, B2, G1 i G2 te okratoksina A u umjetno kontaminiranim uzorcima badema. Bademi su kontaminirani s 20 μg/kg svakog toksina te ozračivani dozama do 15 kGy. Detekcija mikotoksina provedena je HPLC-om uz fluorescencijski detektor. Rezultati su pokazali kako je doza od 10 kGy dovela do smanjena od 12,9%, 2,9%, 18,9%, 10% i 16,3% za aflatoksin B1, B2, G1, G2 i okratoksin A, dok je za dozu zračenja od 15 kGy smanjenje iznosilo 19,25%, 10,99%, 21,11%, 16,62%, 23,90%. Vita i suradnici (2014b) istraživali su i redukciju aflatoksina i okratoksina A u uzorcima stočne hrane umjetno kontaminiranim sa po 25 μg/kg svakog mikotoksina. Uzorci su ozračivani dozama do 15 kGy te je detekcija aflatoksina također provođena HPLC-om uz fluorescencijski detektor. Nakon primijenjenih doza do 3 kGy nije primijećeno smanjenje koncentracije mikotoksina. Primjetno smanjenje zapaženo je tek kod doza od 15 kGy koje su dovele do smanjenja od 23,9%, 18,2%, 11,0%, 21,1% i 13,6% za okratoksin A, aflatoksin B1, aflatoksin B2, aflatoksin G1 i aflatoksin G2. Za uzrok ovako malog smanjenja koncentracije mikotoksina autori smatraju odsustvo vode u uzorcima te nameću zaključak da je radioliza vode uzrokovana γ zračenjem od velikog značaja za redukciju mikotoksina u uzorcima.

Van Dyck i suradnici (1982) su proveli istraživanje utjecaja γ zračenja na aflatoksin B1 u vodenoj otopine koncentracije 5 μg/mL. Destrukcija aflatoksina B1 mjerena je Amesovim testom gdje je korišten soj *Salmonella typhimurium* TA 98, a primijenjene su doze zračenja do 20 kGy. Rezultati su pokazali kako je došlo do smanjenja aflatoksina B1 za 34, 48,7, 74 i 100% kod primijenjenih doza od 2,5, 5, 10 i 20 kGy. Ipak, autori nisu primijetili konzistentnost u destrukciji aflatoksina, jer su ponovljenim mjerenjem nakon primijenjene doze od 10 kGy primijetili smanjenje aflatoksina B1 od 90%. Također, primijetili su da je postotak destrukcije aflatoksina B1 povezan i s njegovom koncentracijom u otopini jer je nakon ozračivanja otopine koncentracije 250 μg/mL smanjenje aflatoksina B1 iznosilo samo 14%.

Da se γ zračenjem ne može postići nikakvo smanjenje aflatoksina tvrde Hooshmand i Klopfenstein (1995) koji su provodili istraživanje na umjetno kontaminiranim uzorcima pšenice, kukuruza i soje različitih vlažnosti (9, 13 te 17%). Primijenjene doze bile su 5, 7,5, 10 i 20 kGy te je kvantifikacija aflatoksina B1 provedena ELISA tehnikom. Rezultati govore kako niti doza od 20 kGy nije dovela do statistički značajnog sniženja koncentracije aflatoksina B1. Isti zaključak donosi i studija koju su proveli Feuell i suradnici (1966) koji su zaključili kako niti doza od 25 kGy nema statistički značajnog utjecaja na razliku između koncentracije aflatoksina B1 u ozračenom ili neozračenom uzorku kikirikijevog brašna, mjereno testom fluorescencije.

5 ZAKLJUČCI

Nakon detaljnog proučavanja dostupne literature o utjecaju γ zračenja na rast plijesni i produkciju mikotoksina te utjecaju γ zračenja na degradaciju već nastalih mikotoksina, možemo izvesti nekoliko zaključaka:

- γ zračenje je učinkovito u prevenciji prisustva mikotoksina jer zaustavlja germinaciju rast i sporulaciju plijesni
- kao optimalna doza za kontrolu mikrobioloških kontaminanata nameće se doza od 5 kGy, dok je za potpunu eliminaciju svih plijesni optimalna doza 10 kGy
- utjecaj γ zračenja na nutritivne vrijednosti zanemariv je kod doza do 10 kGy
- niske doze γ zračenja do 2 kGy mogu uzrokovati povećanu proizvodnju mikotoksina kao posljedicu adaptivnog odgovora na nepovoljne okolišne čimbenike, ali i moguće promjene u molekuli DNA
- rezultati ispitivanja utjecaja γ zračenja na smanjenje koncentracije mikotoksina su kontradiktorni te nije moguće napraviti valjani zaključak učinkovitosti ove metode na smanjenje mikotoksina u uzorcima hrane za doze γ zračenja do 10 kGy koje, kao takve, ne utječu značajno na kvalitetu ispitivanih namirnica
- postotak smanjenja mikotoksina je u izravnoj vezi s koncentracijom mikotoksina te je njihov odnos obrnuto proporcionalan
- na smanjenje koncentracije aflatoksina u uzrocima veliki utjecaj ima sadržaj vode zbog nastanka slobodnih radikala koji otvaraju furanski prsten aflatoksina što donekle može objasniti manji učinak γ zračenja na aflatoksine u uzorcima s malim sadržajem vode te izvrstan učinak γ zračenja na aflatoksine u vodenoj otopini

6 LITERATURA

- Akueche EC, Anjorin ST, Harcourt BI, Kana D, Adeboye E, Shehu I, Adesanmi C. A. Studies on fungal load, total aflatoxins and ochratoxin A contents of gamma-irradiated and non-irradiated Sesamum indicum grains from Abuja markets, Nigeria. Kasetsart. *J Nat Sci*, 2002, 46, 371-82.
- Aquino S, Ferreira F, Ribeiro DHB, Corrêa B, Greiner R, Villavicencio ALCH. Evaluation of viability of Aspergillus flavus and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. *Braz J Microbiol*, 2005, 36, 352-356.
- Aquino S, Gonçalez E, Reis TA, Sabundjian IT, Trindade RA, Rossi MH, Villavicencio, ALCH. Effect of γ-irradiation on mycoflora of guarana (Paullinia cupana). *Radiat Phys Chem*, 2007, 76, 1470-1473.
- Aziz NH, Moussa LA. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*, 2002, 13, 281-288.
- Aziz NH, Youssef BM. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some Egyptian foods a and agricultural commodities by gamma-irradiation. *Egypt J Food Sci*, 2002, 30, 167–177.
- Aziz NH, Souzan RM, Shahin Azza A. Effect of γ-irradiation on the occurrence of pathogenic microorganisms and nutritive value of four principal cereal grains. *Appl Radiat Isot*, 2006, 64, 1555-1562.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003 ,16, 497-516.
- Bhat R, Rai RV, Karim AA. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr Rev Food Sci F*, 2010, 9, 57-81.
- Bhat R, Sridhar KR, Velmourougane K. Microbial quality evaluation of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens* L. DC.) exposed to ionizing radiation. *Trop Subtrop Agroecosyst*, 2007, 7, 29–40.
- Bhat R, Sridhar KR, Karim AA. Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation. *Radiat Phys Chem*, 2010, 79, 976-981.
- [CAST] Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: economic and health risks. Task force report no. 116. Ames, Iowa: *Council for Agricultural Science and Technology*, 1989
- Di Stefano V, Pitonzo R, Avellone G. Effect of gammairradiation on aflatoxins and ochratoxin A reduction in almond samples. *J Food Res*, 2014, 3, 113–118..

- Di Stefano, V, Pitonzo, R, Cicero, N, D'Oca, MC. Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Addit Contam, Part A*, 2014, 1-6.
- Farag RS, Rashed MM, Hussein AA, Abo-Hagar A. Effect of gamma radiation on the infected yellow corn and peanuts by Aspergillus flavus. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm*, 1995, 17, 93-98.
- Farag SA, Aziz NH, Attia, EA. Effect of irradiation on the microbiological status and flavouring materials of selected spices. *Z Lebens Unters For*, 1995, 201, 283-288.
- Ferreira-Castro FL, Aquino S, Greiner R, Ribeiro DHB, Reis TA, Correa B. Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with Fusarium verticillioides. *Appl Radiat Isot*, 2007, 65, 927-933.
- Ghanem I, Orfi M, Shamma M. Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B1 in food and feed crops. *Braz J Microbiol*, 2008, 39, 787-791.
- Gumus T, Gecgel U, Demirci AS, Arici M. Effects of gamma irradiation on two heat resistant moulds: Aspergillus fumigatus and Paecilomyces variotii isolated from margarine. *Radiat Phys Chem*, 2008, 77, 680-683.
- Herzallah S, Alshawabkeh K, AL Fataftah A. Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ-Radiation, and microwave heating. *J Appl Poultry Res*, 2008, 17, 4515-521.
- Hooshmand H, Klopfenstein CF. Effects of gamma irradiation on mycotoxin disappearance and amino acid contents of corn, wheat, and soybeans with different moisture contents. *Plant foods hum nutr*, 1995, 47, 227-238.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Traditional Herbal Medicines, Some mycotoxins, Naphthalene and Styrene: Summary of Dana Reported and Evaluation, 2002, vol.82.
- Iqbal, SZ, Bhatti IA, Asi MR, Zuber M, Shahid M, Parveen I. Effect of γ irradiation on fungal load and aflatoxins reduction in red chillies. *Radiat Phys Chem*, 2013, 82, 80-84.
- Jalili M, Jinap S, Noranizan A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control*, 2010, 21, 1388-1393.
- Jalili M, Jinap S, Noranizan MA. Aflatoxins and ochratoxin a reduction in black and white pepper by gamma radiation. *Radiat Phys Chem*, 2012, 81, 1786-1788.
- Janković S. Biološki učinci djelovanja ionizirajućih zračenja. (pristupljeno tijekom 4. 2015. na url: http://genom.mefst.hr/Globaldizajn/katedre/med_radiologija/P2.ppt)

- Legnani PP, Leoni E, Righi F, Zarabini LA. Effect of microwave heating and gamma irradiation on microbiological quality of spices and herbs. 2001, *Ital J Food Sci,* 13, 337–45.
- Libernjak H. Rizici pojave karcinom uslijed izloženosti ionizirajućem zračenju, seminarski rad iz kolegija Ergonomija računalne i programske opreme, 2003./2004. (pristupljeno tijekom 4. 2015. na url: http://web.zpr.fer.hr/ergonomija/2004/Librenjakk/IOzracenje.pdf)
- Lima KdSC, Souza LB, Godoy RLdO, Franc¸a TCC, Lima ALdS. Effect of gamma irradiation and cooking on cowpea bean grains (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Radiat Phys Chem,* 2011, 80, 983–989.
- Maity JP, Chakraborty A, Chanda S, Santra SC. Effect of gamma radiation on growth and survival of common seed-borne fungi in India. *Radiat Phys Chem,* 2008, 77, 907-912.
- Markov K, Mihaljević B, Domijan AM, Pleadin J, Delaš F, Frece J. Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of aflatoxin B 1 in vitro and in situ using gamma irradiation. *Food control,* 2015, *54*, 79-85.
- Mishra HN, Das CA. Review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Crit Rev Food Sci Nutr,* 2003, 43, 245-264.
- Nierman WC, Cleveland TE, Payne GA, Keller NP, Campbell BC, Bennett JW, Guo B, Yu J, Robens JF. Mycotoxin Production and Prevention of Aflatoxin Contamination in Food and Feed. In: Goldman GH, Osmani SA. The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods. *Boca Raton: CRC Press,* 2008, 457-472.
- Odamtten GT, Appiah V, Langerak DI. Influence of inoculum size of Aspergillus flavus link on the production of aflatoxin B 1 in maize medium before and after exposure to combination treatment of heat and gamma radiation. *Int J Food Microbiol,* 1987, 4, 119-127.
- Oliveira CAF. Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects,* 2013, 1, 59-62.
- Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze. Školska knjiga, Zagreb, 1995.
- Peraica M, Domijan AM, Jurjević Ž, Cvjetković B. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arh Hig Rada Toksikol,* 2002, 53, 229-237.

- Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ*, 1999, 77, 754-766.
- Pitt JI. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull*, 2000, 56, 184-192.
- Prado G, Carvalho EPD, Oliveira MS, Madeira JGC, Morais VD, Correa RF, Gonçalves RCP. Effect of gamma irradiation on the inactivation of aflatoxin B1 and fungal flora in peanut. *Braz J Microbiol*, 2003, 34, 138-140.
- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. 2012, Zagreb, Narodne novine, broj 146 (NN 146/12),
- Ribeiro J, Cavaglieri L, Vital H, Cristofolini A, Merkis C, Astorec A, Rosa CAR. Effect of gamma radiation on Aspergillus flavus and Aspergillus ochraceus ultrastructure and mycotoxin production. *Radiat Phys Chem*, 2011, 80, 658-663.
- Sharma ARUN, Behere AG, Padwal-Desai SR, Nadkarni GB. Influence of inoculum size of Aspergillus parasiticus spores on aflatoxin production. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 40, 989-993.
- Williams JH, Phillips TD, Jollym PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clinic Nutr*, 2004, 80, 1106–22

7 SAŽETAK/SUMMARY

Sažetak

Plijesni su mikroskopske gljive široko raširene u prirodi te je kontaminacija plijesnima i njihovim sekundarnim metabolitima, mikotoksinima neizbježna. Mikotoksini predstavljaju veliki javnozdravstveni problem. Plijesni porodice *Aspergillus* proizvode aflatoksine, koji su jedni od najtoksičnijih mikotoksina i dokazani karcinogen za ljude, što je i potvrdila Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) koja je aflatoksine svrstala u prvu grupu karcinogena. Također su fumonizini, sekundarni metaboliti plijesni roda *Fusarium,* te okratoksin A, mikotoksin koji proizvode plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* svrstani u skupinu 2B, mogućih karcinogena za ljude. Cilj ovoga rada bio je istražiti dostupnu literaturu koja bi argumentirala da li je γ zračenje, koje je već dugo vremena u praksi prihvaćena metoda sterilizacije medicinskog pribora i pasterizacije hrane, metoda koja može spriječiti kontaminaciju hrane mikotoksinima te također dekontaminirati već mikotoksinima kontaminiranu hranu. Iz pregleda dosadašnjih istraživanja može se zaključiti kako je prikladnim dozama γ zračenja koje ne utječu na kvalitetu hrane moguće uništiti plijesni, ali ne i adekvatno djelovati na same mikotoksine nakon njihove produkcije. To upućuje na važnost prevencije kontaminacije hrane plijesnima adekvatnim načinom proizvodnje i skladištenja hrane.

Summary

Molds are microscopic fungi, ubiquitous in nature, thus making contamination by them and their secondary metabolites, mycotoxins, virtually inevitable. Mycotoxins present a serious public health issue. Mold genus *Aspergillus* produce aflatoxins, one of the most toxic mycotoxins, proven carcinogens for humans, which was confirmed by International Agency for Research on Cancer, whose experts grouped aflatoxins into Group 1 carcinogens. Furthermore, fumonisins, secondary metabolites of the genus *Fusarium*, and ochratoxin A, mycotoxin produced by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, have been grouped into Group 2B, which are potential carcinogens for humans. The main objective of this thesis was to research available literature which would argue whether γ radiation, which has been established as a common method of sterilization and pasteurization of medical equipment and food, could be applied as a method of both preventing contamination of food by molds, and method of decontamination of mycotoxin contaminated food. Overview of the current literature points to the conclusion that appropriate doses of γ radiation, which would not affect the quality of the food radiated, would destroy the molds, but unfortunately would not have an adequate effect on already produced mycotoxins. This signifies the importance of prevention of food mold contamination by adequate means of food production and storage.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku botaniku
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Primjena γ zračenja u prevenciji izloženosti mikotoksinima

Davor Bazijanec

SAŽETAK

Plijesni su mikroskopske gljive široko raširene u prirodi te je kontaminacija plijesnima i njihovim sekundarnim metabolitima, mikotoksinima neizbježna. Neke plijesni proizvode mikotoksine koji predstavljaju veliki javnozdravstveni problem. Tako plijesni porodice *Aspergillus* proizvode aflatoksine, koji su jedni od najtoksičnijih mikotoksina i dokazani karcinogen za ljude, što je i potvrdila Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) koja je aflatoksine svrstala u prvu grupu karcinogena. Također su fumonizini, sekundarni metaboliti plijesni roda *Fusarium* te okratoksin A, mikotoksin koji proizvode plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* svrstani u skupinu 2B, mogućih karcinogena za ljude. Cilj ovoga rada bio je istražiti dostupnu literaturu koja bi argumentirala da li je γ zračenje, koje je već dugo vremena u praksi prihvaćena metoda sterilizacije medicinskog pribora i pasterizacije hrane, metoda koja može spriječiti kontaminaciju hrane mikotoksinima te također dekontaminirati već mikotoksinima kontaminiranu hranu. Dosadašnja istraživanja govore u prilog tome kako je prikladnim dozama γ zračenja koje ne utječu na kvalitetu hrane moguće uništiti plijesni, ali ne i adekvatno djelovati na same mikotoksine nakon njihove produkcije, što upućuje na važnost prevencije kontaminacije hrane plijesnima adekvatnim načinom proizvodnje i skladištenja hrane.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 34 stranica, 1 grafički prikaz, 2 tablice i 43 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: γ irradiation, mycotoxins, decontamination, aflatoxins

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Erim Bešić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Botany
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Application of γ irradiation in prevention of mycotoxin exposure

Davor Bazijanec

SUMMARY

Molds are microscopic fungi, ubiquitous in nature, thus making contamination by them and their secondary metabolites, mycotoxins, virtually inevitable. Mycotoxins present a serious public health issue. Mold genus *Aspergillus* produce aflatoxins, one of the most toxic mycotoxins, proven carcinogens for humans, which was confirmed by International Agency for Research on Cancer, whose experts grouped aflatoxins into Group 1 carcinogens. Furthermore, fumonisins, secondary metabolites of the genus *Fusarium*, and ochratoxin A, mycotoxin produced by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, have been grouped into Group 2B, which are potential carcinogens for humans. The main objective of this thesis was to research available literature which would argue whether γ radiation, which has been established as a common method of sterilization and pasteurization of medical equipment and food, could be applied as a method of both preventing contamination of food by molds, and method of decontamination of mycotoxin contaminated food. Overview of the current literature points to the conclusion that appropriate doses of γ radiation, which would not affect the quality of the food radiated, would destroy the molds, but unfortunately would not have an adequate effect on already produced mycotoxins. This signifies the importance of prevention of food mold contamination by adequate means of food production and storage.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 34 pages, 1 figures, 2 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: γ irradiation, mycotoxins, decontamination, aflatoxins

Mentor: **Ana-Marija Domijan**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Renata Jurišić Grubešić, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Erim Bešić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2015.