

Pokroky vo výskume nových biocídnych látok a regulačných mechanizmov mikrobiálnych buniek

J. ŠUBÍK

Zvyšovanie sebestačnosti vo výrobe potravín ako jedna z nosných úloh rozvoja poľnohospodársko-potravinárskeho komplexu vytýčená posledným zjazdom našej strany, úzko súvisí so zvýšenou výrobou potravinárskeho priemyslu. V tejto súvislosti, v intenciách záverov nedávnych plén ÚV KSČ, zvýšenú pozornosť treba venovať kvalite všetkej práce, nevynímajúc kvalitu a trvanlivosť potravinárskych výrobkov. Významnými faktormi ovplyvňujúcimi hygienickú nezávadnosť a kvalitu potravín sú hygienické podmienky výroby.

S cieľom zvýšiť úroveň hygieny a sanitácie v potravinárskom priemysle riešila sa na Výskumnom ústave potravinárskom v Bratislave v r. 1976—1980 čiastková úloha štátneho plánu technického rozvoja P 11-529-264-02 „Výskum regulácie rastu a metabolickej aktivity mikroorganizmov, znehodnocujúcich potravinárske suroviny a výrobky“. Súhrn výsledkov jej prvej vecnej etapy „Výskum biochemického účinku antimikrobiálnych látok“, riešenej v rokoch 1976—1977, sme uverejnili v *Bulletine VÚP* pred dvoma rokmi (1). Tento príspevok je venovaný prehľadu výsledkov riešenia druhej vecnej etapy „Výskum regulácie rastu mikrobiálnych buniek a spôsoby aplikácie ochranných látok“, ktoré v plnom znení uvádza priebežná správa z roku 1979 (2) a záverečná správa z roku 1980 (3).

Riešenia predmetnej čiastkovej úlohy priebežne vyústili do dvoch realizačných výstupov. Koncom roku 1978 odovzdal sa plánovaný nehmotný realizačný výstup „Podklady pre zavedenie nových postupov inaktivácie mikroorganizmov, najmä v mliekárenskom a mäsovom priemysle, za účelom zvýšenia hygieny“, ku ktorému zaujali kladné stanoviská tak VÚH mliekárenského a mäsového priemyslu, ako aj výrobný podnik Slovakofarma n. p. Hlohovec, zaraďujúci navrhnuté biocídne látky do perspektívneho plánu výroby dezinfekčných prostriedkov (4). Koncom roku 1979 odovzdal sa aj druhý nadplánovaný, realizačný výstup „Spôsob inhibície rastu kvasiniek a plesní na povrchu surovín trvanlivých mäsových výrobkov“ (5), ktorý sa týka antifungálnej ochrany mäsových výrobkov v priebehu technologického procesu, a ktorý sa v súčasnosti overuje na Vývojovom pracovisku mäsového priemyslu v Rači.

Viacere výsledky riešenia druhej vecnej etapy čiastkovej úlohy, ako aj

predmetných realizačných výstupov boli už v detailoch uverejnené v periodickej literatúre (6—13), resp. sa pripravujú na publikovanie v príslušných vedeckých a odborných časopisoch. Preto obmedzením sa v tomto príspevku iba na informatívny súhrn získaných poznatkov, ktoré možno po formálnej stránke rozdeliť do piatich vecných celkov.

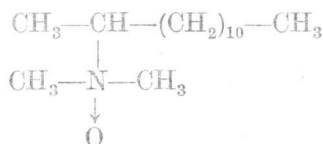
1. Amínoksidy — ako nové biologicky aktívne látky priemyselného významu

V súvislosti s návrhom na priemyselné využitie amínoksidov, ako novej skupiny biologicky aktívnych látok v dezinfekčnej praxi, podal sa prehľad štruktúry, chemickej prípravy, fyzikálnych, chemických a biologických vlastností chemických zlúčenín obsahujúcich N—O väzbu. Amínoksidy sú pripraviteľné alkyláciou hydroxylamínu alebo oxidáciou terciárnych amínov. Ich fyzikálne a chemické vlastnosti sú determinované prítomnosťou silne polarizovanej väzby medzi dusíkom a kyslíkom. Medzi amínoksidmi možno nájsť zlúčeniny s rôznymi antimikróbnyimi, biochemickými a farmakologickými vlastnosťami. V poslednom čase priemyselne významnými sa stali antimikróbne účinné a povrchovo aktívne N-alkylamínoksidy. Diskutuje sa ich antimikróbna aktivita, jej závislosť na štruktúre zlúčeniny, ďalej spôsob účinku, toxicita, biodegradabilita a povrchová aktivita.

V nadväznosti na výskum spôsobu účinku a koreláciu štruktúry s biologickou aktivitou amínoksidov preštudovali sa i biochemické aspekty cytolytickej aktivity celej série uvedených N-alkylamínoksidov. Zistilo sa, že študované antimikróbne aktívne amínoksidy majú výraznú hemolytickú aktivitu. Rýchlosť a rozsah hemolýzy študované s 4-alkylmorfolín-N-oxidmi obsahujúcimi rôzne dlhý uhlíkový reťazec, sa zvyšoval s rastúcou koncentráciou amínoksidu, teplotou a dĺžkou homológneho alkylu. Maximum hemolytickej aktivity sa pozorovalo u amínoksidov s postranným alkylovým reťazcom obsahujúcim 16 atómov uhlíka. Pri rovnakom alkyle (C_{12}) hemolytická aktivita klesala v poradí heterocyklov: perhydroazepín, piperidín, pyrrolidín a morfolín. Tieto výsledky potvrdili názor, podľa ktorého amínoksidmi indukovaná dezorganizácia membránových štruktúr buniek je bezprostrednou príčinou ich antimikróbnej i cytolytickej aktivity.

Na základe získaných poznatkov, berúc do úvahy antimikróbnu aktivitu, spôsob účinku, toxicitu pre cicavce, spôsob chemickej prípravy, povrchovú aktivitu, biologickú degradabilitu, nekoroziivnosť, ako aj rozpustnosť vo vode a nevodných rozpúšťadlách, vybral sa zo série viac ako 20 individuálnych zlúčenín N,N-dimetyl-1-metyldodecylamínoksid ako nová biologicky aktívna látka, ktorá sa navrhla k príprave nových, vysoko účinných sanitálnych prostriedkov, použiteľných i v náročných podmienkach potravinárskeho priemyslu.

N,N-dimetyl-1-metyldodecylamínoksid štruktúry



je biela, kryštalická, hygroskopická zlúčenina s teplotou topenia 91—93 °C, o molekulovej hmotnosti 243,44. V pôvodnom stave, aj v roztokoch (etanol, voda) je zlúčenina stabilná. Je výborne rozpustná vo vode i v polárnych organických rozpúšťadlách. Je kompatibilná s tenzidmi. Má povrchovo aktívne vlastnosti a chová sa ako detergent neiónového typu. Kritická micelárna koncentrácia je 2 mM (0,048 %). Povrchové napätie 0,1 % vodného roztoku je 0,035 N/m.

N,N-dimetyl-1-metyldodecylaminoxid možno pripraviť z odpovedajúceho terciárneho amínu oxidáciou peroxidom vodíka. Východiskový N, N-dimetyl-2-amínotrídekan sa dá pripraviť reduktívnou alkyláciou 2-amínotrídekanu, prípadne sa môže pripraviť priamo reduktívnou amináciou z metylundecylketónu a dimetylaminu.

N,N-dimetyl-1-metyldodecylaminoxid inhibuje rast vegetatívnych buniek prokaryotických i eukaryotických mikroorganizmov. Je vysoko účinný proti baktériám, kvasinkám a vláknitým hubám. Grampozitívne baktérie sú citlivejšie k účinku amínoxidu ako gramnegatívne. Pôsobí i na sporujúce mikroorganizmy. Toxicita amínoxidu je nízka, LD₅₀ pri aplikácii per os je 950 mg/kg. V koncentrácii 0,75 % je ešte nedráždivý. Nie je mutagénny.

N,N-dimetyl-1-metyldodecylaminoxid inaktivoval bunky zmesných kultúr mikroorganizmov odobraných z rôznych prevádzok mäsového i mliekárenského priemyslu. Minimálna biocídna koncentrácia amínoxidu je 0,02 g/100 ml. Optimálne podmienky dezinfekčnej účinnosti ležia v kyslej oblasti pH a pri vyšších teplotách prostredia. Za optimálnych podmienok pri koncentrácii amínoxidu 0,02 g/100 ml a dobe pôsobenia kratšej ako 5 minút, dosiahnutý stupeň inaktívácie mikroorganizmov je vyšší ako 99,999 % mŕtvych buniek. Vysoký stupeň dezinfekčnej účinnosti možno dosiahnuť aj v alkalickom prostredí, resp. pri nižšej teplote vhodným zvýšením koncentrácie amínoxidu, resp. doby jeho pôsobenia.

N,N-dimetyl-1-metyldodecylaminoxid je použiteľný k príprave dezinfekčných prostriedkov, ako aj konzervačných a solubilizačných činidiel najmä v kozmetike. Dezinfekčné látky na báze amínoxidov sú aplikovateľné v potravinárskom priemysle, v zdravotníctve a všade tam, kde sa udržiava hygiena. V potravinárskom priemysle možno dezinfekčné prostriedky použiť najmä v mäsovom, mliekárskom, hydinárskom, konzervárskom a fermentačnom priemysle, rovnako ako v pivovaroch alebo vinárskych závodoch.

N,N-dimetyl-1-metyldodecylaminoxid je využiteľný ako priemyselný biocid vďaka kombinácii vysokej aktivity, nízkej toxicity a vhodných fyzikálno-chemických vlastností: povrchová aktivita, solubilizačné vlastnosti, kompatibilita s tenzidmi a dobrá rozpustnosť vo vode. Záujem o jeho výrobu prejavili Slovakoфарма, n. p., Hlohovec a Lachema, n. p., Brno.

2. Genetická aktivita antimikróbnych látok a spôsoby jej detekcie

K inhibícii nežiadúcej aktivity alebo inaktívácií mikroorganizmov sa s výhodou používajú vhodné antimikróbne prostriedky. Predpokladom ich použiteľnosti je splnenie radu kritérií, z ktorých na poprednom mieste je celková zdravotná nezávadnosť. Pri jej posudzovaní vzhľadom na existujúcu úzku

koreláciu medzi karcinogenicitou a mutagenicitou, doporučuje sa sledovať aj mutagénny vplyv týchto látok na organizmy.

Z tohto dôvodu sa na pracovisku zaviedli metódy detekcie mutagénnej aktivity chemických zlúčenín použitím prokaryotických, ako aj eukaryotických mikrobiálnych systémov. Pomocou bakteriálneho testovacieho systému sa študovala mutagénna aktivita vybraných zlúčenín amínoxidov a karbonyl-kyanidfenylhydrazónov, ku ktorým sa pre porovnanie zaradili aj niektoré antimikróbné látky, bežne používané v potravinárskom priemysle, prípadne ktorých použitie sa pripravuje. Z testovanej série antimikróbných látok sa významná genetická aktivita pozorovala však iba v prípade 3(5-nitro-2-furyl)-akrylátu.

Mutagénna aktivita 3(5-nitro-2-furyl)-akrylátu sa detailnejšie preskúmala na eukaryotických kvasinkových systémoch. Zistilo sa, že 3/5-nitro-2-furyl/akrylát v závislosti na koncentrácii, pH a čase významne indukoval génovú konverziu, reverziu a rekombináciu. V porovnaní s furylfuramidom (AF-2) jeho aktivita bola relatívne nižšia. Zvýšená indukcia respiračne deficitných mutantov sa nepozorovala. Tieto výsledky viedli k záveru, podľa ktorého genetická aktivita 3/5-nitro-2-furyl/akrylátu je nezlučiteľná s nedávno zamýšľaným využitím tejto látky v potravinárskom priemysle.

3. Úloha intramitochondriálneho adenosíntrifosfátu v regulácii rastu a metabolizmu mikrobiálnych buniek

Štúdium štruktúry a funkcie bunkových organel eukaryotických buniek, mitochondrií odhalilo, že tieto membránne štruktúry sa určitým, i keď zatiaľ neobjasneným spôsobom podieľajú na kontrole bunkového delenia. V mechanizme tejto kontroly významnú úlohu zohráva intramitochondriálne ATP. Pri jeho deficícii totiž i napriek dostatku glykolyticky tvoreného ATP sa v rastúcich eukaryotických bunkách mitochondriálne gény prestanú normálne replikovať a ich mitotický rast sa po niekoľkých generáciách zastaví.

S cieľom objasniť úlohu mitochondriálneho ATP v regulácii rastu a metabolizmu mikrobiálnych buniek študoval sa vplyv deficície intramitochondriálneho ATP na stabilitu mitochondriálneho genomu štandardného kmeňa ako aj na rast, prežitie, syntézu makromolekúl a indukčnú syntézu enzýmov u respiračne deficitného mutantu kvasiniek *S. cerevisiae*. Zistilo sa, že v populácii rastúcich buniek kvasiniek deficiencia v intramitochondriálnom ATP má za následok modifikáciu až postupnú stratu geneticky aktívnej mitochondriálnej DNA, čo následne vedie k hromadnej tvorbe cytoplazmatických respiračne deficitných mutantov obsahujúcich rôzne fragmenty mitochondriálneho genomu.

Zatiaľ čo v komplexnom médiu bunky respiračne deficitného mutantu za podmienok nedostatku intramitochondriálneho ATP rástli maximálne 3–4 generácie a potom sa ich rast zastavil i napriek prítomnosti glukózy ako zdroja uhlíka a energie, v minimálnom médiu takéto bunky neboli schopné rásť vôbec. I v komplexnom médiu deficitné bunky rástli však pomalšie a rýchlosť syntézy ich makromolekúl bola charakteristicky znížená. V minimálnom médiu i keď rozmnožovanie bolo zastavené, deficitné bunky boli ešte schopné inkorporovať značné prekursori do bielkovín a nukleových kyselín, čo naznačuje, že ich metabolizmus pri zastavenom raste nemusí byť limitujúci.

Bunky respiračne deficitného mutanta vyrastené za deficiencie ATP v mitochondriách mali zníženú fermentačnú schopnosť, obsahovali len stopy cytochrómu *c* a ATP-ázová aktivita ich mitochondrií bola redukovaná. Populácia týchto buniek, i keď v menšej miere bola schopná induktívnej syntézy α -glukozidázy a inkorporácie značených prekursorov do bielkovín i nukleových kyselín. Napriek tomu, že sa takéto bunky nefarbili s metylénovou modrou, ich schopnosť vytvoriť kolónie na komplexnom médiu bola podstatne znížená. Uvedeným dôsledkom, ktoré vyvolala deficiencia intramitochondriálneho ATP v rastúcich respiračne deficitných bunkách nebolo možné zabrániť ani pridaním niektorých prekursorov hemu, bielkovín, lipidov, alebo nukleových kyselín do komplexného rastového média obsahujúceho bunky so zvýšenou permeabilitou pre dezoxymidínofosfát.

Získané výsledky vyústili v predstavu, podľa ktorej v rastúcich eukaryotických bunkách deficiencia intramitochondriálneho ATP potrebného pre zabudovanie resp. kovalentnú modifikáciu cytoplazmaticky syntetizovaných prekursorov bielkovín, zabráni normálnej biogenéze mitochondrií. V dôsledku toho viaceré esenciálne produkty metabolických dráh lokalizovaných v týchto organelách sa stanú pre deliace sa bunky limitujúcimi.

4. Rezistencia mikroorganizmov k antimikróbnym látkam. Nové determinanty rezistencie húb proti mucidinu a ich poloha na mitochondriálnom genome

V nadväznosti na výskum rezistencie mikroorganizmov proti antifungálnym látkam zahájeným v prvej vecnej etape riešenia čiastkovej úlohy sa pokračovalo v hľadaní nových genetických miest, kontrolujúcich rezistenciu eukaryotických mikroorganizmov — kvasiniek proti mucidinu. Po mutagenéze buniek rastom v prítomnosti iónov dvojmoceňného mangánu sa izolovalo 45 nezávisle vzniknutých mutantných konov rezistentných k mucidinu. Na základe výsledkov štandardných testov sa určilo, že všetky mutanty vznikli v dôsledku nezávislých špecifických mutácií v mitochondriálnej DNK.

Testy alelizmu ukázali, že všetky mutanty možno zaradiť do troch rekombinačne odlišných lokusov označených *muc 1*, *muc 2*, *muc 3*. Mutácie v novom lokuse *muc 3* boli korelovateľné so zmenami inhibičných resp. väzbových miest na vnútornej mitochondriálnej membráne, podobne ako v prípade mutantov prvých dvoch lokusov. Z výsledkov početných rekombinačných štúdií vyplynulo, že mutácie podmieňujúce rezistenciu kvasiniek k mucidinu nevplyvajú na procesy mitochondriálnej rekombinácie ani na jej závislosť na mitochondriálnom lokuse *o*.

Rekombinačnou analýzou a detečným mapovaním mucidin-rezistentných mutácií sa podarilo na mitochondriálnej DNK zostaviť poradie jednotlivých mutačných miest kontrolujúcich rezistenciu kvasiniek k inhibítorom cytochrómu *bc*₁ komplexu. Ich poradie vo vzťahu k miestam kontrolujúcim rezistenciu k antifungálnemu antibiotiku oligomycínu resp. inému inhibítoru, cytochróm *bc*₁ komplexu- diuronu je nasledovné: — *oli 2* — *muc 1* — *diu 1* — — *muc 3* — *muc 2* — *oli 1* —. Na základe týchto poznatkov, vzhľadom na výskyt rezistencie k inhibítorom cytochróm *bc*₁ komplexu bolo možné úseky DNK, v ktorých sa podobné mutácie vyskytujú považovať za štrukturálne sekvencie rozštiepeného mitochondriálneho génu, ktorého produktom je biel-

kovina redox komponenty dýchacieho reťazca — cytochrómu *b*. Takto sa na modelovom systéme mikrobiálna bunka (kvasinka) — antifungálna látka (antibiotikum mucidin) podarilo objasniť niektoré molekulárne-genetické aspekty rezistencie húb k antimikrobiálnym látkam, ktoré umožnia v budúcnosti efektívnu aplikáciu podobných biocídov v praxi bez rizika zvýšenia frekvencie nežiadúcej rezistencie mikroorganizmov proti nim.

5. Antimikróbne látky v ochrane mäsových výrobkov pred nežiadúcou činnosťou mikroorganizmov

Pri výrobe surových trvanlivých salám typu Nitran dochádza vzhľadom na špecifické technologické podmienky — surový biologický materiál, vysoká relatívna vlhkosť, dlhá doba zrenia a sušenia — k častému výskytu kontaminujúcej mikroflóry, ktorá negatívne ovplyvňuje hygienickú nezávadnosť i kvalitu týchto výrobkov. Z týchto dôvodov vykonala sa analýza príčin a podmienok inhibície rastu nežiadúcej mikrobiálnej kontaminácie na povrchu salámy Nitran za prevádzkových podmienok.

Zistilo sa, že dominantnou mikroflórou povrchov salám popri plesniach sú najmä kvasinky. Zdrojom infekcie sú suroviny, ovzdušie výrobných priestorov, a najmä už kontaminované výrobky skladované v priebehu ich zrenia a sušenia v klimatizovaných priestoroch pri teplote a relatívnej vlhkosti priaznivej pre rast mikroorganizmov.

Za prevádzkových podmienok sa preskúmali i chemické spôsoby ochrany trvanlivých mäsových výrobkov pred mikrobiálnou kontamináciou. Na základe výsledkov laboratórnych a prevádzkových experimentov vypracoval sa účinný spôsob antifungálnej ochrany povrchu salámy Nitran s využitím *N,N*-dimetyl-1-metyldodecylaminoxidu resp. komerčne dostupného a v potravinárstve používaného sorbanu. Aplikácia týchto antimikróbnych látok za definovaných podmienok zaručila dokonalú ochranu výrobkov pred rozmnožením kontaminujúcej mikroflóry bez negatívneho vplyvu na ich senzorické vlastnosti a celkovú kvalitu.

Súhrn

Práca podáva prehľad výsledkov druhej vecnej etapy čiastkovej úlohy P 11-529-264-02 riešenej na Výskumnom ústave potravinárskom v Bratislave v rokoch 1978—1980.

Literatúra

1. ŠUBÍK, J.: Bulletin VÚP XVII, 1978, č. 1, s. 5.
2. ŠUBÍK, J. — DUDÍKOVÁ, E. — GBELSKÁ, Y. — HORVÁTHOVÁ, R. — JURÍKOVÁ, K. — LEŠKOVÁ, Z. — TAKÁČSOVÁ, G.: Výskum regulácie rastu mikrobiálnych buniek a spôsoby aplikácie ochranných látok. Priebežná správa, Bratislava 1979.
3. ŠUBÍK, J. — DUDÍKOVÁ, E. — GBELSKÁ, Y. — LEŠKOVÁ, Z. — TAKÁČSOVÁ, G.: Výskum regulácie rastu mikrobiálnych buniek a spôsoby aplikácie ochranných látok. Záverečná správa, Bratislava 1980.

4. ŠUBÍK, J. — TAKÁCSOVÁ, G. — LEŠKOVÁ, Z. — DUDÍKOVÁ, E. — GBELSKÁ Y.: Podklady pre zavedenie nových postupov inaktivácie mikroorganizmov, najmä v mliekárenskom a mäsovom priemysle za účelom zvýšenia hygieny. Nehmotný realizačný výstup P 11-529-264-02, Bratislava 1978.
5. ŠUBÍK, J. — JURÍKOVÁ, K.: Spôsob inhibície rastu kvasiniek a plesní na povrchu surových trvanlivých mäsových výrobkov. Realizačný výstup P 11-529-264-02, Bratislava 1979.
6. TAKÁCSOVÁ, G. — ŠUBÍK, J.: *Experientia* 33, 1977, s. 1415.
7. TAKÁCSOVÁ, G. — ŠUBÍK, J.: *Folia Microbiol.* 24, s. 153.
8. ŠUBÍK, J. — TAKÁCSOVÁ, G.: *Bulletin VÚP*, XVIII, 1979, č. 4, s. 1.
9. TAKÁCSOVÁ, G., ŠUBÍK, J.: *Bulletin VÚP*, XVIII, 1979, č. 3, s. 21.
10. ŠUBÍK, J. — ŠUBÍKOVÁ, V.: *Bulletin VÚP*, XIX, 1980, č. 1, s. 29.
11. ŠUBÍK, J. — TAKÁCSOVÁ, G.: *Molec. Gen. Genet.* 161, 1978, s. 99.
12. ŠUBÍK, J. — TAKÁCSOVÁ, G. — KOVÁČ, L.: *Molec. Gen. Genet.* 166, 1978, s. 103.
13. ŠUBÍK, J. — LEŠKOVÁ, Z. — GBELSKÁ, Y. — DUDÍKOVÁ, E. — TAKÁCSOVÁ, G.: *Čsl. hygiena* 25, 1988.

Прогресс в исследовании биоцидных веществ и регулированных механизмов микробиальных клеток

Выводы

В работе предьявлен обзор результатов второй предметной этаны парциальной задачи П-11-529-264-02, которая была решена в Научно-исследовательском Институте пищевой промышленности в г. Братислава в 1978—80 гг.

The advances in research of biocidal substances and regulatovy mechanisms of microbial cells

Summary

The work presents the results survey of the second real stage of partial theme P 11-529-264-02 solved in the Food Research Institute, Bratislava during the years 1978—80.