

## **Analýza látok s antibakteriálnou aktivitou v enzýmových prípravkoch mikrobiálneho pôvodu**

KATARÍNA JURÍKOVÁ – JÚLIUS ŠUBÍK

**Súhrn.** Súčasťou špecifikácie potravinárskych aditív mikrobiálneho pôvodu je i dôkaz neprítomnosti antibakteriálnych látok. Štandardnou diskovou difúznou metódou sa vyšetrilo jedenásť vzoriek priemyslových enzýmových preparátov za použitia 6 referenčných bakteriálnych kmeňov odporúčaných Komisiou exportov FAO/WHO (JECFA) a jedného referenčného kmeňa predpísaného československou normou ON 57 0531 na stanovenie reziduí antibiotík v mlieku a mliečnych výrobkoch, ktorý vykazoval vysokú citlivosť na penicilín. Zistilo sa, že vyšetrené enzýmové prípravky neobsahovali antibakteriálne látky.

Jedným z dôležitých kritérií, ktoré sa kladú na enzýmové preparáty ako potravinárske aditíva, je neprítomnosť antibakteriálnych látok [1, 2]. Difúzna agarová metóda s diskami [3, 4] je najpoužívanjšou metódou pri sledovaní antibakteriálnej aktivity látok i citlivosti aeróbných aj fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov na antibiotiká [5]. Techniky používané pri analýze citlivosti kmeňov zahŕňujú kvalitatívne metódy, keď sú mikroorganizmy inokulované do média a zaznamenáva sa vytvorenie zón inhibície rastu okolo antibiotických diskov [6] alebo semikvantitatívne [3, 7]. Vysoký stupeň reprodukovateľnosti diskovej difúznej metódy ovplyvňujú viaceré parametre, ako sú použitý typ agarovej pôdy, hĺbka agarovej pôdy v Petriho miskách, vhodný typ materiálu, z ktorého sa zhotovujú disky i štandardizácia inokula [8, 9].

V československej hygienickej praxi sa reziduá antibakteriálnych látok sledujú najmä v mlieku a mliečnych výrobkoch. V prípade použitia diskovej agarovej metódy sa papierové disky nasiaknuté skúmanou vzorkou ukladajú na povrch agarovej živnej pôdy obsahujúcej referenčný kmeň *Bacillus stearothermophilus*. Veľkosť inhibičných zón sa porovnáva s veľkosťou zón vytvorených kontrolným radom roztoku penicilínu známej koncentrácie. Prítomnosť penicilínu sa dokazuje pomocou penicilinázy, ktorá inhibuje účinok penicilínu [10].

RNDr. Katarína Juríková, RNDr. Július Šubík, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 54, 825 09 Bratislava.

Na dôkaz prítomnosti antibakteriálnych látok v potravinárskych aditívach sa odporúča vyšetrovacia metóda využívajúca 6 referančných bakteriálnych kmeňov pochádzajúcich z Americkej zbierky typových kultúr (ATCC) [1]. V odporúčanom rozsahu sa táto metóda zatiaľ u nás nepoužíva.

Cieľom práce bolo zavedenie tejto medzinárodne odporúčanej metódy a analýza prítomnosti látok s antibakteriálnou aktivitou vo vzorkách prímyselných enzýmov pochádzajúcich z mikrobiálnych zdrojov. Súčasne overovala vhodnosť použitých mikroorganizmov i citlivosť zvoleného systému detekcie s použitím antibiotík známej štruktúry, koncentrácie a spôsobu účinku [11].

### Experimentálna časť

V práci použitý postup stanovenia antibakteriálnej aktivity je určený pre vzorky potravinárskych aditív, najmä enzýmov, ktoré sú odvodené z mikrobiálnych zdrojov [1].

**Podstata metódy.** Papierový disk nasiaknutý analyzovaným roztokom enzýmu v koncentrácii  $100 \text{ g.l}^{-1}$  sa ukladá na povrch agarovej živnej pôdy inokulovanej testovacími referenčnými kmeňmi baktérií. Inkubácia pri danej teplote umožňuje rast testovacích kmeňov, ktorý sa prejaví zakalením vrstvy inokulovanej agarovej pôdy. Ak sa v analyzovanom preparáte nachádzajú látky s antimikróbnou aktivitou, vznikajú okolo diskov zóny vyjasnenia. Veľkosť inhibičných zón závisí od typu a koncentrácie antimikróbnej látky prítomnej v analyzovanej vzorke. Veľkosť vytvorených zón sa meria a porovnáva s veľkosťou zón vytvorených okolo antibiotických diskov, ktoré obsahujú definovanú koncentráciu antibiotika. Na základe rozsiahlych experimentálnych údajov boli v zahraničí zostavené interpretačné štandardy priemerov zón, na základe ktorých sa kmene podľa nameraného priemeru zón zaraďujú do kategórií citlivé, rezistentné alebo stredne citlivé [7]. Za medzný bod citlivosti resp. dôkazu prítomnosti antibakteriálnej aktivity enzýmových preparátov bol určený priemer zóny 16 mm [1].

**Mikroorganizmy.** Antibakteriálna aktivita enzýmových preparátov sa testovala proti 7 štandardným kmeňom: 1. CCM 1992 *Bacillus cereus*, 2. CC 2048 *Bacillus circulans*, 3. CCM 2024 *Escherichia coli*, 4. CCM 2022 *Staphylococcus aureus*, 5. CCM 303 *Serratia marcescens*, 6. IHE 1-29/58 *Streptococcus pyogenes*, 7. CCM 2062 *Bacillus stearothermophilus*, ktoré pochádzali z Československej zbierky mikroorganizmov v Brne, resp. z Inštitútu hygieny a epidemiológie v Prahe (*Streptococcus pyogenes*).

Testovacie mikroorganizmy sa udržiavali na šikmom agare (živný agar 2. Imuna, n.p., Šarišské Michaľany) v skúmavkách. Naočkované šikmé agary sa inkubovali v termostate pri 37 °C (*Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*), pri 30 °C (*Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Serratia marcescens*) a pri 55 °C (*Bacillus stearothermophilus*) 24–48 hodín. Takto získané kmene sa uskladňovali pri teplote 4 °C niekoľko mesiacov.

*Živné médiá.* Na prípravu tekutej živnej pôdy (inokula) sa používal Mueller-Hintonov bujón obsahujúci koncentrovaný hovädzí vývar (10,0 g.l<sup>-1</sup>), kyslý kazeínový hydrolyzát (17,5 g.l<sup>-1</sup>) a solamyl (1,5 g.l<sup>-1</sup>); pH pôdy 7,4 ± 0,2. Na stanovenie antibakteriálnej aktivity sa používal Mueller-Hintonov agar toho istého zloženia ako Mueller-Hintonov bujón doplnený agarom (15,0 g.l<sup>-1</sup>). Tieto komerčné médiá, ktoré svojím zložením zodpovedajú medzinárodným požiadavkám na štandardnú pôdu pri zisťovaní citlivosti na antibiotiká a chemoterapeutiká kvalitatívnym a kvantitatívnym spôsobom, pochádzali z Imuny, n.p., Šarišské Michaľany.

*Postup zisťovania prítomnosti antibakteriálnych látok.* Na povrch testovacích agarových misiek sa umiestňovali za sterilných podmienok papierové disky priemeru 12 mm z materiálu s vhodnou sacou schopnosťou (približne 0,1 ml roztoku), napr. Whatman 1, ktoré boli saturované roztokom vyšetrovaného enzýmového preparátu koncentrácie 100 g.l<sup>-1</sup> pridaného na povrch disku. Disky samé nevykazovali inhibičné zóny proti testovacím kmeňom pri slepom pokuse. Pre každú vzorku analyzovaného enzýmu sa pripravilo 21 diskov (3 pre každý zo 7 mikroorganizmov). Aby sa dosiahla vhodná difúzia, testovacie misky s diskami sa uložili cez noc do chladničky. Potom sa misky inkubovali pri 37 °C, resp. pri 55 °C 24 hodín a vyhodnotila sa veľkosť vzniknutých inhibičných zón okolo diskov. Viditeľne jasná zóna okolo disku priemeru aspoň 16 mm indikuje prítomnosť antibakteriálnych látok. Ak enzýmový preparát vykazuje antibakteriálnu aktivitu proti trom alebo viacerým mikroorganizmom, predpokladá sa, že obsahuje antibakteriálne látky [1].

*Enzýmové prípravky.* V práci sa použili tieto enzýmové prípravky, ktorých pôvod sa uvádza v zátvorke: Brew-n-Zym BG 5 (Holandsko), Brew-n-Zym GPG (Holandsko), Brew-n-Zym L 100 (Holandsko), pektotoetidin (ZSSR) – dve vzorky, jedna získaná zo Slovliku, n.p., Nové Mesto n/Váhom, druhá zo Stredoslovenských konzervární a liehovarov, n.p., Banská Bystrica, technická amyláza určená pre textilný priemysel (Slovenské škrobárne, n.p., závod Boleráz), amyláza (Slovenské škrobárne, n.p., Dolná Krupá), celulóza (VÚPP Praha), celulóza (Slovenské škrobárne, n.p., enzýmová poloprevádzka Dolná Krupá), glukobatatín (Slovenské škrobárne, n.p., enzýmová

poloprevádzka Dolná Krupá), alkalická proteínáza (Slovenské škrobárne n.p., enzýmová poloprevádzka Dolná Krupá).

*Antibiotiká.* Použili sa antibiotiká firmy SERVA, Heidelberg: erytromycín, ampicilín, tetracyklín, chloramfenikol a gramicidín. V-penicilín pochádzal n.p. Spofa, Sensi-La-Disky s rôznymi antibiotikami z n.p. Lachema, Brno.

## Výsledky a diskusia

Súčasťou špecifikácie potravinárskych aditív mikrobiálneho pôvodu je i dokaz neprítomnosti antimikrobiálnych látok. Preto sa uvedeným metodickým postupom vyšetrilo 11 vzoriek enzýmových preparátov domácej aj zahraničnej proveniencie. Ani jeden z enzýmových prípravkov (koncentrácia 100 g.l<sup>-1</sup>) aplikovaný na disky nevytvoril zóny inhibície rastu ani s jedným referenčným mikroorganizmom (tab. 1). Experimentálne sa takto potvrdil očakávaný predpoklad, že enzýmové prípravky vyrobené v podmienkach dobrej výroby a hygienickej praxe neobsahujú látky, resp. ich rezíduá, ktoré by boli antibakteriálne aktívne.

T a b u l k a 1. Neprítomnosť látok s antibakteriálnou aktivitou vo vyšetrovaných enzýmových prípravkoch

T a b l e 1. Absence of agents with antimicrobial activity in studied enzyme preparations

Enzýmový prípravok	Priemer zóny inhibície <sup>2</sup> [mm]						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Brew-n-Zym BG 5	0	0	18	0	0	0	0
Brew-n-Zym GPG	0	0	13	0	0	0	0
Brew-n-Tym L 100	14	13	13	0	0	0	0
pektotoetidín, 1. vzorka <sup>3</sup>	14	0	13	14	0	13	13
pektotoetidín, 2. vzorka <sup>3a</sup>	13	0	0	0	0	13	13
technická amyláza <sup>4</sup>	0	0	13	0	0	0	0
amyláza <sup>5</sup>	0	13	0	0	0	0	14
celuláza, 1. vzorka <sup>6</sup>	0	0	0	13	13	0	14
celuláza, 2. vzorka <sup>6a</sup>	0	0	0	0	13	13	0
glukobatatín <sup>7</sup>	13	0	14	0	0	13	0
alkalická proteínáza <sup>8</sup>	13	0	0	13	0	0	0

0 – bez zóny inhibície; No inhibition zone.

<sup>1</sup>Enzyme preparation; <sup>2</sup>Diameter of inhibition zone; <sup>3</sup>1st sample of Pectophoetidin; <sup>3a</sup>2nd sample of Pectophoetidin; <sup>4</sup>Technical amylase; <sup>5</sup>Amylase; <sup>6</sup>1st sample of cellulase; <sup>6a</sup>2nd sample of cellulase; <sup>7</sup>Glucobatatín; <sup>8</sup>Alkaline proteinase.

Na overenie citlivosti zvoleného systému analýzy prítomnosti antibakteriálnych látok vo vzorkách priemyselných enzýmov sa súčasne sledoval aj vplyv vybraných antibiotík na rast referenčných bakteriálnych kmeňov pochádzajúcich z československých zbierok mikroorganizmov. Použili sa antibiotiká predstavujúce typické skupiny antimikrobiálnych látok líšiace sa štruktúrou, producentom i spôsobom účinku [11]. Ako vyplýva z experimentálnych údajov uvedených v tabuľke 2, všetky kmene, pokiaľ boli na dané antibiotikum citlivé, vykazovali v závislosti od ich koncentrácie dostatočne veľké a reprodukovateľné zóny inhibície. Citlivosť definovanú zónou inhibície priemeru minimálne 16 mm pri použití 12 mm diskov mali kmene *Escherichia coli* na ampicilín (100 µg/disk), tetracyklín (100 µg/disk) a chloramfenikol (100 µg/disk), *Staphylococcus aureus* na erytromycín (1 µg/disk), ampicilín (1 µg/disk), tetracyklín (10 µg/disk) a chloramfenikol (10 µg/disk), *Streptococcus pyogenes* na erytromycín (1 µg/disk), na ampicilín (10 µg/disk), na tetracyklín (10 µg/disk) a na chloramfenikol (100 µg/disk), kmene *Bacillus cereus*, resp.

Tabuľka 2. Citlivosť referenčných kmeňov na antibiotiká aplikované na 12 mm disky  
Table 2. Sensibility of reference strains to antibiotics applied at 12 mm disks

Antibiotikum (množstvo/disk)	Priemer zóny inhibície <sup>2</sup> [mm]						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
erytromycín <sup>3</sup> 100 µg	15	48	17	50	55	54	42
	0	42	0	39	47	45	42
	0	34	0	26	32	32	28
ampicilín <sup>4</sup> 100 µg	33	54	0	34	0	20	58
	10 µg	23	0	21	0	0	56
	1 µg	20	0	13	0	0	40
tetracyklín <sup>5</sup> 100 µg	27	42	0	42	42	44	52
	10 µg	27	0	18	26	20	52
	1 µg	0	0	0	0	0	52
chloramfenikol <sup>6</sup> 100 µg	36	47	41	38	44	36	43
	10 µg	16	0	0	19	17	43
	1 µg	0	0	0	0	0	43
gramicidín <sup>7</sup> 100 µg	0	17	0	13	16	18	35
	10 µg	15	0	0	16	16	28
	1 µg	0	0	0	0	0	26
penicilín 4000 m. j.	30	72	0	51	15	35	–
	2000 m. j.	30	0	0	15	0	–

0, bez zóny inhibície; No inhibition zone. –, uvedené antibiotikum nebolo aplikované; Named antibiotic was not applied.

<sup>1</sup>Antibiotic used (quantity/disk); <sup>2</sup>Diameter of inhibition zone; <sup>3</sup>Erythromycin; <sup>4</sup>Ampicillin;

<sup>5</sup>Tetracycline; <sup>6</sup>Chloramphenicol; <sup>7</sup>Gramicidin; <sup>8</sup>Penicillin.

*Bacillus circulans* na erytromycín (1 µg/disk), na tetracyklín (10 µg/disk) a na chloramfenikol (10 µg/disk). Citlivosť referenčných kmeňov odporúčaných Komisiou FAO/WHO [1], pochádzajúcich z československej zbierky mikroorganizmov, na penicilín bola však veľmi nízka. Kmene *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans* vytvárali zóny inhibície až pri koncentrácii penicilínu 4000 m.j./disk (tab. 2 a 3). Preto sa vyšetrili enzýmové prípravky na rezíduá antibiotík aj použitím referenčného kmeňa *Bacillus stearothermophilus*, ktorý je predpísaný pre mliekárenský priemysel [10]. Citlivosť tohto kmeňa zodpovedá koncentrácii penicilínu 0,00025 m.j. v 0,1 ml mlieka. V experimentoch s komerčnými Sensi-La-Diskami, ktoré obsahovali 10 j penicilínu/disk, vytváral tento kmeň zónu inhibície priemeru až 32 mm (tab. 3). Napriek vysokej citlivosti na antibiotiká sa však ani použitím tohto kmeňa prítomnosť antibakteriálnych látok vo vyšetrovaných enzýmových prípravkoch nepozorovala (tab. 1).

Citlivosť vybraných referenčných kmeňov baktérií na uvedené antibiotiká sa potvrdila i v experimentoch použitím komerčných antibiotických Sensi-La-Diskov priemeru 5,5 mm. Zistilo sa, že všetky kmene sú citlivé i na streptomycín (tab. 3). Súčasne sa potvrdilo, že všetky testované antibiotiká v zodpovedajúcich koncentráciách sú schopné inhibovať rast a vytvárať zreteľné zóny inhibície (priemeru viac ako 16 mm) s minimálne troma referenčnými mikroorganizmami. Takto použitá mikrobiologická metóda analýzy výskytu antimikróbne aktívnych látok v enzýmových prípravkoch, resp. iných potravinárskych aditívach mikrobiálneho pôvodu je reprodukovateľná a dostatoč-

T a b u l k a 3. Citlivosť referenčných kmeňov na antibiotiká komerčných Sensi-La-Diskov priemeru 5,5 mm

T a b l e 3. Sensibility of reference strains to antibiotics of commercial Sensi-La-Disks with 5,5 mm diameter

Antibiotikum (množstvo/disk) <sup>1</sup>	Priemer zóny inhibície <sup>2</sup> [mm]						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
erytromycín <sup>3</sup> 10 µg	0	23	0	20	24	19	30
ampicilín <sup>4</sup> 20 µg	13	17	10	13	0	10	60
tetracyklín <sup>5</sup> 30 µg	14	12	0	26	25	20	30
chloramfenikol <sup>6</sup> 30 µg	20	18	18	20	25	15	26
streptomycín <sup>7</sup> 30 µg	19	12	11	20	18	15	24
penicilín <sup>8</sup> 10 j.	0	8	0	0	0	0	32

0 – bez zóny inhibície; No inhibition zone.

<sup>1</sup>Antibiotic used (quantity/disk); <sup>2</sup>Diameter of inhibition zone; <sup>3</sup>Erythromycin; <sup>4</sup>Ampicillin

<sup>5</sup>Tetracycline; <sup>6</sup>Chloramphenicol; <sup>7</sup>Streptomycine; <sup>8</sup>Penicillin.

ne citlivá. V prípade, že dôjde k vytvoreniu zóny inhibície vyšetrovanými enzýmovými prípravkami, možno predpokladať, že obsahujú antibakteriálne látky v koncentrácii viac ako  $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  bezvodého, resp. neriedeného enzýmového prípravku.

Vzhľadom na nedostatok devízových prostriedkov sme v práci použili namiesto zahraničných referenčných kmeňov, odporúčaných komisiou FAO/WHO (JECFA), ekvivalentné kmene rovnakého druhu i rodu odporúčané a vybrané pre tieto účely z Československej zbierky mikroorganizmov v Brne (CCM). Z uvedených bakteriálnych kmeňov *Bacillus cereus* a *Bacillus circulans* mali približne rovnakú citlivosť na testované antibiotiká (tab. 2 a 3). Termofilný kmeň určený na stanovovanie reziduí antibiotík v mlieku a mliečnych výrobkoch sa vyznačoval vysokou citlivosťou na penicilín (tab. 2 a 3). Preto navrhujeme pri vyšetrovaní potravinárskych aditívnych látok na prítomnosť látok s antibakteriálnou aktivitou pri použití metodického postupu odporúčaného komisiou FAO/WHO nahradiť kmeň *Bacillus circulans* československým referenčným kmeňom *Bacillus stearothermophilus*.

Zo zdravotného hľadiska sa v súvislosti s použitím enzýmov v potravinárstve zatiaľ problémy nevyskytli. Je však dôležité a potrebné, aby sa vypracovali a poskytovali experimentálne dôkazy a vedecky podložené informácie o tom, že používané, resp. nové enzýmové prípravky sú zdravotne nezávadné, neobsahujú antibakteriálne látky a nepredstavujú riziko pri konzumácii potravín, do ktorých sa pridávali [2].

## Literatúra

- [1] ANONYMOUS: Determination of antibacterial activity. FAO Food and Nutrition Paper, No. 19, 1981, s. 217.
- [2] SZOKOLAY, A. – ŠUBÍK, J.: Hygienické hľadiská aplikácie enzýmov v potravinárstve. Čsl. hyg. 30, 1985, s. 437.
- [3] BAUER, A. W. – KIRBY, W. M. – SHERRIS, J. C. – TURCK, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45, 1966, s. 493.
- [5] WATTS, J. L. – NICKERSON, S. C.: Evaluation of a rapid inoculum standardization system for antimicrobial susceptibility testing of bacterial isolates from the bovine mammary gland. Veter. Microb. 12, 1986, s. 269.
- [7] ERICSSON, H.: Rational use of antibiotics in hospitals. Scand. J. Clin., Lab. Invest. 12 (Suppl. 50). 1960, s. 1.
- [9] BARRY, A. L. – GARCIA, F. – THRUPP, L. D.: An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. Am. J. Clin. Pathol. 53, 1970, s. 149.
- [10] ON 57 0531. Stanovení reziduí antibiotik a látek inhibujících růst mlékařenských kultur v mléce a mléčných výrobcích. MZVŽ ČSR, Mlékařenský průmysl GŘ Praha, GRT Bratislava, 1982.
- [11] KRČMĚRY, V. – PAČES, V. – RYCHLÍK, I. – EBRINGER, L. – AUGUSTÍN, J., Antibiotiká. Bratislava, Alfa 1978.

## **Анализ веществ с антибактериальной активностью в энзимных препаратах микробиального происхождения**

### **Резюме**

Составной частью спецификации непищевых добавлений микробиального происхождения в пищевой промышленности является и доказательство отсутствия веществ антибактериального характера. С помощью стандартного диффузионного метода было определено одиннадцать проб промышленных энзимных препаратов применением шести референционных бактериальных штаммов, рекомендованных Комиссией экспертов FAO/WHO (JECFA), и одного референционного штамма, описанного чехословацкой нормой ON 57 0531 для определения остатков антибиотиков в молоке и молочных продуктах, оказывающего высокую чувствительность к пенициллину.

Было установлено, что исследованные энзимные препараты не содержали веществ антибактериального характера.

### **Analysis of agents with the antibacterial activity in enzyme preparations of microbial origin**

### **Summary**

The evaluation of the absence of antibacterial components is a part of the specification of food additives of microbial origin. They were investigated in 11 industrial enzyme preparations using the standard diffusion method. Six reference bacterial strains recommended by Joint Expert Commission FAO/WHO (JECFA) and one reference strain recommended by the Czechoslovak standard (ON 57 0531) for the evaluation of residues of antibiotics in milk and milk products with high sensitivity to penicillin were used.

Antibacterial agents were not found in the investigated enzyme preparations.