

Overenie antimikrobiálnej účinnosti vybraných aditívnych látok

VALÉRIA KOVANIČOVÁ – SLAVOMÍRA DUDÁŠOVÁ – JANA MICHÁLKOVÁ

Súhrn. V práci sa porovnávala antimikrobiálna účinnosť vybraných aditívnych látok – glycínu, extraktov *Allium cepa* a *A. sativum* na testovacom mikroorganizme *Bacillus cereus* platňovou dilučnou metódou, diskovým difúznym testom a difúznou agarovou metódou.

Z výsledkov vyplýva, že najlepším inhibítorom rastu buniek a klíčenia spór *B. cereus* je glycín; inhibuje rast už v koncentrácii 0,5 %, kým extrakt *A. cepa* mal minimálnu inhibičnú koncentráciu 5 %, resp. 25 % podľa použitého druhu a extrakt *A. sativum* bol účinný v koncentrácii 1 %.

Súčasná potravinárska veda hľadá nové zdroje konzervačných postupov, ktoré na jednej strane zabezpečia sterilitu potravín za súčasného zníženia nárokov na energiu, a na druhej strane potlačia negatívne účinky doteraz zaužívaných konzervačných postupov, najmä sterilizácie, na nutritívnu a senzoryckú hodnotu potravín.

Jedným z týchto postupov je využitie aditívnych látok, vyznačujúcich sa mikrobicídnyimi vlastnosťami. Okrem zisťovania ich zdravotnej nezávadnosti, príspevku k organoleptickým a nutritívnym vlastnostiam potravín, ceny a pod. nie je nepodstatné ani sledovanie antimikrobiálnej účinnosti týchto látok. Robí sa to spravidla priamo v hotovom výrobku vyšetrovaním mikrobiologického obrazu, avšak inou možnosťou sú aj testy na určenie citlivosti vybraných mikroorganizmov zastúpených v potravinách, na sledované konzervačné látky.

V súčasnosti sa viacerí autori venujú sledovaniu mikrobicídnych vlastností aminokyselín [1-4]. Zistilo sa, že z 20 testovaných aminokyselín vykazuje

Ing. Valéria Kovaničová, Ing. Jana Michalková, Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Slavomíra Dudášová, CSc., Výskumný ústav výživy ľudu, nám. 4. apríla 7-8, 812 30 Bratislava.

najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu glycín, zvlášť proti gram-pozitívnym a gram-negatívnym baktériám [1]. Veľmi zaujímavými látkami z hľadiska inhibičného účinku na mikroorganizmy sú aj fytoncídne látky rastlín, napr. horčica, chren, cesnak, cibuľa a ďalšie, ktoré sa vyznačujú vlastnou protimikróbnou odolnosťou i značnou ochranou, ktorú sú schopné poskytovať ich prísady potravinám [5–7]. Cenné pri ich použití je, že ide o zložky už dlho konzumovaných potravín, pri ktorých sa dá predpokladať veľmi malá pravdepodobnosť škodlivosti a ďalšou výhodou je neschopnosť mikroorganizmov získavať proti nim rezistenciu.

V práci porovnávame inhibičnú účinnosť glycínu a extraktov fytoncídnych látok v obchodnej sieti zakúpenej zimnej cibule, jarnej lahôdkovej cibule a zimného cesnaku na testovacom mikroorganizme *Bacillus cereus*.

Materiál a metódy

Príprava suspenzie testovacieho mikroorganizmu. Kultúru *B. cereus* (CCM 2010) získanú v lyofilizovanom stave z Čs. zbierky mikroorganizmov sme oživilí po pridaní vhodného kvapalného média preočkovaním na tuhú pôdu (živný agar č. 2 – výrobca Imuna, n. p., Šarišské Michaľany, používa sa ako 4 % vodný roztok). Po predpísanej inkubácii sme kultúru niekoľkokrát preočkovali. Odtiaľ sme spóry i vegetatívne bunky preniesli do fyziologického roztoku (0,85 % vodný roztok NaCl). Takto pripravenú suspenziu s obsahom asi 10^8 buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ sme skladovali v chlade ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a slúžila na odoberanie inokula pre experimenty.

*Príprava extraktov fytoncídnych látok cibule (*Allium cepa*) a cesnaku (*A. sativum*)* [8]. 1 diel cibule, resp. cesnaku sme homogenizovali v homogenizátore s 1 dielom destilovanej vody. Homogenizát sme filtrovali cez Whatman 1 a filtrát centrifugovali 10 minút pri 10,000 otáčkach za minútu. Číry supernatant sme sterilizovali cez Seitzov filter a do použitia skladovali v chladničke. Pri sledovaní účinnosti jednotlivých aditívnych látok sme porovnávali ich antibakteriálnu aktivitu pred záhrevom a po ňom (10 min pri $97\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Platňová dilučná metóda [9]. Extrakty aditívnych látok nariadené vo fyziologickom roztoku sme pridali priamo k agarovej pôde pred jej vyliatím do Petriho misiek tak, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia na 1 ml testovacej pôdy. Testovací kmeň sme naočkovali náterom (kľučkou) na povrch pôdy a po predpísanej inkubácii ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ počas 24 h) sme sledovali vizuálne MIC (minimum inhibitory concentration), t. j. koncentráciu aditíva, pri ktorej nie je okom viditeľný nárast testovacieho mikroorganizmu, najmenej z 3 paralelných stanovení.

Diskový difúzny test [9, 10]. Testovaciú pôdu sme rozliali do Petriho misiek (ϕ 10 cm) po 20 ml. Pred naočkováním testovacieho mikroorganizmu musí byť povrch pôdy relatívne suchý, nesmú byť na ňom viditeľné stopy vlhkosti. Po naočkovaní a zaschnutí inokula sme prikladali na povrch pôdy 3 až 5 napipetovaných diskov, nasýtených testovanými aditívnymi látkami známej koncentrácie, a to tak, aby priliehali celou plochou na agar. Po inkubácii v termostate (37 °C počas 24 h) sme odčítavali priemerné kruhové inhibičné zóny (v mm) zo 6 paralelných stanovení.

Difúzna agarová metóda [6]. Na vysušený povrch testovacej agarovej pôdy, rovnomerne rozliatej do Petriho misiek po 20 ml, sme naočkovali náterom 0,2 ml inokula. Sterilným odzátkačom priemeru 8 mm sme vyrezali do agaru otvory, do ktorých sme pipetovali 0,08 ml extraktu aditív známých koncentrácií. Po inkubácii (ako v predchádzajúcich prípadoch) sme zo 6 paralelných stanovení odčítavali priemerné kruhové inhibičné zóny (v mm).

Výsledky a diskusia

V práci sme porovnávali baktericídnu účinnosť jednej látky aminokyselinového a troch látok fytoncídneho pôvodu – glycínu a v obchodnej sieti zakúpenej zimnej cibule, jarnej lahôdkovej cibule a zimného cesnaku na rast kultúry *Bacillus cereus*. Keďže ich použitie v konzervárenskej praxi sa viaže na kom-

Tabuľka 1. Stanovenie MIC aditívnych látok dilučnou metódou
Table 1. MIC additive substances determination by dilution method

Konc. aditíva ¹ [%]	Glycín ²	Zimná cibuľa ³	Jarná cibuľa ⁴	Zimný cesnak ⁵
50	+	+	+	+
25	+	+	+	+
10	+	+	–	+
5	+	+	–	+
2,5	+	–	–	+
1	+	–	–	+
0,5	+	–	–	–
0,25	–	–	–	–

+ aditívum účinné na testovaný mikroorganizmus; Additive affects the tested microorganism.

– aditívum neúčinné na testovaný mikroorganizmus; Additive does not affect the tested microorganism.

¹Additive concentration; ²Glycine; ³Winter onion; ⁴Spring onion; ⁵Winter garlic.

Tabuľka 2. Sledovanie inhibičných zón aditívnych látok difúznou agarovou metódou
Table 2. Studying the inhibition zones by diffusion agar method

Konc. aditíva ¹ [%]	Veľkosť inhibičných zón ² [mm]							
	glycín ³		zimná cibuľa ⁴		jarná cibuľa ⁵		zimný cesnak ⁶	
	Z ⁷	N ⁸	Z	N	Z	N	Z	N
100			1,3	3,5	1,0	1,5	11,0	13,0
50			1,0	1,5	0,0	0,5	6,5	7,2
25			0,5	1,0	0,0	0,0	4,0	6,2
10			0,0	0,5	0,0	0,0	2,5	5,3
5	3,4	1,3	0,0	0,2	0,0	0,0	1,9	2,4
2,5			0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	1,0
1	1,9	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,6
0,5	1,2	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Pri extraktach fytoncídnych látok *A. cepa* (jarná a zimná cibuľa) a *A. sativum* (zimný cesnak) boli koncentrácie supernatantov, pripravených podľa postupu uvedeného v experimentálnej časti, uvažované ako 100 %.

On suing phytocidal substance extracts from *A. cepa* (spring and winter onion) and *A. sativum* (winter garlic) were the supernatant concentrations, prepared according to the procedure described in the experimental section, considered as 100 %.

¹Additive concentration; ²Size of inhibition zones; ³Glycine; ⁴Winter onion; ⁵Spring onion; ⁶Winter garlic; ⁷heated; ⁸non-heated

Z – zahrievané

N – nezahrievané

Tabuľka 3. Sledovanie inhibičných zón aditívnych látok diskovým difúznym testom
Table 3. Studying the inhibition zones by additive substances by disk diffusion test

Konc. aditíva ¹ [%]	Veľkosť inhibičných zón ² [mm]							
	glycín ³		zimná cibuľa ⁴		jarná cibuľa ⁵		zimný cesnak ⁶	
	Z ⁷	N ⁸	Z	N	Z	N	Z	N
100			2,5	3,5	0,5	0,7	10,6	12,2
50			1,5	2,1	0,0	0,2	6,5	8,5
25			1,1	1,6	0,0	0,0	3,8	5,6
10	2,3	1,0	1,0	1,3	0,0	0,0	2,0	4,3
5	1,8	0,9	0,5	1,0	0,0	0,0	1,2	2,3
2,5	1,6	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	1,8
1	1,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,5
0,5	0,8	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5

For explanations see Table 2.

Z – zahrievané

N – nezahrievané

bináciu s ďalším konzervačným zákrokom – najčastejšie tepelným, a podľa literatúry [11, 12] sa v cibuli a cesnaku varením znižuje obsah účinných zložiek, difúznymi testmi sme porovnávali aj inhibičnú účinnosť sledovaných aditív bez záhrevu (N – nezahrievané) a po záhreve (97 °C počas 10 min, Z). Dosiahnuté výsledky sú zhrnuté v tabuľkách 1–3.

Z výsledkov vyplýva, že z baktericídneho hľadiska je zo sledovaných látok najvhodnejší glycín, ktorý v porovnaní s ďalšími testovanými aminokyselinami [1, 4] vykazuje najvyššiu antibakteriálnu účinnosť.

Vhodnou látkou pre konzervárenské účely sa javí aj extrakt cesnaku, ale ako vyplýva z tabuľky 1, aj 5 % koncentrácia zimnej cibule je prijateľná z hľadiska jej mikrobicídneho účinku. Nižší inhibičný účinok cibule, v porovnaní s cesnakom, môže okrem iného súvisieť aj s nižšou prchavosťou jej účinných zložiek [13]. Výsledky uvedené v tabuľkách 1–3 korešpondujú s výsledkami viacerých autorov [6, 14], avšak pri extraktoch fytoncídnych látok treba brať do úvahy aj závislosť antimikrobiálnej účinnosti od kultivaru.

Keďže zatiaľ je predpoklad, že sa aditívne látky neaplikujú, resp. nebudú aplikovať ako samostatný konzervačný zákrok, ale iba ako aditívny, najčastejšie s tepelnou úpravou, najvhodnejšie aditívum je glycín, pretože obidva, difúzne testy dokázali, že kým pri cibuli a cesnaku sa zahrevom degradovali mikrobiologicky účinné látky, na čo poukazujú aj niektorí autori [11, 12], pri glycíne sa aplikáciou zvýšenej teploty mikrobicídna účinnosť neznížila.

Literatúra

1. SHIBASAKI, I., J. Food Safety, 4, 1982, s. 35.
2. SASAJIMA, M. SHIBA, M. – ARAI, K., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 42, 1976, s. 469.
3. ANDO, Y. – KAMEYAMA, K. – KARASHIMADA, T., J. Food Hyg. Soc. Jap., 16, 1975, s. 258.
4. KOVANIČOVÁ, V. – ŠORMAN, L.: Mikrobiologické a senzorické zmeny potravín, spôsobené prídavkami aditívnych látok. In: Vedecká konferencia CHTF SVŠT, Bratislava 1988.
5. GRZYBOWSKI, R. – URBAN, K., Przem. Spożyw., 37, 1983, s. 540.
6. DANKERT, J. – TROMP, T. F. J. – DEVRIES, H. – KLASSEN, H. J., Zbl. Bakt. Hyg., 21, 1975, s. 229.
7. SHARMA, A. – PADWAL – DESAI, S. R. – BONGIRWAR, D. R. – SREENIVASAN, A., J. Food Sci., 44, 1979, s. 1545.
8. MANTIS, A. J. – KOIDIS, P. A. KARAIIOANNOGLOU, P. G. – PANETSOS, A. G., Lebensm.-Wiss. Technol., 12, 1979, s. 330.
9. HEJZLAR, M. – HYLAR, B. – TEPLÝ, M.: Antibiotika a jejich použití v potravinářství a zemědělství. Praha, SNTL 1980, 282 s.
10. DURAKOVIČ, S. – MIHELÍČ, F. – SUŠNIK-RIBANSKI, I. – KUNIČ, L., Hrana i Ishrana, 24, 1983, s. 147.
11. KOVÁČ, M. a kol.: Niektoré fyzikálnochemické zmeny prebiehajúce v technologickom pro-

- cese výroby požívatín, Výskumná správa. Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1987.
12. SHARMA, A. – PADWAL – DEASI, S. R. – BONGIRWAR, D. R. – SREENIVASAN, A., J. Food Sci., 46, 1981, s. 741.
 13. THOMAS, P.: Radiation Preservation of Foodstuff Plant Origin. Part 2. Onions and Other Bulb Crops. CRC Critical Reviews. Food Sci. ad Nutr., 21, 1982, s. 95.
 14. SHELEF, L. A., J. Food Safety, 6, 1983, s. 29.

Do redakcie došlo 30. 9. 1988

Проверка антимикробного действия отборных непищевых добавлений

Резюме

Работа занимается сравнением антимикробного действия отборных непищевых добавлений – глицина, экстрактов *Allium cepa* и *A. sativum* на контрольном микроорганизме *Bacillus cereus* методом плитного разведения, дисковым диффузионным тестом и диффузионным агаровым методом. Результаты показывают, что самым подходящим ингибитором роста клеток и ростка спор *B. cereus* является глицин, который ингибирует рост уже при концентрации 0,5 % пока у экстракта *A. cepa* минимальная ингибирующая концентрация 5 % а также 25 % в зависимости от примененного сорта и экстракт *A. sativum* действовал в концентрации 1 %.

Verification of antimicrobial effectiveness of some additives

Summary

The work studied an antimicrobial effectiveness of chosen additives – glycine, *Allium cepa* and *A. sativum* extracts on tested microorganism *Bacillus cereus* by plate dilution method, disk diffusion test and diffusion agar method.

The results showed that the best inhibitor for cell growth and budding of spores *B. cereus* was glycine, it inhibited the growth from concentration 0.5 %, while the extract *A. cepa* showed the minimal inhibition concentration of 5 % or 25 % according to the form used and the extract *A. sativum* was effective at concentration of 1 %.