

MAISTO SAUGUMO DIDINIMAS NATŪRALIŲ MEDŽIAGŲ PRIEDAIS

A. Šarkinas¹, A. Šipailienė²

¹Lietuvos maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-3031 Kaunas; el.p.: Antanas_Sarkinas@fc.vdu.lt

²Kauno technologijos universitetas, Radvilėnų pl. 19, LT-3028 Kaunas; el.p.: asipailiene@yahoo.com

Santrauka. Aromatinių ir prieskoninių augalų ekstraktų ir eterinių aliejų antimikrobinių savybių tyrimai gana gausiai aprašomi literatūros šaltiniuose. Mūsų darbe difuzijos į agarą metodu buvo tiriamas jų aktyvumas prieš kai kuriuos mikroorganizmus (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*) ir išskirtas iš pieno produktų mieles (*Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra*, *Debariomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*).

Įvertinant tirpiklio įtaką tiriamos medžiagos aktyvumui difuzijos į agarą metodu, augalų ekstraktai buvo tirpinami vandenyje ir etanolyje. Apibendrinamosios išvados apie vieno ar kito tirpiklio poveikį iš gautų duomenų padaryti negalima, nes vienų ekstraktų buvo aktyvesni vandeniniai, kitų – etanoliniai tirpalai.

Stebint ląstelių skaičiaus dinamiką triptono–sojų sultinyje esant optimaliai temperatūrai nustatyta, kad veikiamos sidabrinės jonažolės žuvo visos *S. aureus* ląstelės, tačiau paprastojo rapontiko ekstraktas ląstelių augimo neslopino. *B. cereus* atžvilgiu atvirkščiai – veiksmingesnis buvo rapontiko ekstraktas.

Augalų ekstraktų ir eterinių aliejų priedai lėtina mikroorganizmų dauginimąsi mėsos farše.

Raktažodžiai: augalų ekstraktai, eteriniai aliejai, maisto saugumas, antimikrobinės savybės.

PREDESTINATION OF FOOD SAFETY BY NATURAL INGREDIENTS

Summary. Antimicrobial properties of the extracts isolated from various aromatic and spicy plants have been reported in numerous sources. This study was aimed at testing the antimicrobial effect on some microorganisms (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* and some species of yeasts: *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra* *Debariomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*).

Studying the bactericidal properties of plant extracts by the method of diffusion into agar, the effectiveness of substances dissolved in ethanol and water was investigated. Single extracts have been found to inhibit the growth of some bacteria species, yet there have been no effects of the solvent determined on the bactericidal properties of the extracts in general.

The extracts under study and a suspension of microorganisms were added to a liquid broth of tripton - soya and kept at optimum temperature. The examination of the number of cells, has shown a divergent effectiveness of separate extracts with respect to the microorganisms. The extract of *Hypericum perforatum* had contributed to the killing of all the *S. aureus* cells, while the extract of *Rhaponticum carthamoides* leaves had no effect on the growth of *B. cereus*.

The influence of some plant extracts on some species of yeasts was studied using the method of diffusion into agar. The extracts of *Mentha piperita* have been found to be of the highest activity, while the extracts of *Origanum vulgare* did not inhibit the growth of yeasts.

Keywords: plant extracts, essential oils, antimicrobial activity, food safety.

Įvadas. Maisto produktų saugumui užtikrinti, be kitų priemonių, gali būti naudojami konservantai. Jų vartojimą pastaruoju metu stengiamasi mažinti ar pakeisti natūraliomis medžiagomis. Baktericidinėmis savybėmis pasižymi daugelio augalų ekstraktai ir eteriniai aliejai, galintys pakeisti prieskonius ir suteikti produktui visiškai naujas skonines savybes, kartu slopinti ir nepageidaujamos mikrofloros dauginimąsi. Nuolat plėtojami šių medžiagų gamybos būdai. Anksčiau augalų ekstraktai buvo gaunami naudojant kaip tirpiklius įvairias chemines medžiagas – heksaną, acetoną, metanolį, etanolį ir kt. Dalis jų yra toksiški, todėl tirpikliai produkte nepageidaujami, jų kiekis ribojamas. Superkrizinės ekstrakcijos metodas suskystintu anglies dioksidu

pašalina bet kokių nepageidaujamų medžiagų patekimo į ekstraktus galimybę.

Daugelyje literatūros šaltinių analizuojamos augalų ekstraktų ir eterinių aliejų baktericidinės savybės bei jų pritaikymo galimybės (Adegohe et al., 2000; Jeng – Lenk Mau et al., 2001; Stojanovic et al., 2000; Daljit et al., 1999). Iš įvairių augalų gautų medžiagų baktericidinės savybės ir dozės yra labai nevienodos, o kai kurių augalų ekstraktų ir didesnės koncentracijos nėra efektyvios, todėl tiriamieji darbai nuolat atliekami, nustatomi veiksmingi augalų ekstraktai, bandomos jų tarpusavio kompozicijos ar mišiniai su kitomis medžiagomis (Толкунова и др., 2001a; 2001b), nes derinių poveikis dažnai esti stipresnis.

Augalų ekstraktai turi ir antioksidacinių savybių, o jų

priedai šiomis savybėmis praturtina ir produktus. Tam tikrą efektą galima pasiekti netgi šeriant karves tais augalais, kurių ekstraktai yra aktyvūs (Uegaki et al., 2001).

Savo darbu mes siekėme įvertinti augalų ekstraktų ir eterinių aliejų antibakterines savybes bandymuose su testuojamomis kultūromis ir modelinėse maisto sistemose.

Tyrimų metodai ir sąlygos. Darbas atliktas Lietuvos maisto instituto mikrobiologijos laboratorijoje. Ekstraktų antibakterinės savybės buvo vertinamos skystoje terpėje su ekstraktais stebint ląstelių skaičiaus dinamiką ir difuzijos į agarą metodu. Testavimo kultūros buvo dešimt nepageidaujamų maisto produktų mikroorganizmų, tarp jų patogeninių: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* ir *Bacillus cereus*. Iširtos ir aštuonios rūšys mielių, išskirtų iš pieno produktų*: *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri* ir *Rhodotorula rubra*, *Debariomyces hansenii* ir *Trichosporon cutaneum*.

Ląstelių suspensijai paruošti kultūros 18 valandų buvo auginamos 37°C temperatūros triptono–sojos sultinyje, permaišomos mažąja purtykle. Atitinkamas ląstelių skaičius supiltas į ištirpintą ir iki 47 °C atvėsintą agarizuotą terpę bendram bakterijų skaičiui nustatyti (Plate count agar, Lab m) ir vėl gerai permaišytos, skubiai išpilstytos į 90 mm skersmens petri lėkšteles po 10 ml. Terpei sustingus padarytos 6 įdubos (9 mm skersmens), į kurias įpilta 10-50 µl ekstraktų įvairių koncentracijų tirpalo (1 %, 5 %, 10 %). Tirpinta vandenyje arba etanolyje.

Ekstraktų antibakterinės savybės įvertintos po 24 valandų kultivavimo pagal skaidriųjų zonų, susidariusių aplink įdubas, skersmenį, išreikštą mm. Jei skaidriosios zonos aplink įdubas nesusidarė, buvo daroma išvada, kad tirtas ekstraktas ar naudota koncentracija antibakterinių savybių neturi.

Ląstelių skaičiaus dinamika triptono–sojų sultinyje su ekstraktų priedais (0,5 %) buvo stebima optimalioje kiekvienai kultūrai temperatūroje, periodiškai nustatant testavimo kultūros skaičių sėjimo į lėkšteles metodu. Pradinis atskirų bakterijų ląstelių kiekis svyravo tarp 10^4 – 10^7 .

Tiriant augalų ekstraktų ir eterinių aliejų įtaką maisto produktų stabilumui, atitinkamas šių medžiagų kiekis buvo maišomas su kiaulienos faršu ir, periodiškai nustatant bendrą bakterijų skaičių 4 ± 2 °C temperatūroje saugomame farše, vertinamas jų antibakterinis efektas ir įtaka faršo stabilumui saugojimo metu.

* Mielės išskyrė ir identifiko dr. I. Mačionienė (Lietuvos maisto institutas)

Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas. Vertinant augalų ekstraktų baktericidines savybes gana patogiu naudoti difuzijos į agarą metodą ir įvairių koncentracijų ekstraktų tirpalus. Tiriamieji augalų ekstraktai ne visuose tirpikliuose gerai tirpsta, o tai gali iškreipti tyrimo rezultatus. Su testavimo kultūromis išbandėme didžiosios

dilgėlės ir pušų ekstraktų tirpalus, paruoštus distiliuotame vandenyje ir etanolyje.

Pušų ekstraktų tirpalai pasižymėjo antibakteriniu poveikiu ir sudarė 11–20 mm skersmens skaidriąsias slopinimo zonas. Lėkštelėse su trimis testavimo kultūromis didesnes skaidriąsias zonas sudarė vandeniniai tirpalai, su trimis – etanoliniai. Bandyme su *Staphylococcus aureus* tirpiklis įtakos neturėjo, skaidriųjų zonų dydis sutapo.

Didžiosios dilgėlės abiejų rūšių ekstraktų tirpalai pasižymėjo silpnesnėmis antibakterinėmis savybėmis, veikė ne visas bakterijas, joms pasireikšti tirpiklis didesnės įtakos neturėjo. Taigi iš atliktų tyrimų sunku daryti apibendrinimus apie tirpiklio įtaką eksperimento rezultatams. Lyginant atskirų ekstraktų efektyvumą geriau naudoti vieną tirpiklį.

Difuzijos į agarą metodas ne tik parodo, kuris ekstraktas efektyviausias, bet ir leidžia spręsti apie poveikio mastą bei veiksmingas aktyviosios medžiagos koncentracijas. Norint nustatyti, kokia ekstrakto dozė gali būti baktericidinė visoms testavimo kultūros ląstelėms ir per kiek laiko tai įvyksta, galima naudoti kitą metodą – tiriamąjį ekstraktą įpilti į skystą terpę su testavimo kultūra ir stebėti ląstelių kiekio pokyčius, laikant šią modelinę sistemą norimomis sąlygomis.

Tyrimų metu nustatėme, kad *Staphylococcus aureus* ląstelės triptono–sojų sultinyje su sidabrinės jonažolės ekstraktu negali daugintis 37°C temperatūroje. Pradinis ląstelių skaičius buvo $3,1 \times 10^7$ KSV/ml, po dviejų valandų liko $6,0 \times 10^6$ KSV/ml, o po 24 ir 48 valandų gyvų ląstelių nebuvo rasta. Taigi įpilta ekstrakto koncentracija turėjo baktericidinį efektą ir sunaikino visas testuojamos kultūros ląsteles. Rapontiko ekstraktas tokio poveikio neturėjo ir ląstelių skaičius lėtai, bet augo ir per 24 valandas padidėjo nuo $5,5 \times 10^7$ KSV/ml iki $1,7 \times 10^8$ KSV/ml. Kitai testuojamai kultūrai – *Bacillus cereus* šie ekstraktai letalinio poveikio neturėjo, sidabrinės jonažolės ekstrakto veikiamų ląstelių skaičius beveik nekito ir 48 valandas svyravo pradiniam lygyje, o paprastas rapontikas ląstelių skaičių per 48 valandas sumažino apie 10 kartų – nuo $9,7 \times 10^5$ iki $1,1 \times 10^5$. Silpniau šie ekstraktai veikė *S. typhimurium* ir *E. faecalis*. *L. monocytogenes* buvo jautri sidabrinės jonažolės ekstraktui, nes gyvų ląstelių nebuvo rasta vos tik ekstraktą įpylus.

Daugumai aromatinių ir prieskoninių augalų ekstraktų bei eterinių aliejų būdingos baktericidinės savybės. Analizuodami, ar augalų ekstraktai turi tokį poveikį ir mielėms, taikėme difuzijos į agarą metodą. Buvo tirti pipirmėtės ir raudonėlio ekstraktai, pagaminti pramoniniu būdu, taip pat buvo iširti ir minėtų augalų eterinių aliejų bandiniai su aštuoniomis mielių testavimo kultūromis. Atlikę tyrimus nustatėme, kad abu eteriniai aliejai pasižymėjo stipresnėmis fungicidinėmis savybėmis ir slopino visų testuojamų kultūrų augimą. Pipirmėtės ekstraktas buvo efektyvesnis už raudonėlio ir turėjo augimą slopinantį poveikį *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri* ir *Rhodotorula rubra* mielėms, bet neveikė *Debariomyces hansenii* ir

Trichosporon cutaneum augimo. Nė viena iš tirtų raudonėlio ekstrakto koncentracijų nesudarė slopinamųjų zonų aplink įdubas, taigi slopinamo poveikio mielėms neturėjo.

Buvo tiriamos kelių variantų salierų lapų ir šaknų ekstraktų antibakterinės savybės prieš gramneigiamas bakterijas, priskiriamas daugiausia žarnyno mikroflorai, granteigiamas lazdeles, aptinkamas aplinkoje, ir kokus. Visos jos gali būti laikomos sanitariškai reikšmingomis, o dalis ir patogeninėmis. Gauti duomenys rodo, kad ekstraktai turėjo slopinamųjų savybių didesnei daliai testuojamųjų kultūrų. Buvo tiriami kelių koncentracijų ekstraktų tirpalai, kad būtų galima spręsti apie minimalų medžiagos kiekį, dar turintį antibakterinį efektą. Tyrimų rezultatai rodo, kad skirtingai pagamintų skirtingų augalo dalių ekstraktų poveikis testuojamoms kultūroms skiriasi.

P. vulgaris buvo visiškai nejautrus salierų lapų ekstraktui ir skaidriosios zonos nesudarė net ir dirbant su 10% ekstrakto tirpalu, nepriklausomai nuo jo paruošimo būdo. Panašūs duomenys gauti ir su *C. freundii*. Tarp trijų tipų ekstraktų tik vieno iš jų maksimali koncentracija buvo efektyvi ir sudarė nedideles 13 mm skaidriąsias zonas.

Vertinant trijų variantų saliero lapų ekstraktų baktericidinio efektyvumo tyrimus galima pastebėti, kad antibakteriniu efektu išsiskiria pirmasis ekstrakto variantas, iš dešimties testuojamųjų kultūrų stipriau veikęs šešias – *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, ir *Bacillus cereus*, tarp kurių yra ir granteigiamų, ir gramneigiamų lazdelių bei koku.

Trečias ekstrakto variantas buvo aktyvesnis prieš *H. alvei* ir *L. monocytogenes*. Pastarąją testuojamą kultūrą veikė tik šis ekstrakto variantas.

Taigi galima teigti, kad visiems trims salierų lapų ekstraktams būdingos antibakterinės savybės, tačiau ekstrakcijos režimai, besiskiriantys proceso trukme ar operacijų kartotinumu, turi įtakos slopinamųjų savybių mastui ir veikimo prieš atskiras bakterijų rūšis spektrui. Visi trys ekstraktų variantai slopina koku augimą, tačiau apibendrinti poveikio lazdelėms negalima, nes atskirų rūšių granteigiamos ir gramneigiamos bakterijos pasižymi skirtingu jautrumu ekstraktų variantams.

Trijų variantų salierų šaknų ekstraktų tyrimo rezultatai rodo, kad didesnė dalis ekstraktų tirpalų palyginti su lapų ekstraktais antibakterinio poveikio neturi ir nesudaro skaidriųjų zonų aplink įdubas, bet skirtingai pagamintų ekstraktų poveikis testuojamoms kultūroms taip pat skiriasi.

P. vulgaris buvo visiškai nejautrus salierų šaknų ekstraktui ir skaidriosios zonos nesudarė net ir aplink įdubas su 10% ekstrakto tirpalu, nepriklausomai nuo jo paruošimo būdo.

Didžiausiu jautrumu salierų šaknų ekstraktams pasižymėjo *B. cereus*. Skaidriosios slopinimo zonos susidarė aplink visų trijų variantų visų tirtų koncentracijų ekstraktų tirpalus. Didžiausios skaidriosios zonos buvo aplink įdubas su pirmo varianto ekstraktų tirpalais ir siekė 30–40 mm, antro varianto ekstraktų slopinamosios zonos

buvo 23–29 mm, o trečio – 21–27 mm.

Vertindami skirtingos gamybos salierų šaknų ekstraktų veiksmingumą matome, kad visų testuojamųjų kultūrų augimo neslopino nė vienas iš jų. Plačiausio spektro antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo trečias variantas, slopinęs aštuonių iš dešimties kultūrų augimą. Antrasis variantas buvo veiksmingas šešioms testuojamoms kultūroms, priklausančioms įvairioms grupėms ir pasižymintioms gana skirtingomis charakteristikomis. Išsiskiria pirmasis ekstrakto variantas, slopinęs tik dvi lazdelių ir koku formos kultūras – *B. cereus* ir *E. faecalis*.

Apibendrinant atlikto tyrimo rezultatus galima teigti, kad salierų lapų ir šaknų ekstraktai turi antibakterinių savybių, nors ir yra bakterijų (*P. vulgaris* ir *C. freundii*), kurių parinktos koncentracijos neveikia. Kitos testuojamos kultūros tirtiems ekstraktams buvo daugiau ar mažiau jautrios.

Stipriau antibakteriškai veikė salierų lapų nei šaknų ekstraktas. Testuojamųjų kultūrų augimą slopino įvairios gamybos lapų ekstraktai, veiksmingi buvo net ir silpnesnių koncentracijų tirpalai. Galima spėti, kad salierų šaknyse veiksmingųjų medžiagų yra mažiau; gal jos sunkiau išskiriamos ar mažiau stabilios ir suyra ekstrahavimo metu.

Ekstrakcijos suskystintu anglies dioksidu metodo ypatybės taip pat veikia gautų ekstraktų savybes. Nuo gamybos būdo priklauso ir antibakterinio veikimo spektras, ir stiprumas, nes atskiri ekstraktų variantai veikia testuojamas kultūras stipriau ar silpniau arba antibakterinio poveikio visiškai neturi. Ekstraktų tirpalų koncentracija (1%, 5%, 10%) nulemia slopinamųjų zonų dydį, kai kurias kultūras veikia tik didžiausios koncentracijos tirpalai. Jei slopinamosios zonos nesudaro, galimos kelios priežastys – testuojamoji kultūra atspari tiriamam ekstraktui, per maža aktyviosios medžiagos koncentracija arba ekstrakto nėra veikliųjų medžiagų.

Stebint mikroorganizmų kiekio dinamiką kiaulienos farše su kmynų, krapų ekstraktų ir kalendros eterinio aliejaus priedais nustatyta, kad 0,1–0,5% šių medžiagų priedai nors ir nesustabdo, bet sulėtina mikroorganizmų dauginimąsi modelinėje sistemoje palyginti su kontrole – kiaulienos faršu be priedų. Po 2 valandų ląstelių skaičiaus skirtumas dar nepastebimas, tačiau po 1 ir po 2 parų kontroliniame bandinyje mikrobu išauga žymiai daugiau. Taigi nedidelė augalų ekstraktų ar eterinių aliejų koncentracija padeda stabilizuoti mikrobinį užterštumą.

Aptarimas ir išvados. Apibendrinant atliktus tyrimus galima konstatuoti, kad daugelio prieskoninių ir aromatinių augalų ekstraktai ir eteriniai aliejai pasižymi antibakterinėmis savybėmis. Mūsų gauti duomenys patvirtina literatūros šaltinių informaciją. Gautų aktyviųjų medžiagų sudėtis, kartu ir antibakterinis poveikis, priklauso nuo gamybos būdo ir naudojamų medžiagų. Antibakterinių augalų ekstraktų savybių tyrimo metodika taip pat daro įtaką tyrimo duomenims, todėl lyginant atskirus augalų ekstraktus ar eterinius aliejus tikslinga naudoti vienodas tyrimo sąlygas.

Augalų ekstraktų ir eterinių aliejų priedai kiaulienos farše padeda stabilizuoti bakterijų kiekį. Geresnių rezultatų būtų galima gauti padidinus aktyviųjų medžiagų kiekį, tačiau tai ne visada įmanoma padaryti dėl skoninių savybių.

1. Kmyną, krapų ekstraktų ir kalendros eterinio aliejaus priedai sulėtino mikroorganizmų dauginimąsi kiaulienos farše, laikomame žemoje temperatūroje.

2. Mielės ir bakterijas čiobrelių eterinis aliejus slopino labiau nei mairūnas.

3. Mielių testuojamos kultūros pasižymėjo didesniu jautrumu tirtoms eterinių aliejų koncentracijoms ir buvo atsparios tirtiems augalų ekstraktams.

4. Kokai, gramteigiamos ir gramneigiamos lazdelės buvo jautresnės salierų lapų ekstraktams. Šaknų ekstraktai jas veikė silpniau. *Bacillus cereus* augimą slopino salierų lapų ir šaknų visų variantų visos tirtos koncentracijos. *Proteus vulgaris* buvo atsparus visiems ekstraktams. *Citrobacter freundii* veikė tik vieno lapų ekstrakto varianto maksimali koncentracija.

Literatūra

1. Adegohe G.O., Iwahashi H., Komatsu Y., Obuchi K.O., Iwahashi Y. Inhibition of foods spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice *Aframomum danielli*. Flavour and Fragrance Journal. 2000. No. 15. P. 147-150.
2. Daljit S., Kaur J. Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial Agents. 1999. No. 12. P. 257-262.
3. Jeng - Lenk Mau, Chiu-Ping Chen, Pao-Chuan Hsieh. Antimicrobial Effect of Extracts from Chinese Chive, Cinamon and Corei Fructus. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. No.49. P. 183-188.
4. Stojanovic G., Palic R., Alagic S., Zekovic Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of semi - oriental tobacco, *Orija*. Flavour and Fragrance Journal. 2000. No. 15. P. 335-338.
5. Uegaki R., Ando S., Ishida M. Antioxidative activity of milk from cows fed herbs. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 2001. Nr. 75 (6) P. 669-671.
6. Толкунова Н.Н., Криштафович В. И. Бактерицидное действие композиций эфирных масел. Мясная индустрия. 2001а. № 6. С 15-18.
7. Толкунова Н.Н., Криштафович В. И. Влияние эфирных масел на развитие микроорганизмов. Мясная индустрия. 2001б. № 5. С. 24-25.

2002 05 17