

O mechanizme účinnosti konzervačných agensov

J. ARPAL, Z. LEŠKOVÁ

Konzervačné činidlá sú spravidla účinné tým spôsobom, že zasahujú do životne dôležitých procesov mikroorganizmov, ktoré sú nimi inhibované, podobne ako aktivita bezbunkových rozkladných enzýmov. Zásah do esenciálneho metabolismu bunky smeruje predovšetkým do syntézy nukleových kyselín a bielkovín (1). Pritom nastávajú reakcie, ktoré možno trojstupňovo diferencovať na:

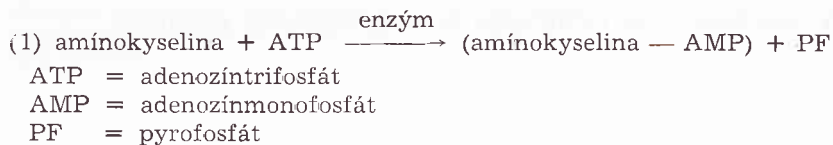
1. účinok navonok (anglicky: effect);
2. spôsob účinku (mode of action);
3. mechanizmus účinnosti (mechanism of action).

Kým účinok navonok je u väčšiny konzervačných činidiel, najmä u bežne používaných, veľmi dobre známy, a to aj z hľadiska podstatných rozdielov vo vzťahu k rôznym druhom rozkladných organizmov alebo aj enzýmov, je spôsob účinku, a nad to mechanizmus účinnosti, prebádaný len u málokterých konzervačných látok. To platí čiastočne aj na konvenčné a povolené konzervačné činidlá a tým viac na nové prostriedky (2).

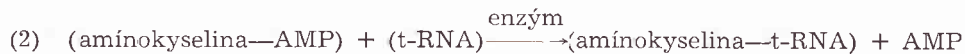
Mnohostranná súhra a tesné, vzájomne späté vzťahy v látkovej výmene nepochybne bunky viedli k tomu, aby sa mechanizmus účinnosti biologicky aktívnej látky pokiaľ možno študoval v bezbunkovom systéme. Variácie v skladbe systému, ktoré podmieňujú priebeh istej reakcie, predstavujú pritom základ, z ktorého vychádza metodika sledovania. To platí menovite o kvantitatívnych a kvalitatívnych zmenách v metabolizme bielkovín, príp. aj nukleových kyselín. Vzhľadom na to, že „in vitro“-systémy fungujú spravidla len krátky čas a následkom rozrušenia prirodzenej bunkovej skladby majú sklon k tvorbe artefaktov, ktoré sťažujú správnu interpretáciu účinku na základe vonkajšieho prejavu (t. j. efektu), sa v mnohých prípadoch uplatňujú aj skúšky konzervačných agensov za použitia neporušených buniek.

Na ozrejmienie a zdôvodnenie vhodnosti pracovných postupov, ktoré sa zvolia pre experimentálne sledovanie účinnosti konzervačných látok treba nazrieť do schémy biosyntézy bielkovín v bunke, ktorú tu uvedieme vo veľmi zjednodušenej forme:

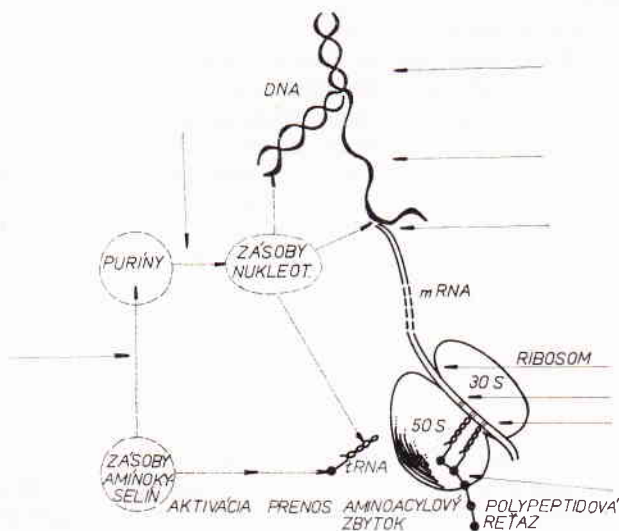
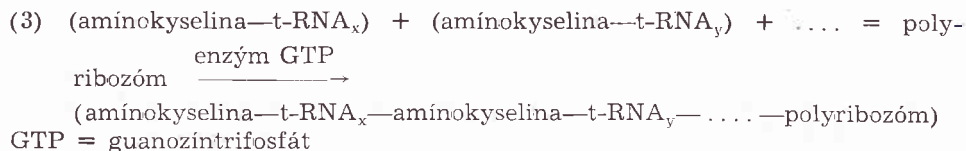
Aby sa aminokyseliny nachádzajúce sa v bunke vo voľnej forme mohli použiť ako stavebné kamene k syntéze bielkovín, musia sa predovšetkým dostať na energetickú hladinu, ktorá im umožňuje vzájomne sa spájať peptidickými väzbami. Táto tzv. aktivácia aminokyselín, ktorá sa vyznačuje vznikom zlúčeniny charakteru anhydridu z kyslého zvyšku aminokyseliny a zvyšku kyseliny adenylovej ATP, platí ako prvý krok biosyntézy bielkovín.



Takto vzniklá amínocyl-adenylátová zlúčenina je energeticky veľmi bohatá a následkom toho reaguje v ďalšom s rozpustnou formou RNA, ktorá je približne identická s transferovou RNA (t-RNA), na ktorú pripadá 10 až 15 % celkového obsahu RNA v bunke, ako sme to už podrobnejšie uviedli v predchádzajúcej štúdii o metabolizme RNA v bunke (3). Každá z 20 proteinogénnych amínokyselín mikróbnjej bunky (4) sa pomocou osobitného enzýmu prenáša na špecifickú t-RNA. Prenos amínocyllového zvyšku sa deje esterifikáciou s 2' — a 3' — OH skupinami ribózy jednej z adenylových kyselín, nachádzajúcej sa na reaktívnom konci molekuly t-RNA:

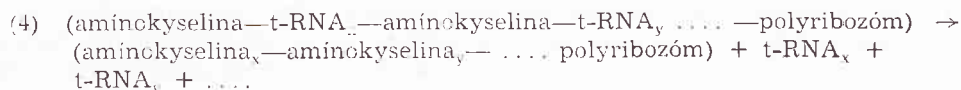


t-RNA, ako to zodpovedá jej označeniu, transportuje v tzv. transferovej reakcii viazané amínokyseliny na ribozómy, ktoré sú, ako je známe, častice zložené z bielkoviny a RNA. Tieto ribozómy sú vo funkčnom stave viazané na membránové štruktúry, alebo sa vyskytujú vo forme polymérov ako tzv. polyribozómy:



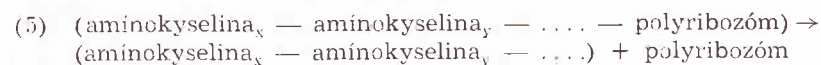
Schematické znázornenie lokalizácie zásahov protimikróbných prostriedkov do metabolizmu nukleových kyselín a bielkovín. Plné šípky ukazujú fakultatívne miesta protimikrobiálneho zásahu.

Jednotlivé ribozómy, ako súčasti polyribozómu, sú medzi sebou spojené ďalšou formou RNA, ktorá sa označuje messenger alebo informačná RNA (i-RNA). Pravdepodobne majú ribozómy dôležitú funkciu stabilizovať nestálu i-RNA. Tieto jednotlivé ribozómy, označované na základe sedimentačného gradientu ako 70 S ribozómy, ktoré sa skladajú z jednej 50 S a z jednej 30 S podjednotky, sa podľa súčasnej predstavy o mechanizme syntézy bielkovín prenášajú pozdĺž refazca i-RNA. Súčasne dochádza k peptidickej väzbe medzi približenými aminokyselinami, po čom každý z jednotlivých ribozómov dostáva rastúcu polypeptidickú refaz. Uvoľnené t-RNA molekuly môžu opäť priberať aktivované aminokyseliny:



Informačná RNA sa označuje nielen podľa anglického messenger, t. j. poslíček RNA, ale aj ako matricová RNA, a to toho dôvodu, že sa zúčastňuje na komplementárnej replikácii DNA v chromozónoch. Uskutočňuje to tým, že prenáša genetickú informáciu alebo posolstvo DNA vo forme sekvencie báz, čím nakoniec určuje geneticky správny sled aminokyselín v novosyntetizujúcej sa bielkovine. Je známe, že spravidla 3 nukleotidy i-RNA kódujú istú aminokyselinu. Messengerový povrazec sa teda skladá z nepretržitého sledu tripletových kódov, ktorých bázy určujú sekvenciu aminokyselín polypeptidov. Na realizáciu prepisu informácie z i-RNA na protein sú ako medzičlánky zapojené častice t-RNA naložené aminokyselinami. Tieto t-RNA častice majú pravdepodobne triplet nukleotidov, ktorý má charakter antikódu vo vzťahu k i-RNA. Kódy a antikódy sú pritom prechodne späté vodíkovými mostíkmi. Počas usporiadania kódov vstupuje zbytok aminokyselín, nachádzajúci sa na terminálnom konci t-RNA, v peptidickú väzbu s ďalším zbytkom aminokyselín. Na peptidickej väzbe sú pravdepodobne zapojené len 50 S podjednotky ribozómov, ktoré sa tu pripájajú pomocou t-RNA — aminoacyl — komplexov. Naproti tomu i-RNA sa podľa toho nadväzuje na 30 S podjednotky.

Vytvorené polypeptidy, resp. bielkoviny sa nakoniec odlučujú od ribozómov a prechádzajú do bezštruktúrovej oblasti bunky. Tento reakčný proces nie je síce doposiaľ jednoznačne objasnený, znázorňuje sa však nasledovne:



Z uvedenej schémy, znázorňujúcej predstavu, ktorá vo veľmi zjednodušenej forme zodpovedá tzv. adaptorovej teórii, vyplýva, že štruktúry, na ktorých sa tvoria bielkoviny, menovite ribozómy, polyribozómy a i-RNA predstavujú najzraniteľnejšie miesta mikrobiálnej bunky, na ktoré sa zameriava účinok inhibičných, resp. konzervačných činidiel (5). Pritom treba vždy rozlišovať medzi primárnym mechanizmom, t. j. chemicky definovateľnou reakciou protimikróbnej látky s chemicky definovaným receptorom bunky a rôznymi formami sekundárnej reakcie, ktoré sa zväčša obťažne diferencujú.

Po otázke chladne miesta nasleduje otázka o spôsobe, akým prebieha reakcia na blokovanie syntézy nukleových kyselín a bielkoviny, čiže životných procesov. Odpoveď vo svetle súčasných poznatkov uvádza, že protimikróbne látky, vrátane konzervačných činidiel, sa rozdeľujú do nasledujúcich troch skupín, medzi ktorými však niet celkom vyhranených hraníc (6):

1. kompetitívne inhibítory definovaných enzymatických reakcií, t. j. anti-metabolity;

2. protimikróbne látky, ktorých účinnosť je založená na schopnosti tvorby vodíkových mostíkov (popr. kovalencii) na určitých makromolekulách, alebo na tzv. cross-linking reakciách medzi makromolekulou a inhibítorom;

3. činidlá, ktoré prilnú k istým esenciálnym makromolekulám pod vplyvom svojich špeciálnych povrchových vlastností alebo elektrického náboja. Tieto látky účinkujú mechanizmom akejsi vytesňovacej reakcie s bunkovými komponentami, s ktorými konkurujú na reakčnom mieste makromolekuly.

Prvá skupina je najmenej problematická. Spôsob účinku látok, zaradených do tejto skupiny, je pomerne najlepšie osvetlený. Mechanizmus účinnosti sa vhodne porovnáva k vzťahu „kľúča k zámku“, ktorý sa prejavuje na bielkovinovej komponente enzýmu tým spôsobom, že pri enzymatickej reakcii vstúpajú inhibítory ako antagonisti na miesto prirodzeného substrátu. Predpokladom pre takýto mechanizmus účinnosti je špecifická štruktúra povrchového profilu enzýmovej bielkoviny, ktorá je rovnako spôsobilá na naviazanie substrátu ako aj antimetabolitu. Účinné protimikrobiálne látky tohoto typu interferujú spravidla s látkovou výmenou nukleových kyselín alebo bielkovín. Ako príklad takéhoto mechanizmu nech je uvedený antimetabolit D-alanín, ktorý zasahuje do syntézy baktériovej bunkovej blany, čím zabraňuje tvorbe uridindifosfátových peptidov kyseliny muramínovej, z ktorej sa skladajú podstatné zložky mukopeptidov baktériových membrán. Poznemenáva sa, že kompetitívna inhibícia platila ešte donedávna ako jediné vysvetlenie účinnosti protimikróbných látok (7).

Spôsob účinnosti látok druhej skupiny sa týka najmä tvorby vodíkových mostíkov, pomocou ktorých DNA vstupuje do komplexných zlúčenín. V iných prípadoch sa ukazuje, že prevládajú cross-linking reakcie. Sem patria tiež precipitačné reakcie, ktoré však môžu prebiehať nielen medzi antimikrobiálnou látkou a nukleovými kyselinami, ale aj s inými polyaniónmi (8).

K tretej skupine patria skoro všetky ostatné protimikrobiálne látky, pričom treba zdôrazniť, že inhibítory, zasahujúce do látkovej výmeny bielkovín, majú — pokiaľ sa to dá na základe dnešného stavu poznatkov určiť — svoje miesto pôsobenia na ribozóme (9). Predpokladom pre to je, že molekula inhibítora má konfiguráciu podobnú štruktúre pyrimidinnukleozidov, čím sa jej dostáva anti-metabolického charakteru v oblasti messengerovej funkcie na ribozóme. Interferencia s kationmi bunkového obsahu nie je doposiaľ prehľadným spôsobom ozrejmeneá. Vedľa zásahov do syntézy bunkovej blany svedčia výsledky niektorých autorov aj na zastavenie redukcie nitrátov, aktivity sukcinodehydrogenázy, ATP-ázy a prenosu aminokyselín pri proteobiosyntéze. Pritom je zaujímavé, že sú to všetko reakcie, ktoré prebiehajú za účasti Mg^{2+} . Na doplnenie treba uviesť, že o niektorých inhibítoroch sa dokázala ich účinnosť na oxidatívnu fosforyláciu, na metabolizmus ATP, na elektrónový transport, na metabolizmus železa a na syntézu hemínu (10). Napriek rôznorodosti mechanizmu účinnosti jednotlivých antimikrobiálnych látok, majú tieto spoločného menovateľa v tom, že v konečnom výsledku vyvolávajú zastavenie látkovej výmeny alebo usmrtenie bunky. Rozhodujúcim činiteľom je pritom koncentrácia inhibítora na mieste reakcie, čiže problém prijímania alebo prenikania inhibičnej látky bunkou. S tým súvisí aj otázka vzniku špecifickej rezistencie, ktorá môže rozhodujúcim spôsobom znížiť alebo aj podviazať účinok protimikróbnej látky.

O vzniku a mechanizme rezistencie sa pojednáva v rozsiahlej literatúre (11). Na tomto mieste sa zhrnújú jej závery do nasledujúcich bodov. Rezistencia môže mať svoju príčinu:

1. V induktívnom vyvolávaní enzymatickej aktivity, ktorou sa rozrušuje inhibítor sám osebe pôsobiaci ako induktor;
2. v prirodzenej enzymatickej aktivite bunky;
3. v geneticky determinovanej rezistencii;
4. v prekážkach fyzikálno-chemickej alebo mechanickej povahy, ktoré zapríčínujú, že protimikrobiálna látka sa nedostane vôbec alebo nie v dostatočne účinnej koncentrácii na miesto pôsobenia (12).

Uvedený náčrt známych mechanizmov účinnosti protimikrobiálnych látok ukazuje, že ich poznávanie podmieňuje racionálne použitie antibakteriálnych látok, ku ktorým sa počítajú aj konzervačné prostriedky. Voľba a metóda aplikácie konzervačných látok sa deje doposiaľ prevažne empiricky a podmienky použitia sa spoznávajú a spresňujú spravidla až priebehom dlhodobých skúseností, nie zriedka draho zaplatených. Za týchto podmienok sa javí potrebným študovať mechanizmus protimikrobiálnej účinnosti konzervačných látok, najmä tých, ktoré sa majú zavádzať do praxe, aby sa mohli optimalizovať podmienky ich použitia. Pritom sa veľmi často zanedbáva najmä štúdium závislosti účinku od teploty prostredia. Má to však veľký význam vzhľadom na sezónne podmienené výkyvy teploty, ako aj najmä z toho dôvodu, že v potravinárstve sa stále vo väčšej miere aplikuje chlad ako hlavný alebo doplnkový konzervačný faktor, ktorým sa však účinnosť chemických konzervačných, popr. dekontaminačných prostriedkov v mnohých prípadoch narušuje. Stáva sa to najmä u takých protimikrobiálnych látok, ktorých mechanizmus má prevažne charakter chemickej reakcie, podliehajúcej Arrheniovmu zákonu. Tým sa stáva aktuálnym vyhľadávanie inhibitorov s malým teplotným koeficientom v oblasti nižších teplôt. Takéto vlastnosti možno očakávať predovšetkým od inhibitorov, ktoré pôsobia prevažne na fyzikálnom, resp. elektrochemickom princípe.

Súhrn

Pri sledovaní účinnosti protimikrobiálnych látok vo všeobecnosti a konzervačných prostriedkov osobitne treba diferencovať účinok navonok, spôsob účinnosti a mechanizmus účinku. Charakteristika týchto pojmov sa zakladá na vzťahu k procesom proteosyntézy, resp. ich inhibície. V podstate sa inhibitory rozlišujú na kompetitívne, kovalenčné a interferenčné pôsobiace.* Strata účinnosti inhibitorov nastáva spravidla následkom vzniku špecifickej rezistencie indukovanej na popud samotného inhibítora alebo determinovanej na základe genetických vlastností.

Poznatky o mechanizme inhibitorov majú svoj praktický význam aj v potravinárstve, lebo umožňujú racionálnu aplikáciu konzervačných prostriedkov, t. j. ich výber a dávkovanie so zreteľom na druh výrobku a spôsob spotreby.

Poznámka

Podstatné časti tejto štúdie sa predniesli na Seminári potravinárskej mikrobiológie Čs. spoločnosti mikrobiologickej pri CSAV, ktorý sa konal na Ústrednom výskumnom ústave potravinárskeho priemyslu pobočka v Bratislave dňa 7. októbra 1966.

Literatúra

1. Arpai J., Lešková Z., Longauerová D., *Fol. Microbiol.* 10, 168 (1965).
2. Parthier B., *Die Pharmazie* 20, 465 (1965).
3. Arpai J., Lešková Z., *Bulletin ÚVÚPP* 5 (č. 4), 49 (1966).
4. Bryson V., *Surv. Biol. Progr.* 4, 345 (1962).
5. Davis B. D., Feingold D. S., *The Bacteria*, Edit. Gunsalus and Stanier, Vol. 4, Academic Press, New York 1962.
6. Gale E. F., *Pharmacol. Rev.* 15, 481 (1963).
7. Braunštejn A. E., Azarkh R. M., Seng H. T., *Biochimija* 26, 772 (1961).
8. Meadow P. M., Anderson J. S., Stromenger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 382 (1964).
9. Broek T. D., *Science (Washington)* 136, 316 (1962).
10. Kulka R. G., Cooper C., *J. Biol. Chemistry* 237, 936 (1962).
11. Slater E. C., *Metabolic Inhibitors*, Vol. 2, Edit.
12. Arpai J., Tomišová J., *Mikrobiologičeskij žurnal* 28, 34 (1966).

О механизме действия консервирующих средств

Выводы

При исследовании действия протимикробных веществ вообще и средств для консервирования специально, нужно различать действие наружу, способ действия и механизм действия. Характеристика этих понятий основана на отношении к процессам протеосинтеза, или их ингибирования. В сущности ингибирующие средства можно по действию разделить на: конкурентивные, ковалентные и интерференционные. Потеря действия ингибирующих средств наступает, как правило, вследствие возникновения специфической резистентности, которая вызвана самым ингибирующим средством или детерминирована на основании генетических свойств.

Знания о механизме действия ингибирующих средств имеют свои практические значения тоже в пищевой промышленности, потому что позволяют рациональное применение консервирующих средств, т. е. их подбор и дозы с учетом на продукт и способ применения.

Mechanism of the Preserving Reagents Effect

Summary

In the studies of the effect of the antimicrobial substances in general, of the preservatives especially, it is to differentiate the external effect, the mode of the action and the mechanism of the action. The characteristic of these conceptions is based on the relation to the proteosynthesis processes, their inhibition respectively. Substantially the inhibitors are differentiated as acting competitively, covalently and interferently. The loss of the inhibitors effect occurs as a rule owing to the rise of specific resistance induced by the impulse of the inhibitor itself or determined by the genetic properties.

The knowledge of the inhibitors mechanism is important also for food industry's practice since it enables the rational application of the preservatives, i. e. their choice and dosing in regard to the kind of the product and the way of the consumption.