

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

Igor Bemko

Utjecaj hibrida i suše na povezanost sadržaja i antioksidacijske
aktivnosti fenola s kontaminacijom mikotoksinima zrna kukuruza

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Kristine Kljak i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2013/2014.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	3
3. MATERIJALI I METODE	4
3.1. Hibridi kukuruza.....	4
3.2. Metode.....	5
3.2.1. Sadržaj vode	5
3.2.2. Sadržaj fenola	5
3.2.3. Antioksidacijska aktivnost frakcija fenola prema TEAC metodi	6
3.2.4. Sadržaj mikotoksina	6
3.3. Statistička obrada podataka	6
4. REZULTATI.....	8
5. RASPRAVA.....	14
6. ZAKLJUČCI	17
7. ZAHVALE	18
8. LITERATURA.....	19
SAŽETAK	21
SUMMARY	22

1. UVOD

Iako su već nekoliko desetljeća poznati kao kontaminanti krmiva i hrane, mikotoksini i dalje dobivaju značajnu javnu i znanstvenu pažnju kao veliki uzročnik ekonomskih gubitaka. Nedavna afera s mikotoksinima u mlijeku samo je primjer moguće štete, dok se isti mogu naći i u mesu, iznutricama i jajima (Yiannikouris i Jouany, 2002). Ova zaraza posljedica je unosa mikotoksina u organizam životinje preko krmiva, od kojih, kako u svijetu tako i Hrvatskoj, veliku ulogu igra i kukuruz (FAO 2009).

Upravo za kukuruz najveću ekonomsku štetu uzrokuju toksigene pljesni *Aspergillus*, *Fusarium*, te u manjoj mjeri *Penicillium*. *Aspergillus*-ov aflatoksin uzročnik je kontaminacije mlijeka u spomenutoj aferi, dok su mikotoksini *Fusarium* pljesni, prvenstveno fumonizin a zatim DON, zearalenon i T2, jednako prisutan problem. Okratoksin, proizvod *Aspergillus* i *Penicillium* pljesni, manji je uzročnik zaraze kukuruza (Munkvold i sur., 2003). Navedene *Fusarium* i *Aspergillus* pljesni mogu rasti i prilikom skladištenja, dok opseg njihove pojave uvelike ovisi o vremenskim uvjetima (Munkvold i sur., 2003). Naime, utvrđeno je da okolišni faktori kao što su aktivitet vode, temperatura i pH, imaju snažan utjecaj na biosintezu mikotoksina (Schmidt-Heydt i sur., 2008), kako tijekom rasta biljke, tako i tijekom skladištenja.

U istraživanju koje su proveli Schmidt-Heydt i sur. (2008) na *Penicillium verrucosum* u uvjetima povišene temperature (od 25 do 30 °C) uočen je značajniji rast pljesni u odnosu na niže temperature. Istraživanje je provedeno *in vitro*, te opisuje uvjete koji mogu nastati i na polju i pri skladištenju. Isti autori definirali su i optimalnu temperaturu za stvaranje aflatoksina – 28 °C. Ova opažanja o temperaturama pogodnim za rast pljesni i stvaranje mikotoksina sugeriraju da se pri stalnim povišenim temperaturama, kao što su uvjeti suše na našim područjima, može očekivati i veća pojava mikotoksina. Prema tome, sama lokacija proizvodnje kukuruza sa svojom mikroklimom može utjecati na pojavu mikotoksina.

Značaj obrane kukuruza od mikotoksina nije striktno ekonomski, jer ovi sekundarni metaboliti pljesni predstavljaju i direktnu opasnost po zdravlje ljudi i životinja koji konzumiraju proizvode zaražene mikotoksinima (Sinovec i Resanović, 2005). Sama šteta koju uzrokuju ovisi o mikotoksinu i njegovoj količini koja se unese. Na primjer, trenutno aktualni aflatoksin navodi se kao uzročnik raka jetre kod ljudi (Bennett i Klich., 2003), dok je fumonizin povezan s pojavom plućnih edema u svinja (D'mello i sur., 1999). Same posljedice unosa variraju i između vrsta, pa je tako isti fumonizin između ostalog povezan i s leukoencefalomalacijom u konja (D'mello i sur., 1999). Generalno smanjenje proizvodnje, uz povećanu smrtnost, koje uzrokuje zaraza mikotoksina na taj način može nanijeti i velike ekonomske gubitke u stočarskoj proizvodnji (Yiannikouris i Jouany, 2002).

U tom svijetlu jasni su motivi i ulaganja usmjerena prema istraživanju pljesni i mikotoksina te otkrivanju mehanizama obrane od mikotoksina. Tako i velika skupina fenolnih spojeva, koja uključuje podskupine spojeva kao što su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini, dobiva veću znanstvenu pažnju. Fenoli se stvaraju prirodno tijekom rasta, a u većoj količini kao odgovor biljke na stres zbog njihove zaštitne uloge u obrani od mikroorganizama i mikotoksina (Naczki i Shahidi, 2006). Nadalje, zbog dokazanog antioksidacijskog potencijala, fenoli imaju i potencijalno blagotvorni učinak za metabolizam životinja i ljudi (Vitaglione i sur., 2008). Iako sadržaj fenola ovisi o samoj biljci i uvjetima uzgoja, ali i stresnim uvjetima (infekcija patogenima, oštećenja i ekstremne temperature) kao i o skladištenju i daljnjoj obradi biljaka nakon branja (Naczki i Shahidi, 2006), prema Adom i Liu (2002) kukuruz ima najveći sadržaj fenola od istraživanih žitarica (riža, pšenica, ječam). Nadalje, fenolni spojevi u tkivu biljke mogu biti u slobodnom ili vezanom obliku. Tako se u zrnu kukuruza većim dijelom nalaze u vezanom obliku, te su u tom obliku glavni izvor antioksidacijske vrijednosti (Adom i Liu, 2002).

Biljke se razlikuju u sastavu fenolnih spojeva i njihovim omjerima, a moguće su i varijacije unutar iste biljke koje su rezultat utjecaja genotipa i stadija zrelosti (McKeehen i sur., 1999). Tako je u zreloom zrnu kukuruza dominantan spoj ferulinska kiselina (85%), dok su u značajno manjem sadržaju prisutne vanilinska, protokatehinska, sirniginska, *p*-kumarinska, kafeinska i sinapinska kiselina (Sosulski i sur., 1982). Tijekom reproduktivnog rasta kukuruza u zrnu se u većem udjelu stvara *p*-kumarinska kiselina, ali njezin udio naglo pada sa zrelosti zrna (McKeehen i sur., 1999).

Fenoli staničnih stjenki – vezani na različite komponente stjenke – igraju strukturnu ulogu i predstavljaju fizičku barijeru biljke (Naczki i Shahidi, 2006) zbog čega mogu sudjelovati u obrani od mikroorganizama indirektno, kao prekursor sintezi lignina i drugih polifenolnih barijera induciranih kao odgovor na fizičko oštećenje, ili direktno. U tom kontekstu, istražen je učinak fenolnih spojeva, *p*-kumarinske kiseline i ferulinske kiseline (Bakan i sur., 2003), koje se u zrnu kukuruza dijelom nalaze u vezanom netopivom obliku. Rezultati potvrđuju značajnu inhibiciju *Fusarium* pljesni *in vitro* i smanjenu produkciju mikotoksina 15ADON, mikotoksina pljesni *F. graminearum*, za više od 50% (Bakan i sur., 2003). Kako navode autori, ova inhibicija posljedica je djelovanja hidrolaza koje proizvode *Fusarium* pljesni, a koje oslobađaju ferulinsku kiselinu iz vezanog oblika. Ovi slobodni ferulati mogu smanjiti sposobnost stvaranja mikotoksina *Fusarium* pljesni. Sličan efekt dodatka ferulinske kiseline postignut je i na stvaranje aflatoksina B1 (Bakan i sur., 2003), a kako navode Hua i sur. (1999), inhibicija aflatoksina može se postići i dodatkom sinapske kiseline.

2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Temeljem dokazane povezanosti fenola i smanjenog sadržaja mikotoksina, hipoteza ovog rada jest da će fenoli kukuruza ublažiti stvaranje mikotoksina u znu različitih hibrida proizvedenih u nepovoljnim uvjetima.

Opći ciljevi rada:

- odrediti sadržaj slobodnih, vezanih i ukupnih fenola pet hibrida kukuruza proizvedenih na dvije lokacije, te njihovu antioksidacijsku aktivnost,
- usporediti rezultate sadržaja fenola u pojedinim frakcijama i pripadajućim antioksidacijskim aktivnostima prema hibridu kukuruza i lokaciji proizvodnje,
- utvrditi povezanost između antioksidacijske aktivnosti (TEAC metoda) i sadržaja fenola pojedinih frakcija,
- usporediti hibride kukuruza proizvedene na dvije lokacije prema sadržaju mikotoksina aflatoxin B1, okratoksin A, zearalenon, deoksinivalenol (DON), fumonizin i T-2 toksin.

Specifični cilj rada je ispitati povezanost između sadržaja mikotoksina i fenola pojedinih frakcija te njihovih antioksidacijskih aktivnosti ovisno o hibridu i lokaciji uzgoja zrna kukuruza.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Hibridi kukuruza

U provedenom istraživanju korišteno je pet hibrida žutog zrna (Bc 354, Bc 572, Bc 574, Bc 582 i Pajdaš. Zrno kukuruza proizvedeno je na dva testna poljara različitih lokacija u središnjoj (lokacija Krapje) i istočnoj (lokacija Sičice) Hrvatskoj u vegetacijskoj sezoni 2012. godine. Na oba testna polja primijenjena je ista agrotehnika, dok je tlo lokacija različito: u Krapju je aluvij, a u Šičicama glinasto-illovasto tlo. Vremenski uvjeti tijekom rasta kukuruza nisu mjereni na samom testnom polju nego su uzeti podaci s mjernih postaja u neposrednoj blizini testnih polja. U tablici 1 su prikazane srednje vrijednosti srednje dnevne temperature i količine oborina mjernih postaja za svaku lokaciju.

Tablica 1: Količina oborina i prosječna dnevna temperatura lokacija proizvodnje zrna hibrida kukuruza

Vremenski uvjeti	Lokacija	Travanj	Svibanj	Lipanj	Srpanj	Kolovoz	Rujan
Količina oborina (mm)	Krapje	82,1	95,3	125,2	44,8	10,9	80,1
	Sičice	69,4	82,0	152,0	30,8	8,5	63,8
Prosječna dnevna temperatura (°C)	Krapje	11,9	15,8	20,8	23,3	22,9	17,4
	Sičice	11,9	15,6	21,3	24,0	23,4	17,8

Svaki hibrid je bio zasijan na jednoj pokusnoj parceli testnog polja lokacije. Nakon fiziološke zrelosti kukuruz je ubran s pet mjesta u istoj ravnini svih parcela (pet repeticija svakog hibrida). Nakon dostave u laboratorij, klipovi su prosušeni tri dana na 40°C, orunjeni, te zrno spremljeno u papirnatim vrećicama na +4°C do početka analiza. Neposredno prije početka analiza uzorci su samljeveni na mlinu Cyclotec (Tecator, Švedska) na veličinu čestica $\leq 0,5$ mm.

3.2. Metode

3.2.1. Sadržaj vode

Sadržaj vode u uzorcima određen je u skladu s normom HRN ISO 6496:2001 (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2001). Uzorak je sušen je u sušioniku (UFE 400, Memmert, Njemačka) četiri sata na 103 °C; na temelju mase uzorka prije i poslije sušenja izračunat je sadržaj vode. Rezultati svih tvari analiziranih u provedenom istraživanju preračunati su na 100% suhe tvari.

3.2.2. Sadržaj fenola

Ekstrakcija fenola uzoraka zrna kukuruza provedena je prema postupku opisanom u radu Vinson i sur. (1998). Slobodni fenoli ekstrahirani su 50%-tnim metanolom, dok su ukupni fenoli ekstrahirani 1,2 M otopinom kloridne kiseline u 50%-tnom metanolu. Nakon dodatka otapala, epruvete su začepljene i inkubirane pri 90°C kroz dva sata s vorteksiranjem svakih pola sata, i nakon inkubacije ohlađene. Epruvete s uzorcima za određivanje slobodnih fenola su centrifugirane 5 min pri 2200 g (Centric 322A, Tehtnica, Slovenija), nakon čega je ekstrakt prebačen u odmjernu tikvicu od 10 ml, a talog ispran dva puta s 50%-tnim metanolom. Volumen odmjerne tikvice nadopunjen je 50%-tnim metanolom do oznake. Sadržaj epruveta s uzorcima za određivanje ukupnih fenola prvo je neutraliziran s kalijevom lužinom do pH vrijednosti 6,7 – 6,8, nakon čega je postupak kvantitativnog prijenosa ekstrakta u odmjerne tikvice od 25 ml proveden kao i kod slobodnih fenola.

Detekcija ukupnih fenola u frakcijama provedena je prema Folin-Ciocalteu postupku opisanom u radu Zieliński i Kozłowska (2000). Alikvot (0,25 ml) razrjeđenja ekstrakta (slobodni bez razrjeđenja, ukupni razrjeđenje s 50%-tnim metanolom u omjeru 1:2, v/v) promiješani su s 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđenog s vodom 1:1, v/v), 0,5 ml zasićene otopine natrijevog karbonata i 4 ml vode. Smjesa je nakon vorteksiranja ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 25 min. Nakon centrifugiranja (2200 g, 5 min), apsorbancija supernatanta je izmjerena na 725 nm (Helios γ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanija). Sadržaj ukupnih fenola u pojedinoj frakciji izražen su kao ekvivalenti galske kiseline (μg galske kiseline/g) pri čemu su konačne koncentracije galske kiseline za izradu kalibracijskog pravca bile u rasponu od 0,4 do 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Sadržaj frakcije vezanih fenola dobiven je računski preko razlike sadržaja ukupnih i slobodnih fenola.

3.2.3. Antioksidacijska aktivnost frakcija fenola prema TEAC metodi

Antioksidacijska aktivnost pripremljenog ekstrakta prema TEAC (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) testu zasnovana je na neutralizaciji stabilnog radikal kationa ABTS•+ (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina) antioksidansa ekstrakta, a provedena je prema metodi opisanoj u radu Re i sur. (1999). Otopina radikal kationa plavo-zelene je boje, a neutralizacijom dolazi do obezbojenja te se doseg može pratiti spektrofotometrijski. Doseg neutralizacije ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta. Ishodna otopina ABTS•+ pripremljena je reakcijom 7 mmol/l otopine ABTS i 2,45 mmol/l otopine natrijeva persulfata, a stabilna koncentracija radikal kationa postignuta je nakon stajanja 12 – 16 sati u mraku pri sobnoj temperaturi. Radna otopina pripremljena je svakog dana razrjeđenjem ishodne otopine s PBS puferom (eng. Phosphate Buffered Saline) do vrijednosti apsorbancije otopine $0,70 \pm 0,02$ pri 734 nm. Nakon dodatka alikvota određenog razrjeđenja (zbog linearne ovisnosti apsorbancije i koncentracije, slobodni 1:1, ukupni 1:3 s PBS-om, v/v) ekstrakta priređenoj otopini ABTS i snažnog miješanja, apsorbancija je izmjerena nakon šest minuta. Prema apsorbancijama prije i poslije neutralizacije izračunat je postotak inhibicije, a prema baždarnom pravcu standarda Troloxa (konačne koncentracije otopina korištenih za izradu kalibracijskog pravca su bile od 0,1 do 0,5 $\mu\text{mol/ml}$) rezultat je izražen kao ekvivalent Troloxa (mmol/kg uzorka).

3.2.4. Sadržaj mikotoksina

U uzorcima kukuruza određen je sadržaj mikotoksina aflatoksin B1, okratoksin A, zearalenon, DON, fumonizin i T-2 toksin. Analiza je provedena u Laboratoriju za analitičku kemiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu. Sadržaj svih mikotoksina određen je ELISA metodom upotrebom testnih kitova proizvođača R-Biopharm AG (Darmstadt, Njemačka). Ekstrakcijski i testni postupak proveden je prema uputama proizvođača testnog kita za svaki mikotoksin. Sadržaj mikotoksina određen je upotrebom kalibracijskog pravca sa šest točaka svakog mikotoksina, a izražen je u $\mu\text{g/kg}$.

3.3. Statistička obrada podataka

Sadržaj fenola u pojedinim frakcijama, njihova antioksidacijska aktivnost, te sadržaj mikotoksina obrađeni su kombiniranom analizom varijance pri čemu su hibrid i lokacija bili fiksni efekti a repeticije slučajni efekti. Povezanost sadržaja fenola u pojedinim frakcijama i njihove antioksidacijske

aktivnosti sa sadržajem mikotoksina istraživanih hibrida kukuruza ispitana je upotrebom Pearsonovog koeficijenta korelacije. Statistička obrada podataka provedena je PROC GLM i PROC CORR procedurama statističkog paketa SAS 9.3 (Statistical Analysis System, 2011). Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI

U uzorcima pet hibrida kukuruza proizvedenih na dvije lokacije, Krapje i Sičice, određeni su sadržaji fenolnih spojeva u tri frakcije, slobodni vezani i ukupni, te njihova antioksidacijska aktivnost TEAC metodom. Ove vrijednosti određivane su za pet repeticija svakog hibrida s određene lokacije, a rezultat je prikazan kao srednja vrijednost. U istih uzorcima određeni su i sadržaji šest mikotoksina: aflatoksin B1, fumonizin, okratoksin A, zearalenon, deoksinivalenol (DON) i T-2 toksin.

Kombiniranom analizom varijance ispitan je utjecaj hibrida i lokacije na sadržaj fenola u pojedinim frakcijama i pripadajućim TEAC vrijednostima, te na sadržaj mikotoksina (tablica 2). Hibrid je imao značajan utjecaj ($P < 0,01$) na sve frakcije fenola i njihove antioksidacijske aktivnosti, dok lokacija nije značajno utjecala jedino na TEAC vrijednost frakcije ukupnih fenola. Kod mikotoksina nije utvrđen utjecaj hibrida, dok je značajan utjecaj lokacije utvrđen samo na sadržaj fumonizina i DON-a

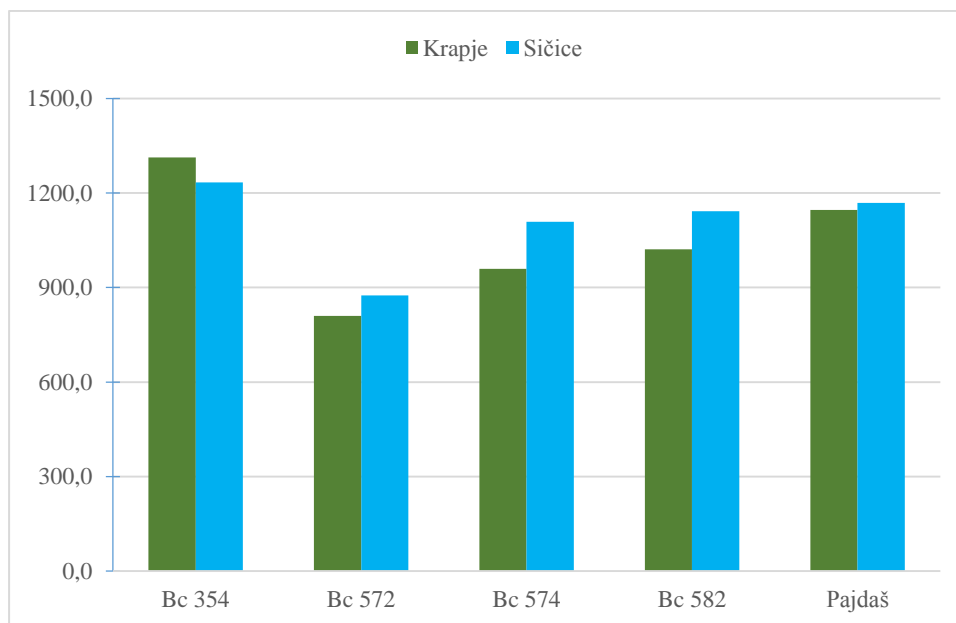
Tablica 2: Rezultati kombinirane analize varijance za sadržaj fenola u frakcijama, njihove antioksidacijske aktivnosti određene TEAC metodom te sadržaj mikotoksina

Svojstvo:	Hibrid			Lokacija			Lokacija×hibrid		
	df	F	Pr > F	df	F	Pr > F	df	F	Pr > F
Slobodni fenoli	4	385,26	***	1	59,47	***	4	30,90	***
Vezani fenoli	4	141,10	***	1	28,50	***	4	59,20	***
Ukupni fenoli	4	401,75	***	1	29,40	***	4	84,97	***
TEAC slobodni	4	103,12	***	1	64,58	***	4	17,24	***
TEAC vezani	4	91,99	***	1	11,39	***	4	11,58	***
TEAC ukupni	4	143,32	***	1	0,13	0,72	4	9,70	***
Aflatoksin	4	1,23	0,31	1	1,40	0,24	4	1,23	0,31
Fumonizin	4	1,01	0,41	1	5,28	**	4	0,95	0,45
Zearalenon	4	0,92	0,46	1	0,66	0,42	4	1,11	0,37
DON	4	1,12	0,36	1	10,33	***	4	0,63	0,65
T-2 toksin	4	0,90	0,47	1	0,04	0,84	4	1,82	0,14
Okratoksin	4	-	-	1	-	-	4	-	-

Značajno za navedenu P vrijednost: * $P < 0,1$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$.

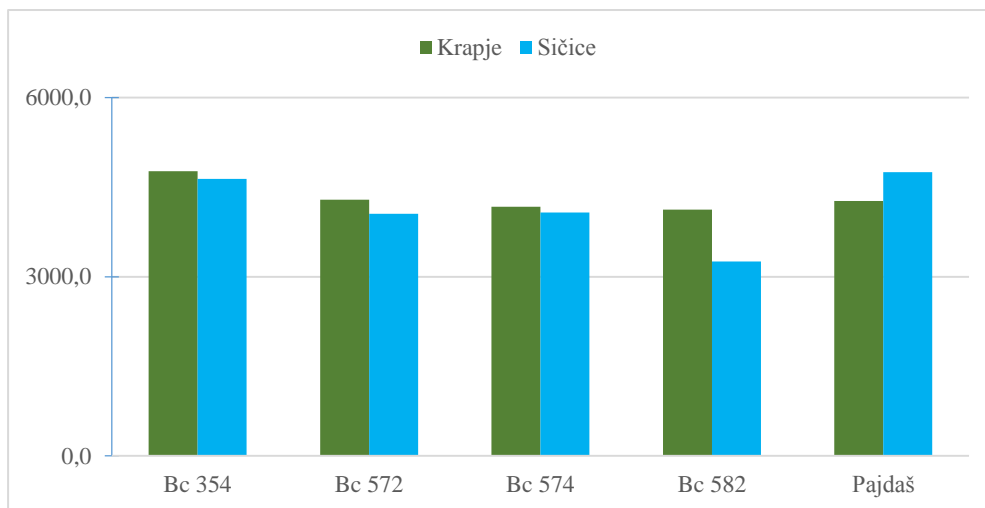
Sadržaj fenola u slobodnom (topljivom) obliku prikazan je na slici 1. Najveći sadržaj na obje lokacije imao hibrid Bc 354 (1273,0 μg galske kiseline/g), dok je hibrid Bc 572 imao najmanji sadržaj

(842,6 μg galske kiseline/g). Zrno istraživanih hibrida proizvedeno na lokaciji Sičice u prosjeku je imalo viši sadržaj slobodnih fenola u usporedbi sa zrnom proizvedenom na lokaciji Krapje (1105,8 prema 1049,8 μg galske kiseline/g) što je u skladu s utvrđenim utjecajem lokacije (tablica 2). Hibrid Bc 354 je imao viši sadržaj slobodnih fenola na lokaciji Krapje, dok su svi ostali hibridi (Bc 572, Bc 572, Bc 582 i Pajdaš) imali viši sadržaj na lokaciji Sičice, što je u skladu s utvrđenom interakcijom hibrid \times lokacija.



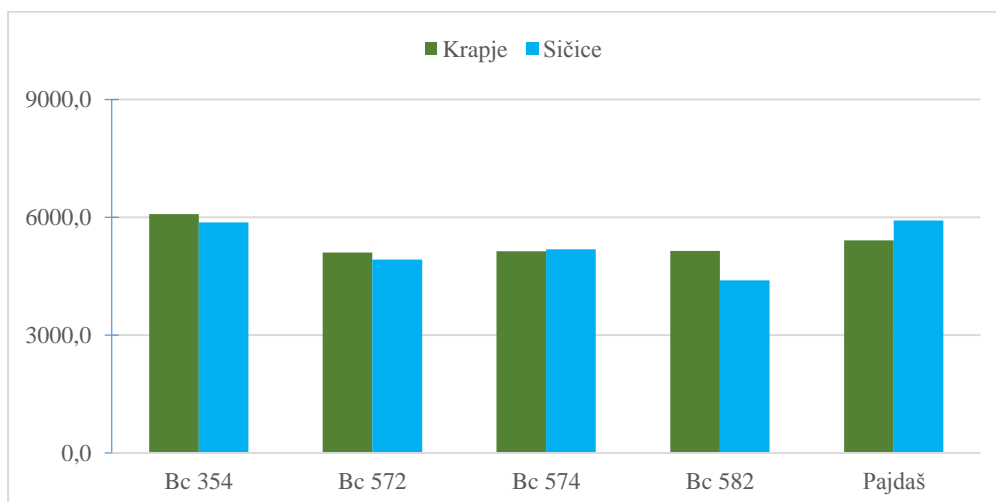
Slika 1: Sadržaj slobodnih fenola (μg galske kiseline/g) pojedinih frakcija u zrnu kukuruza pet hibrida proizvedenih na dvije lokacije

Slično s prikazanim rezultatima sadržaja slobodnih fenola, hibrid Bc 354 imao je i najveći sadržaj vezanih fenola (4702,0 μg galske kiseline/g; slika 2). Najmanju vrijednost istih dao je hibrid Bc 582 (3689,8 μg galske kiseline/g), uz najveće odstupanje od prosječnog sadržaja vezanih fenola istraživanih hibrida kukuruza. Vrijednosti sadržaja vezanih fenola u prosjeku su veće u zrnu kukuruza proizvedenom na lokaciji Krapje u usporedbi s lokacijom Sičice (4324,4 prema 4153,9 μg galske kiseline/g), što je u skladu s utjecajem lokacije na sadržaj ove frakcije fenola. Suprotno ostalim istraživanim hibridima koji su imali veći sadržaj vezanih fenola u zrnu proizvedenom na lokaciji Krapje, hibrid Pajdaš je imao veći sadržaj ove frakcije u zrnu kukuruza proizvedenom na lokaciji Sičice, što je u skladu s utvrđenom interakcijom hibrid \times lokacija. Ova frakcija fenola činila je u prosjeku 80% ukupnih fenola zrna istraživanih hibrida kukuruza.



Slika 2: Sadržaj vezanih fenola (μg galske kiseline/g) pojedinih frakcija u zrnju kukuruza pet hibrida proizvedenih na dvije lokacije

Sadržaj ukupnih fenola izražen je kao zbroj sadržaja fenola u slobodnom i vezanom obliku (slika 3). U skladu s rezultatima sadržaja slobodnih i vezanih fenola, hibrid Bc 354 je imao i najviši sadržaj ukupnih fenola ($5975,0 \mu\text{g}$ galske kiseline/g). Također, hibrid najmanjeg sadržaja vezanih fenola, Bc 582, imao je i najniži sadržaj ukupnih fenola ($4771,8 \mu\text{g}$ galske kiseline/g). Viši sadržaj ukupnih fenola ostvarili su hibridi proizvedeni na lokaciji Krapje, u prosjeku $5374,2 \mu\text{g}$ galske kiseline/g, nasuprot $5259,7 \mu\text{g}$ galske kiseline/g u zrnju hibrida proizvedenim na lokaciji Sičice. Ponavljajući odnos istog hibrida prema lokaciji proizvodnje kao i kod sadržaja fenola u vezanom obliku, jedino je hibrid Pajdaš imao viši udio ukupnih fenola u zrnju kukuruza proizvedenom na lokaciji Sičice. Ovo opažanje u skladu je s utvrđenom interakcijom hibrid \times lokacija za sadržaj ukupnih fenola.



Slika 3: Sadržaj ukupnih fenola (μg galske kiseline/g) pojedinih frakcija u zrnju kukuruza pet hibrida proizvedenih na dvije lokacije

U frakcijama fenola određena je antioksidacijska aktivnost TEAC metodom (tablica 3). Slično sadržaju ukupnih fenola u istraživanim hibridima, najmanju ukupnu antioksidacijsku aktivnost pokazao je hibrid Bc 582 (74,9 mmol Troloxa/kg), dok je najveću ukupnu TEAC antioksidacijsku vrijednost pokazao hibrid Bc 354 (92,2 mmol Troloxa/kg). Zrno hibrida proizvedeno na obje lokacije imalo je u prosjeku sličnu ukupnu antioksidacijsku aktivnost (83,1 u Krapje prema 82,9 mmol Troloxa/kg u Sičicama), što je u skladu s neutvrđenim utjecajem lokacije. Antioksidacijska aktivnost ukupnih fenola hibrida Bc 572, Bc 574 i Bc 582 bila je manja u zrnu proizvedenom na lokaciji Sičice, dok je kod hibrida Bc 354 i Pajdaš bila podjednaka odnosno veća na lokaciji Krapje. Ovo opažanje je u skladu s utvrđenom interakcijom hibrid×lokacija.

Vrijednosti TEAC slobodnih fenola se slažu s već prikazanim vrijednostima sadržaja slobodnih fenola, a kreću se od 12,6 (Bc 572) do 19,1 mmol Troloxa/kg (Bc 354). Gledano prema prosjeku lokacije, višu vrijednost ostvarili su hibridi proizvedeni na lokaciji Sičice (16,6 mmol Troloxa/kg) u usporedbi s lokacijom Krapje (14,9 mmol Troloxa/kg). Od istraživanih hibrida, jedino je Bc 354 imao viši sadržaj TEAC vrijednosti frakcije slobodnih fenola na lokaciji Krapje, dok su ostali hibridi (Bc 572, Bc 574, Bc 582 i Pajdaš) imali višu TEAC vrijednost na lokaciji Sičice, u skladu s utvrđenom interakcijom hibrid×lokacija.

Hibridi Pajdaš i Bc 354 imali su istu TEAC vrijednost vezanih fenola (73,2 mmol Troloxa/kg), dok je hibrid s najmanjom vrijednosti bio Bc 582 (60,1 mmol Troloxa/kg). Obje lokacije u prosjeku su dale sličnu vrijednost TEAC vezanih fenola (Krapje 68,2 mmol Troloxa/kg, Sičice 66,3 mmol Troloxa/kg), uz utvrđen utjecaj lokacije. Hibridi Bc 572, Bc 574 i Bc 582 imali su manju antioksidacijsku aktivnost ukupnih fenola na lokaciji Sičice, dok je ona, u skladu s utvrđenom interakcijom hibrid×lokacija, kod hibrida Bc 354 i Pajdaš na lokaciji Krapje bila gotovo ista i veća.

Tablica 3: Antioksidacijska vrijednost (mmol Troloxa/kg) pojedinih frakcija u zrnu kukurza pet hibrida proizvedenih na dvije lokacije

Hibrid	Lokacija	Slobodni	Vezani	Ukupni
Bc 354	Krapje	19,2	73,1	92,3
Bc 354	Sičice	18,9	73,3	92,2
Bc 572	Krapje	10,4	68,7	79,0
Bc 572	Sičice	14,8	66,2	81,1
Bc 574	Krapje	14,0	66,4	80,3
Bc 574	Sičice	16,8	58,4	75,2
Bc 582	Krapje	14,7	61,6	76,3
Bc 582	Sičice	14,9	58,5	73,4
Pajdaš	Krapje	16,2	71,4	87,6
Pajdaš	Sičice	17,6	75,1	92,6

U tablici 4 prikazane su vrijednosti detektiranih mikotoksina u zrnu istraživanih hibrida kukuruza. Najveći sadržaji aflatoksina B1 u zrnu uočen je kod hibrida Bc 354 (191,0 µg/kg), te znatno manja kod Pajdaša (10,6 µg/kg). Ostale vrijednosti sadržaja aflatoksina istraživanih hibrida bile sustavno niske (u prosjeku 1,3 µg/kg). Viši sadržaj aflatoksina je utvrđen je na lokaciji Sičice (80,9 µg/kg) u odnosu na lokaciju Krapje (1,0 µg/kg) iako nije utvrđen utjecaj lokacije na ovaj mikotoksin. Značajan utjecaj lokacije utvrđen je za fumonizin, pri čemu je sadržaj ovog mikotoksina u zrnu hibrida proizvedenom na lokaciji Sičice bio desetak puta viši od istog na lokaciji Krapje (1606,1 naspram 149,8 µg/kg).

Okratoksina A sustavno je bio manji od razine detekcije, a slično je nađeno i za zearalenon, uz rijetka odstupanja u zrna hibrida Bc 354 proizvedenom na lokaciji Sičice (4,9 µg/kg), te hibrida Bc 582 proizvedenom na lokaciji Krapje (88,6 µg/kg). Mikotoksini DON, zearalenon i T-2 toksin pokazali su veće vrijednosti u zrnu proizvedenom na lokaciji Krapje, redom 134,3, 88,6 i 21,2 µg/kg naspram 111,8, 4,9 i 16,9 µg/kg u zrnu proizvedenom na lokaciji Sičice, iako je značajan utjecaj lokacije utvrđen samo za DON. Interakcija hibrid×lokacija nije utvrđena niti za jedan mikotoksin.

Tablica 4: Sadržaj mikotoksina (µg/kg) u zrnu kukuruza pet hibrida proizvedenih na dvije lokacije

Hibrid	Lokacija	Aflatoksin B1	Okratoksin A	Zearalenon	DON	Fumonizin	T-2
Bc 354	Krapje	1,44	<0,05	<0,05	101,10	<25,00	3,48
Bc 354	Sičice	380,56	<0,05	4,89	152,25	634,67	54,06
Bc 572	Krapje	1,05	<0,05	<0,05	98,40	186,00	8,55
Bc 572	Sičice	1,32	<0,05	<0,05	<3,70	3947,67	5,15
Bc 574	Krapje	1,10	<0,05	<0,05	102,60	<25,00	67,60
Bc 574	Sičice	1,48	<0,05	<0,05	114,00	423,67	9,43
Bc 582	Krapje	1,32	<0,05	88,60	279,00	113,50	19,34
Bc 582	Sičice	1,32	<0,05	<0,05	69,00	2418,00	7,45
Pajdaš	Krapje	1,20	<0,05	<0,05	90,60	<25,00	7,10
Pajdaš	Sičice	19,98	<0,05	<0,05	<3,70	606,25	8,50

Povezanost određenih svojstava zrna istraživanih hibrida kukuruza proizvedenih na dvije lokacije – sadržaj fenola i njihove antioksidacijske aktivnosti pojedinih frakcija, te sadržaj mikotoksina – ispitana je upotrebom Pearsonovog koeficijenta korelacije (tablica 5). Provedena analiza na prikazanim rezultatima utvrdila je visoku pozitivnu korelaciju između pojedine frakcije fenola i

pripadajuće antioksidacijske aktivnosti utvrđene TEAC metodom. Od svih određenih mikotoksina, jedino je za sadržaj aflatoksina i fumonizina utvrđena značajnost korelacije sa sadržajem fenola u pojedinim frakcijama i pripadajućim antioksidacijskim aktivnostima. Pri tome je aflatoksin pokazao pozitivnu korelaciju s TEAC vrijednostima slobodnih i ukupnih fenola, dok je fumonizin pokazao negativnu korelaciju s sadržajem vezanih i ukupnih fenola.

Tablica 5: Koeficijenti korelacije između sadržaja fenola, njihove antioksidacijske aktivnosti i sadržaja mikotoksina zrna istraživanih hibrida kukuruza

	Vezani fenoli	Ukupni fenoli	TEAC slobodni	TEAC vezani	TEAC ukupni	Aflatoksin	Fumonizin
Slobodni fenoli	0,31**	0,57***	0,87***	0,30**	0,55***	0,17	-0,08
Vezani fenoli		0,96***	0,44***	0,82***	0,83***	0,16	-0,32**
Ukupni fenoli			0,64***	0,8***	0,89***	0,19	-0,30**
TEAC slobodni				0,34**	0,63***	0,32**	0,04
TEAC vezani					0,95***	0,22	-0,19
TEAC ukupni						0,29**	-0,14

*Značajno za navedenu P vrijednost: * P < 0,1; ** P < 0,05; *** P < 0,01*

5. RASPRAVA

Fenolni spojevi zrna kukuruza su najvećim dijelom fenolne kiseline koje mogu biti u slobodnom (topljivom) i vezanom (netopljivom) obliku (Naczki i Shahidi, 2006). Frakcija vezanih fenola je dominantna pa tako u istraživanim hibridima kukuruza s obje lokacije proizvodnje vezani fenoli čine oko 80% ukupnih fenola. Ovo opažanje potvrđeno je i s visokom pozitivnom korelacijom sadržaja vezanih i ukupnih fenola istraživanih hibrida kukuruza. U ovom istraživanju određeni udio frakcije vezanih fenola sličan je vrijednosti (86%) koju su dobili i Adom i Liu (2002), također u hibridu kukuruza žutog zrna. Sadržaj fenolnih spojeva u zrnju žitarica određen je genotipom (Adom i sur., 2003), što je u skladu s utvrđenim utjecajem hibrida na sadržaj fenola u sve tri frakcije (tablica 2). Hibrid Bc 354 se na obje lokacije istaknuo kao hibrid s najvišim udjelom slobodnih i vezanih, a prema tome i ukupnih fenola. Približnu vrijednost sadržaja ukupnih fenola imao je još hibrid Pajdaš, posebice u zrnju proizvedenom na lokaciji Sičice, dok su ostali istraživani hibridi (Bc 572, Bc 574 i Bc 582) imali za 10% i više niži sadržaj ukupnih fenola.

Sadržaj fenola istog genotipa može varirati ovisno o vremenskim uvjetima ili izloženosti stresu tijekom rasta biljke (Naczki i Shahidi, 2006), što je u skladu s utvrđenim značajnim utjecajem lokacije na sadržaj svih frakcija fenola istraživanih hibrida kukuruza. Dvije lokacije proizvodnje zrna kukuruza izabrane su zbog različitog utjecaja tijekom razdoblja suše. U razdoblju od lipnja do kolovoza obje lokacije su bile toplije za 1- 2 °C od prosjeka. S druge strane, količina oborina je u lipnju na obje lokacije bila za 30% viša od prosjeka, dok je u srpnju i kolovozu bila niža (u kolovozu čak za više od 85%) od prosjeka. Međutim, lokacija Krapje ima povoljnije uvjete za proizvodnju kukuruza od lokacije Sičice, i to zbog položaja u Lonjskom polju i neposredne blizine rijeke Save. Zbog veće opskrbljenosti tla vodom smanjen je utjecaj suše na ovoj lokaciji u usporedbi s lokacijom Sičice. U skladu s različitim uvjetima tijekom rasta kukuruza, lokacija Sičice u prosijeku je ostvarila viši sadržaj slobodnih te niži sadržaj vezanih i ukupnih fenola istraživanih hibrida kukuruza u usporedbi s lokacijom Krapje. Na kraju, lokacija Sičice imala je povoljnije uvjete za stvaranje mikotoksina, te je uz utjecaj suše i pojava mikotoksina mogla utjecati na sadržaj fenola zrna istraživanih hibrida kukuruza.

Ferulinska kiselina, dominantni fenolni spoj zrna kukuruza (Sosulski i sur., 1982), ima visoku antioksidacijsku aktivnost (Kikuzaki i sur., 2002), te je moguće zbog toga najvećim dijelom zaslužna za antioksidacijsku aktivnost frakcija fenola istraživanih hibrida kukuruza. Za svaku frakciju fenola utvrđena je vrlo visoka pozitivna korelacija između sadržaja i antioksidacijske aktivnosti što upućuje da su fenoli u najvećem dijelu zaslužni za antioksidacijsku aktivnost svake frakcije. U skladu s višim sadržajem fenola, antioksidacijska aktivnost vezane frakcije je bila viša od iste slobodne frakcije fenola. Nadalje, antioksidacijska aktivnost vezanih fenola ostvarila je najviši doprinos ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti fenola – u prosijeku 81% ukupne TEAC vrijednosti. U provedenom

istraživanju utvrđen je utjecaj lokacije na antioksidacijsku aktivnost frakcije slobodnih i vezanih fenola, dok je frakcija ukupnih fenola imala sličan sadržaj na obje lokacije (tablice 2 i 3). Pri tome je frakcija slobodnih fenola istraživanih hibrida ostvarila višu antioksidacijsku aktivnost na lokaciji Sičice, a frakcija vezanih fenola na lokaciji Krapje. Utjecaj lokacije na antioksidacijsku aktivnost slobodnih fenola je suprotan utjecaju lokacije na sadržaj fenola u slobodnom obliku. Ovo povećanje antioksidacijske aktivnosti unatoč nižem sadržaju slobodnih fenola upućuje da su i drugi spojevi antioksidacijskog djelovanja ekstrahirali zajedno s fenolima i na taj način povećali antioksidacijsku aktivnost slobodnih fenola.

Suprotno od ujednačenog sadržaja fenola i njihove antioksidacijske vrijednosti pojedinih frakcija, unutar istog hibrida nađene su velike varijacije u sadržaju svih mikotoksina, osim okratoksina koji je u svim uzorcima bio u sadržaju ispod granica detekcije. Potrebno je naglasiti da se varijabilnost proteže unutar samih repeticija pojedinih hibrida, odnosno, konačna prosječna vrijednost uvelike je određena ekstremima unutar samih repeticija. Ovo je povezano s teorijom razmnožavanja samih gljivica na polju. Naime, gljivice, kao i njihovi mikotoksini, uglavnom nisu ravnomjerno raspoređeni na zrnu kukuruza, u polju ili skladištu, već se u velikim količinama nalaze u određenim točkama (Monbaliu i sur., 2012). Upravo ova nehomogena raspodjela plijesni i mikotoksina na zrnu uzrok je varijabilnosti sadržaja pojedinačnih mikotoksina unutar repeticija istog hibrida.

Na obje lokacije proizvodnje zrna kukuruza vremenski uvjeti su pogodovali stvaranju mikotoksina. Velika količina padalina na obje lokacije tijekom svibnja i lipnja, uz porast temperature u lipnju, bili su optimalni uvjeti za stvaranje plijesni čime je omogućeno stvaranje mikotoksina tijekom razdoblja suše, a u skladu je s rezultatima istraživanja koje su proveli Schmidt-Heydt i sur. (2008). Unatoč varijabilnosti rezultata, u ovom istraživanju nije utvrđen utjecaj hibrida na sadržaj mikotoksina, dok je lokacija značajno djelovala na mikotoksine *Fusarium* plijesni, fumonizin i DON. (tablica 2). Manje vrijednosti sadržaja fumonizina u hibridima proizvedenim na lokaciji Krapje mogu se tumačiti njezinim položajem. Mikroklima lokacije Krapje, zbog već navedenog položaja u Lonjskom polju, moguće je smanjila negativan utjecaj suše, što je rezultiralo pojavom fumonizina u manjem sadržaju u usporedbi s lokacijom Sičice. Suprotno tome, veći sadržaj mikotoksina DON opažen je na zrnu hibrida kukuruza proizvedenog na lokaciji Krapje. Ovo je vjerojatno posljedica pojava različitih sojeva pljesni koji ih proizvode (Munkvold i sur., 2003) na lokacijama proizvodnje kukuruza.

Između mikotoksina detektiranih u zrnu istraživanih hibrida jedino je fumonizina ostvario značajnu korelaciju sa fenolima. Ovo opažanje potvrđuje dobivene rezultate opisane u Samapundo i sur. (2007); inhibicija mikotoksina i pljesni koja ga proizvodi ovisi o vrsti fenolnog spoja, ali i njegovoj količini i vrsti same pljesni. Utvrđena negativna korelacija između sadržaja vezanih fenola i fumonizina upućuje da su fenoli bili jedni od spojeva kojima se biljka branila od ovog štetnog utjecaja. Ovo opažanje potvrđuju i istraživanja koja opisuju ulogu fenola u zaštiti biljke od mikotoksina, prekidajući metaboličke procese pljesni pri proizvodnji istog (Bakan i sur., 2003), te inhibirajući rast

same pljesni (Samapundo i sur., 2009). Ova inhibicija moguća je posljedica djelovanja hidrolaza koje proizvode *Fusarium* pljesni, a koje otpuštaju slobodne oblike vezane ferulinske kiseline. Ovi slobodni oblici ferulinskih kiselina smanjuju proizvodnju *Fusarium* mikotoksina (Bakan i sur., 2003), i to čak za 90% u slučaju fumonizina u idealnim *in vitro* uvjetima (Beekrum i sur., 2003). Nadalje, iako su Bakan i sur. (2003) ostvarili inhibiciju 15ADON mikotoksina *in vitro*, isti učinak na DON u provedenom istraživanju nije uočen.

Iako je jedini efektivni mehanizam obrane fenolima bio u slučaju mikotoksina fumonizin, treba imati na umu da se biljka od mikotoksina brani i drugim zaštitnim mehanizmima. Na to upućuje značajna pozitivna korelacija između sadržaja aflatoksina i antioksidacijske aktivnosti slobodnih fenola utvrđena u ovom istraživanju. Moguće je da biljka kao odgovor na zarazu mikotoksinima proizvodi i druge spojeve koji su ekstrahirani zajedno sa slobodnim fenolima a ujedno pojačavaju antioksidacijsku djelovanje frakcije slobodnih fenola. Međutim, ovim istraživanjem nije predviđeno određivanje o kojim spojevima se radi i koji je njihov mehanizam djelovanja.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja na zrnu hibrida kukuruza proizvedenog na dvije lokacije tijekom sušne 2012. godine doneseni su sljedeći zaključci:

1. Sadržaj fenola u slobodnom i vezanom obliku, kao i njihov zbroj, ovisi o genotipu i lokaciji proizvodnje zrna kukuruza. Frakcija vezanih fenola istraživanih hibrida činila je 80% ukupnih fenola.
2. U skladu s porastom sadržaja fenola, antioksidacijska aktivnost frakcija fenola rasla je u nizu slobodni, vezani, ukupni. Hibrid je značajno djelovao na antioksidacijsku aktivnost svih frakcija fenola, dok je lokacija djelovala na frakcije slobodnih i vezanih fenola.
3. Hibrid nije imao utjecaj na sadržaj mikotoksina, dok je lokacija značajno djelovala samo na sadržaj fumonizina i deoksinivalenola (DON-a).
4. Sadržaj fumonizina je bio niži u zrnu proizvedenom na povoljnijoj lokaciji (Krapje), pri čemu su istraživani hibridi na istoj lokaciji imali niži sadržaj slobodnih i viši sadržaj vezanih fenola.
5. Niži sadržaj vezanih fenola u zrnu hibrida kukuruza proizvedenog na nepovoljnijoj lokaciji (Sićice) praćen je porastom sadržaja fenola u slobodnom obliku potrebnom za zaštitu biljke.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se Zavodu za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta u Zagrebu koji mi je omogućio provođenje svih potrebnih analiza za istraživanje, kao i pomoćnom osoblju navedenog zavoda na svojoj pomoći pri provođenju istih, te Veterinarskom institutu gdje su provedene analize mikotoksina.

Posebne zahvale mentorici dr. sc. Kristini Kljak na podršci i značajnoj pomoći pri provođenju analiza i izradi rada.

8. LITERATURA

1. Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6182-6187.
2. Adom, K. K., Sorrells, M. E., Liu, R. H. (2003). Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7825-7834.
3. Bakan, B., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogène, B. J., Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2826-2831.
4. Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, T., Odhav, B. (2003). Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1. *Food Additives & Contaminants*, 20: 490-493.
5. Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497–516.
6. Boutigny, A. L., Richard-Forget, F., Barreau, C. (2008). Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium trichothecenes*. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 411-423.
7. D'mello, J. P. F., Placinta, C. M., Macdonald, A. M. C. (1999). *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80: 183-205.
8. Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo (DZNM; 2001): *Stočna hrana – Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari*, Zagreb, Hrvatska.
9. FAO (2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations, <<http://faostat.fao.org/>>. Pristupljeno 24. travnja 2014.
10. Hua, S. S., Grosjean, O. K., Baker, J. L. (1999). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 289-291.
11. Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2161-2168.
12. McKeehen, J. D., Busch, R. H., Fulcher, R. G. (1999). Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1476-1482.
13. Monbaliu, S., Peteghem, C.V., Saeger, S.D. (2012). Detection and determination of natural toxins. U knjizi: *Animal feed contamination: Effects on livestock and food safety* (J. Fink-Gremmels, ur.), Woodhead publishing, Philadelphia, str. 286-325

14. Munkvold, G. P., White, P. J., Johnson, L. A. (2003). Mycotoxins in corn-occurrence, impact, and management. U knjizi *Corn: chemistry and technology*, (P. J. White i L.A. Johnson, ur.), str. 811-881.
15. Naczk, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
16. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
17. Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., Devlieghere, F. (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology*, 24: 465-473.
18. Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 142-149.
19. Sinovec, Z. J., Resanović, R.D. (2005). Mikotoksini u hrani životinje - rizik po zdravlje ljudi. *Tehnologija mesa*, 46: 39-44.
20. Sosulski, F., Krygier, K., Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 337-340.
21. Statistical Analysis System (SAS), OnlineDoc® Software Release 9.3., SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD (2011).
22. Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3630-3634.
23. Vitaglione, P., Napolitano, A., Fogliano, V. (2008). Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*, 19: 451-463.
24. Yiannikouris, A., Jouany, J. P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51: 81-100.
25. Zieliński, H., Kozłowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2008-2016.

SAŽETAK

Igor Bemko

Utjecaj hibrida i suše na povezanost sadržaja i antioksidacijske aktivnosti fenola s kontaminacijom mikotoksinima zrna kukuruza

U današnje vrijeme fenolni spojevi svoju popularnost zahvaljuju povoljnom antioksidacijskom utjecaju na zdravlje ljudi i životinja. Međutim, primarna uloga fenola je zaštita biljaka od štetnih utjecaja kao što su mikotoksini koji ozbiljno narušavaju zdravlje ljudi i životinja te uzrokuju velike gubitke u poljoprivredi. Cilj ovoga rada bio je utvrditi razlike između hibrida kukuruza u sadržaju fenola i njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti te procijeniti utjecaj fenola na pojavu mikotoksina tijekom rasta biljke. Istraživanje je provedeno na zrnu pet hibrida (Bc 354, Bc 572, Bc 574, Bc 582 i Pajdaš) proizvedenih u povoljnijim (Krapje - središnja Hrvatska) i nepovoljnim (Sičice - istočna Hrvatska) uvjetima tijekom sušne 2012. godine. Fenolni spojevi u uzorcima kukuruza ekstrahirani su 50 %-tnim metanolom sa i bez kisele hidrolize kako bi se odredio sadržaj ukupnih, vezanih i slobodnih fenola. Sadržaj fenola u frakcijama određen je kolorimetrijski korištenjem Folin-Ciocalteu reagensa, a antioksidacijska aktivnost TEAC metodom. Hibrid i lokacija značajno su utjecali na sadržaj i antioksidacijsku aktivnost svih frakcija fenola. Vezani fenoli su najvećim dijelom doprinijeli ukupnom sadržaju fenola i antioksidacijske aktivnosti. Nepovoljni vremenski uvjeti na obje lokacije omogućili su pojavu mikotoksina: aflatoksin, fumonizin, zearlenon, DON (deoksinivalenol) i T-2 toksina na obje lokacije proizvodnje zrna. Međutim, hibridi proizvedeni na lokaciji Krapje sadržavali su manje svih mikotoksina, osim DON-a, vjerojatno zbog povoljnije opskrbljenosti vodom tla Lonjskog polja. Od svih mikotoksina, jedino je fumonizin ostvario značajnu negativnu korelaciju s fenolima pri čemu se sadržaj fenola vezane frakcije smanjivao zbog otpuštanja u slobodni oblik. Zaključno, utvrđeno je da hibridi proizvedeni na lokaciji s višim sadržajem mikotoksina sadrže više slobodnih fenola i imaju višu antioksidacijsku aktivnost koja štiti kontaminirani kukuruz.

Ključne riječi: Fenoli, mikotoksini, antioksidansi, TEAC

SUMMARY

Igor Bemko

Influence of hybrid and drought on correlation between content and antioxidant activity of phenolics and contamination of mycotoxins in corn grain

Nowadays, phenolic compounds are popular due the beneficial impact on human and animal health. However, the primary role of plant phenolics is protection from harmful influences such as mycotoxins, which could seriously impair the health of humans and animals and cause major losses in agriculture. The aim of this study was to determine the differences of phenolic content between maize hybrids and their antioxidant activity and to assess the influence of phenolics on the occurrence of mycotoxins during plant growth. The study was conducted on five grain hybrids (Bc 354, Bc 572, Bc 574, Bc 582 and Pajdaš) produced in favorable (Krapje - central Croatia) and unfavorable (Sičice eastern Croatia) conditions during drought in 2012. Phenolic compounds in corn samples were extracted with 50% methanol with and without acid hydrolysis to determine the content of total, free and bound phenolics. Content of phenolics in the fractions was determined using a colorimetric Folin-Ciocalteu reagent while antioxidant activity was determined using TEAC method. Hybrid and location significantly influenced the content and antioxidant activity of the phenolic fractions. Bound phenolics largely contributed to the total phenolic content and antioxidant activity. Weather conditions have enabled the development of mycotoxins aflatoxin, fumonisin, zearalenone, DON (deoxynivalenol) and T-2 toxin at both locations of grain production. However, hybrids produced on location Krapje contained smaller amounts of all mycotoxins, except DON, probably due to favorable soil moisture of the nature park „Lonjsko polje“. From all mycotoxins, only fumonisin achieved a significant correlation with phenols, given that bound fraction of phenolic compounds decreased with release to free forms needed for protection from mycotoxins. In conclusion, it was found that hybrid grown at location with a higher content of mycotoxins contained more free phenolics and have higher antioxidant activity that protects the contaminated corn.

Keywords: Phenolics, mycotoxins, antioxidants, TEAC