

## 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-Strmečki<sup>1</sup>, N., B. Rakvin<sup>2</sup>

### 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

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

<sup>2</sup>Dr. 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/cm<sup>3</sup>) je pogodna za dozimetriju stoga što je time ispunjen zahtjev da gustoća i elektronska gustoća moraju biti što bliži onima od vode ( $\approx 1.0$  g/cm<sup>3</sup>) i usko vezani s onima od ljudskog tkiva (hrskavica 1.09 g/cm<sup>3</sup>, tekuće tvari kao krv, žuč, mozak itd. 1.01-1.06 g/cm<sup>3</sup>, mast 0.92 g/cm<sup>3</sup>, kosti 1.9 g/cm<sup>3</sup>), 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/cm<sup>3</sup>, a Si u diodnom dozimetru 2.33 g/cm<sup>3</sup>).

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. Spetzier, (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 10<sup>4</sup> g<sup>-1</sup>. Tih 9 % je predstavljalo čak 96 % od utvrđenog broja *E. coli* O157 u svim uzorcima. U svim izolatima je utvrđen vt<sub>2</sub> gen, u 39 izolata eaeA, a u 5 izolata vt<sub>1</sub> 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