

J. TOMIŠOVÁ

Medzi najnovšie a najmodernejšie spôsoby tepelného spracovania patrí uplatnenie vysokofrekvenčnej energie. Keďže je tepelné opracovanie potravín zaujímavé nielen po stránke technologickej, ale aj po stránke mikrobiologickej, rozhodli sme sa stanoviť bakteriostatický a baktericidný účinok vysokofrekvenčnej energie v závislosti od času jej pôsobenia. Poznatky, ktoré nadobúdame pri mikrobiologických analýzach, nám umožňujú spresniť možnosti uplatnenia vysokofrekvenčnej energie v konzervárenskej technológii (1).

Z literárnych zdrojov je nám už známe, že táto energia sa môže využiť napríklad aj pri ničení rodu *Salmonella* ako aj *Staphylococcus* pred zmrazovaním (2). Olsen (3) vo svojej práci uvádza údaje o využití vysokofrekvenčnej energie pri ničení spór *Aspergillus niger*. Garrick a Ambin (4) citujú ďalšiu prácu Olsena (5), podľa ktorého majú mikrovlny sterilizačný účinok. Chlieb ošetrovaný mikrovlnami bol ešte 10 dní po ošetrení ako čerstvý a bol chutný. Pri tomto pokuse súčasne zistil, že v chlebe naočkovanom plesňou *Aspergillus niger*, ktorý prešiel mikrovlnným ohrevom o frekvencii 2.450 MHz počas 2 minút, znížil sa počet životaschopných spór až na 0,188 na plochu v porovnaní s kontrolnou vzorkou (bez vysokofrekvenčného zásahu), kde sa na rovnakej ploche zistilo 2000 životaschopných spór. Z ďalších už publikovaných prác sú zaujímavé najmä práce Robea (6), ktorý uvádza, že vysokofrekvenčná energia znižuje potrebný čas a teplotu pri pasterizácii tak, že 1 minúta vysokofrekvenčného ohrevu pri 49 °C je účinnejšia ako 30 minút ohrevu pri 60 °C obvyklým spôsobom. K svojim záverom došiel na základe výsledkov s pasterizovaním piva a vína. V súvislosti so zistenou skutočnosťou, že pri 49 °C nastáva usmrcovanie kvasiniek pomocou vysokofrekvenčnej energie, si autor kladie otázku, či v tomto prípade usmrcovanie nenastáva iným spôsobom ako tepelným účinkom. Avšak táto základná otázka nebola zatiaľ hlbšie preverená. Pri 49 °C nastáva ostrý zlom smrtiaceho účinku na kvasinky. Táto skutočnosť vedie k dohadom, že vysokofrekvenčné pole má na mikroorganizmy selektívny alebo lokalizovaný ohrevný účinok alebo, že pri použitých kmitočtoch vyvoláva rozrušujúci účinok.

Mikroorganizmy použité v našich pokusoch pochádzali jednak zo zbierky oddelenia, jednak z Čs. zbierky mikroorganizmov Univerzity J. E. Purkyňu. Kmene pre pokusné účely sa udržiavali a rozmnožovali v pravidelných intervaloch na šikmom agare podľa konvenčných mikrobiologických metód. Inkubačná teplota sa udržiavala podľa jednotlivých kmeňov. Pre vlastné pokusy sme použili 2–4-dňové vyrastené kultúry.

Zdroj vysokofrekvenčnej energie. Časť pokusov sme uskutočnili na stacionárnom dvojkilovatovom zariadení s dĺžkou vln 12,6 cm a časť na kontinuálnom vysokofrekvenčnom zariadení s výkonom 10 kW a dĺžkou vln 24 cm pri rýchlosti posuvu transportného pásu 1 m (103 sek) (7).

Pracovný postup. Naše pokusy s pôsobením vysokofrekvenčnej energie na mikroorganizmy sme rozdelili do niekoľkých etáp. V prvej etape sme sledovali pôsobenie vysokofrekvenčnej energie na mikroorganizmy, v druhej etape pôsobenie vysokofrekvenčnej energie na kvasinky a v tretej etape pôsobenie vysokofrekvenčnej energie na plesne. K prvým informatívnym pokusom sme použili tieto kmene mikroorganizmov:

Bacillus cereus

Bacillus megaterium

Bakteriálna kultúra týchto kmeňov bola kultivovaná na mäsopeptónovom agare s prídavkom 1 % glukózy (Difco agar) a inkubovaná v termostate pri 30 °C počas 4 dní. Vyrastený porast kultúry mikroorganizmov (na šikmom agare) bol zoškrabaný sterilnou bakteriologickou kľučkou a sterilne prenesený do vopred pripravenej sterilnej vody v Erlenmayerových bankách v množstve 50 ml. Táto suspenzia bola homogenizovaná a po docielení homogénnej suspenzie centrifugovaná 20 minút pri 4000 obr. za min, supernatant zliaty a sediment premytý sterilnou vodou v množstve 20 ml a opäť centrifugovaný 20 minút pri 4000 obr. za min. Sediment bol 3 razy za sebou premytý. Potom sa riedil 10 ml sterilnej vody a z tejto suspenzie v množstve 2,0 ml sa odobralo sterilne do 9,0 ml sterilnej vody a tiež aj do 9,0 ml bujónu (Difco).

Z takto pripravenej bakteriálnej suspenzie sa do práce bralo 11,0 ml o hustote 10^6 – 10^7 buniek/ml. v skúmavkách cca 20 cm vysokých. Bakteriálna kultúra resuspendovaná v sterilnej destilovanej vode vo vysokých skúmavkách nevyvrela ani pri jednom časovom intervale, iba pri vystavení účinku vysokofrekvenčnej energie počas 3 minút boli všetky zátoky vyrazené.

Mikrobiologické rozbory: Pred expozíciou účinku vysokofrekvenčnej energie sa z bakteriálnej suspenzie odobrali vzorky ako kontrola na stanovenie celkového počtu mikroorganizmu v 1 ml vzorky. Potom sa odoberali vzorky po jednotlivých posuvoch taktiež na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov s tým účelom, aby sa sledovalo prežívanie mikroflóry po expozícii. Sledované vzorky boli kultivované na mäsopeptónovom agare s prídavkom 1 % glukózy (Difco agar).

Bacillus cereus

| Čas účinku vysokofrekvenčnej energie | Celkový počet mikroorganizmov v 1 ml vzorky |
|--------------------------------------|---|
| Kontrola v bujóne | $6,1 \cdot 10^8$ |
| Kontrola vo vode | $3,7 \cdot 10^8$ |
| 1 min. expozície v bujóne | $1,8 \cdot 10^8$ |
| 1 min. expozície vo vode | $2,2 \cdot 10^6$ |
| 2 min. expozície vo vode | $8,8 \cdot 10^5$ |
| 3 min. expozície vo vode | $3,6 \cdot 10^4$ |

Bacillus megaterium

| Čas účinku vysokofrekvenčnej energie | Celkový počet mikroorganizmov v 1 ml vzorky |
|--------------------------------------|---|
| Kontrola v bujóne | $3,1 \cdot 10^6$ |
| Kontrola vo vode | $2,7 \cdot 10^6$ |
| 1 min. expozície suspenzia v bujóne | negat. |
| 1 min. expozície suspenzia vo vode | $3,0 \cdot 10^3$ |
| 2 min. expozície suspenzia vo vode | $2,0 \cdot 10^2$ |
| 3 min. expozície suspenzia vo vode | negat. |

Pri ďalších niekoľkokrát opakovaných pokusoch sme použili tieto kmene mikroorganizmov:

Staphylococcus epidermis

Sarcina lutea

Escherichia coli

Aerobacter aerogenes

Streptococcus lactis

Streptococcus bovis

Streptococcus haemophylus

Streptococcus zymogenes

Pri týchto pokusoch sme postupovali vyššie uvedenou metodikou, t. j. bakteriálna suspenzia v množstve 1 ml vo vysokých skúmavkách bola vystavená účinku vysokofrekvenčnej energie po dobu 1 a 2 posuvov. (1 posuv = 1 ml/103 sek). Pred každou expozíciou sa odoberali vzorky v množstve 1 ml ako kontroly na stanovenie celkového množstva mikroorganizmov. Po expozícii sa bakteriálne suspenzie vyočkovali opäť v množstve 1 ml na mäsopeptonový agar s prídavkom 1 % glukózy (Difco agar) na stanovenie celkového množstva mikroorganizmov za účelom sledovania prežívania po účinku vysokofrekvenčného zásahu.

Výsledky

Celkový počet mikroorganizmov v bujónovej kultúre

| Mikroorganizmy | Pred ohrevom | Prechod vysokofrekvenčným poľom | |
|-----------------------------------|------------------|------------------------------------|--------|
| | | 1 krát | 2 krát |
| <i>Staphylococcus epidermis</i> | $1,1 \cdot 10^7$ | $8,4 \cdot 10^3$ | negat. |
| <i>Sarcina lutea</i> | $9,0 \cdot 10^6$ | $6,5 \cdot 10^3$ | negat. |
| <i>Escherichia coli</i> | $4,6 \cdot 10^7$ | $3,8 \cdot 10^2$ | negat. |
| <i>Aerobacter aerogenes</i> | $5,6 \cdot 10^7$ | $4,2 \cdot 10^2$ | negat. |
| <i>Streptococcus lactis</i> | $6,2 \cdot 10^7$ | $3,4 \cdot 10^3$ | negat. |
| <i>Streptococcus bovis</i> | $7,8 \cdot 10^7$ | $2,6 \cdot 10^3$ | negat. |
| <i>Streptococcus haemophyllus</i> | $8,1 \cdot 10^7$ | $5,5 \cdot 10^3$ | negat. |
| <i>Streptococcus zymogenes</i> | $5,4 \cdot 10^7$ | $4,1 \cdot 10^3$ | negat. |

Escherichia coli

| | |
|------------------|----------------------------|
| Kontrola | riedenie 10^7 prerastené |
| 1 min. expozície | riedenie 10^3 prerastené |
| 3 min. expozície | negat. |

Sarcina lutea

| | |
|------------------|------------------|
| Kontrola | $6,0 \cdot 10^8$ |
| 1 min. expozície | $2,1 \cdot 10^6$ |
| 3 min. expozície | negat. |

2. etapa. Pôsobenie vysokofrekvenčnej energie na kvasinky. Ako pokusné médium sme použili pekárské drożdžie. Rozdrobili sme ho pomocou sterilného skalpela na drobné kúsky na Petriho miskách a vystavili účinkom vysokofrekvenčného zdroja. Po expozícii sa drożdžie homogenizovalo v 9,0 ml destilovanej sterilnej vode v množstve 1 g a potom vyočkovalo na Sabouraudov agar. Po 4 dňoch kultivácie sme pokusy vyhodnotili.

Pekárenské droždie

| Kvasinky | Celkový počet kvasiniek | Po účinku VF energie 2 min. |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Pekárenské droždie | v riedení 10 ⁶ prerastené | 2,0 · 10 ¹ |

3. etapa. Pôsobenie vysokofrekvenčnej energie na plesne.

K pokusom sme použili tieto kmene:

Penicillium chrysogenum

Penicillium roqueforti

Aspergillus oryzae

Aspergillus niger

Aspergillus flavus

Monilia laxa

Mucor hiemalis

Fusarium sambucii

Paecilomyces sp.

Botrytis cinerea

Kmene sme získali v čistej kultúre z Čs. zbierky mikroorganizmov Univerzity J. E. Purkyňa v Brne. K pokusom sme použili vysporulované kolónie plesní.

Kultúry plesní boli kultivované na Sabouraudovom agare a inkubované v termostate pri 22 °C počas 7–8 dní. Vyrastené a vysporulované kolónie plesní sme vystavili účinku vysokofrekvenčnej energie počas 3 minút pri 0,45 amp. a po expozícii sa inkubovali v termostate pri 22 °C počas 7–8 dní ako dôkaz baktericidnosti vysokofrekvenčného ohrevu počas 3 minút.

Z takto exponovaných kultúr plesní (primárne) sa potom preočkovalo na sterilnú Sabouraudovu pôdu v Petriho miskách a opäť sa sledoval rast kultúr počas 7–8 dní.

Výsledky

| Kmene plesní | Pôvodná kultúra po vystavení účinku VF energ. 3 min. | Po preočkovaní z pôvodnej kultúry |
|--------------------------------|---|---|
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | negat. | negat. |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | negat. | negat. |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | negat. | negat. |
| <i>Aspergillus niger</i> | negat. | negat. |
| <i>Aspergillus flavus</i> | negat. | negat. |
| <i>Monilia laxa</i> | negat. | 2,8 · 10 ¹ |
| <i>Mucor hiemalis</i> | negat. | negat. |
| <i>Fusarium sambucii</i> | negat. | negat. |
| <i>Paecilomyces</i> | negat. | negat. |
| <i>Botrytis cinerea</i> | negat. | negat. |

Pokusy s vysporulovanými kolóniami plesní

| Kmene plesní | Primárna kultúra 3 min. ohrev VF | Po preočkovaní primár. kultúry |
|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Aspergillus niger</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Aspergillus glaucus</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Mucor mucedo</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Mucor hiemalis</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Fusarium sambucinum</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Fusarium nivale</i> | nerastie | nerastie |

Pokusy s vysporulovanými kolóniami plesní

| Kmene plesní | Primárna kultúra vystavená účinku VF energie po 3 minútach | Po preočkovaní primárnej kultúry |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Botrytis cinerea</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Monilia laxa</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Paecilomyces sp.</i> | nerastie | nerastie |
| <i>Mucor piriformis</i> | nerastie | nerastie |

Plesne rodu *Neurospora*

Rhizopus

Primárna kultúra plesní po vystavení účinku vysokofrekvenčnej energie

1 min. exp. = 0,5 amp.

3 min. exp. 0,6 amp.

| Mikroorganizmy | 1 min. expozícia | 3 min. expozícia |
|-------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>Neurospora</i> | v riedení 10^2 prerastené | negat. |
| <i>Rhizopus</i> | v riedení 10^3 prerastené | negat. |

Kultúry plesní po preočkovaní z pôvodných kultúr vystavených účinkom vysokofrekvenčnej energie na Sabouraudov agar

| Mikroorganizmy | Z kultúry vystavenej 1. min. účinku VF-ohrevu | Z kultúry vystavenej 3 min. účinku VF-ohrevu |
|----------------|--|---|
| Neurospora | $3,0 \cdot 10^2$ | negat. |
| Rhizopus | $2,6 \cdot 10^3$ | negat. |

V ďalších pokusoch s kultúrami plesní sme postupovali obdobne, ako sme uviedli vyššie, s tým rozdielom, že pri týchto pokusoch sme sledovali prežívanie mikroorganizmov po 1, 2 a 3 posuvoch. Zistili sme, že už po 2 posuvoch došlo k úplnému zastaveniu rastu kultúry. Ani po preočkovaní na sterilnú Sabouraudovu pôdu nedošlo k obnoveniu rastu kultúr.

Výsledky

| Kmene plesní | Prechod vysokofrekvenčným poľom | | |
|--------------------------------|---------------------------------|----------|----------|
| | 1 krát riedenie 10^1 | 2 krát | 3 krát |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | hustý porast | nerastie | nerastie |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Fusarium sp.</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Aspergillus niger</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Aspergillus flavus</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Monilia laxa</i> | rastie | nerastie | nerastie |

Tab. 10. Zmyslové a chemické hodnotenie bravčového pliecka v polystyrénovom kontajneri s CO₂

| Kmene plesní | Prechod vysokofrekvenčným poľom | | |
|--------------------------|---------------------------------|----------|----------|
| | 1 krát riedenie 10^1 | 2 krát | 3 krát |
| <i>Mucor hiemalis</i> | hustý porast (rastie) | nerastie | nerastie |
| <i>Fusarium sambucii</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Paecilomyces</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Botrytis cinerea</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Neurospora sp.</i> | rastie | nerastie | nerastie |
| <i>Rhizopus</i> | rastie | nerastie | nerastie |

Všetky pokusy, ktoré sme robili pri riešení tejto problematiky za účelom zistenia bakteriostatického a baktericidného účinku vysokofrekvenčnej energie na baktérie, kvasinky a plesne v čistých kultúrach, môžeme predbežne hodnotiť ako pokusy informatívne, pretože v týchto pokusoch išlo o možnosť aplikácie vysokofrekvenčnej energie na čisté kultúry. Bolo treba preskúšať vhodné koncentrácie buniek v suspenzii, ako aj pracovný postup pri kontinuálnom vysokofrekvenčnom zariadení. Pri tomto type zariadenia totiž dlhšie pôsobenie vysokofrekvenčnej energie (ako 1 posuv) je možné iba opätovným vložením bakteriálnej suspenzie na transportný pás, čo znamená, že exponovaný materiál sa vybral zo zdroja vysokofrekvenčnej energie a pomaly sa znovu posúval do ohrievacieho priestoru na druhý a potom opäť na tretí posuv. Je možné, že nepretržité ohrievanie vysokofrekvenčnou energiou a diskontinuálne ohrievanie pri rôzne dlhých intervaloch prerušenia ohrievania a teda čiastočného schladenia, hoci prerušenie vysokofrekvenčného ohrevu sa môže pohybovať iba v minútach, nie sú ekvivalentné.

Z našich experimentálnych výsledkov vyplýva, že pri mikroorganizmoch, ako je napríklad *Bacillus cereus* v čistej kultúre, dochádza účinkom vysokofrekvenčnej energie k poklesu počtu zárodkov prepočítané na 1 ml suspenzie úmerne so zvyšovaním času expozície vysokofrekvenčnou energiou. K výraznejšiemu poklesu počtu zárodkov došlo v kultúre resuspendovanej v bujóne, kým v kultúre resuspendovanej v destilovanej sterilnej vode sa tento pokles počtu mikroorganizmov javí oveľa slabšie. Pri kmeni *Bacillus megaterium* došlo po 1-minútovej expozícii v bujónovej kultúre k úplnému zastaveniu rastu kultúry, kým v kultúre resuspendovanej v sterilnej destilovanej vode došlo pri tomto čase k úplnému zastaveniu rastu až po 3 minútach expozície. Znížená citlivosť kultúry suspendovanej v destilovanej sterilnej vode voči vysokofrekvenčnému ohrevu je vysvetliteľná ináč známym faktom, že intenzívne metabolizujúce mikroorganizmy sú voči škodlivým účinkom oveľa citlivejšie ako organizmy so zníženým alebo endogénnym metabolizmom.

Plesniam v čistých kultúrach v našich pokusoch sme venovali zvláštny oddiel ako veľmi dôležitých z hľadiska potravinárskeho výskumu a praxe a prišli sme k záverom, že už po 3, resp. 2 minútach expozície vysokofrekvenčnou energiou došlo k úplnému usmrteniu.

Keďže — ako sme už uviedli — v našich pokusoch išlo o informatívne preskúšanie vplyvu vysokofrekvenčnej energie na mikroorganizmy, v budúcnosti bude potrebné tejto problematike ešte venovať pozornosť. Tiež bude treba na pokusy používať také kmene mikroorganizmov, ktoré boli izolované z potravín, resp. z potravinárskych výrobkov, a presne stanoviť čas a intenzitu ohrevu na ten-ktorý kmeň z hľadiska baktericidnosti kmeňa.

S ú h r n

Medzi najmodernejšie metódy tepelnej úpravy potravín patrí aj využitie vysokofrekvenčnej energie. Vychádzajúc z najnovších prác v tomto odbore snažili sme sa v našich informatívnych pokusoch s mikroorganizmami aplikovať vysokofrekvenčný ohrev a vyskúšať jeho účinky na prežívanie baktérií, kvasiniek a plesní za rôznych podmienok. Pri týchto informatívnych pokusoch sme zistili, že už po 3 minútach expozície VF ohrevom dochádza k ich usmrteniu.

Literatúra

1. Vašicová-Kostolanská J., Použitie VF energie pre tepelné spracovanie potravín. Sborník z konferencie o progresívnych spôsoboch úchovy potravín. 1967 (v tlači).
2. Woodburn M., Bennion M., Vail G. E., Food Technology, 1962, č. 6, s. 98.
3. Olsen O. M., Food Trade Rev. 36, 1966, č. 6, s. 57-61.
4. Garrick A., Ambin B. Sc., Food Trade Rev. 36, 1966, č. 6.
5. Olsen O. M., Food Engineering 37, 1965, č. 7, s. 51.
6. Robe K., Food Proces. and Market. 27, 1966, č. 3, s. 84.
7. Vašicová-Kostolanská J., Závěrečná správa UVÜPP, 1968.

Влияние высокочастотной энергии на микроорганизмы

Выводы

Между самые прогрессивные методы тепловой обработки пищевых продуктов принадлежит и использование высокочастотной энергии. Исходя из самых новейших работ в этой области мы в наших информативных опытах с применением микроорганизмов стремились применить высокочастотной обогрев и испытать его действие на переживание бактерий, дрожжей и плесней за различных условий. При этих информативных опытах мы определили, что уже после трех минут экспозиции высокочастотной энергией происходит их гибель.

The effect of high-frequency energy upon mikroorganisms

Resumé

The application of high-frequency energy is one of the most modern methods of thermic processing of food. Upon the basis of the latest works in this branch we have, in the course of our informative experiments with mikroorganisms, attempted to apply high-frequency heating and to investigate its influence upon the survival of bacteria, yeasts and moulds in various conditions. In these informative experiments we have found, that they are killed off after an exposition of three minutes to high-frequency heating.