

## BAKTERIJŲ IR MIELIŲ TESTAVIMO KULTŪRŲ LAŠTELIŲ JAUTRUMAS UOGŲ ETANOLINIŲ IR VANDENINIŲ EKSTRAKTŲ BEI SULČIŲ PRIEDAMS

Antanas Šarkinas<sup>1</sup>, Ina Jasutienė<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kauno technologijos universitetas, Radvilėnų pl. 19, 50015 Kaunas; el. paštas: antanas.sarkinas@ktu.lt

<sup>2</sup>KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; el. paštas: ina.jasutiene@lmai.lt

**Santrauka.** Tyrimams naudotos šešios testavimo kultūros: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) ir aštuonios mielių rūšys (*Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra*), išskirtos pieno perdirbimo įmonėse.

Skirtingų uogų ekstraktai skiriasi antocianinų bei fenolinių junginių kiekiu, bet jų antimikrobinis aktyvumas panašus. Jautriausia spanguolių, mėlynių ir juodųjų serbentų uogų bei jų išspaudų etanoliniams ekstraktams buvo *Micrococcus luteus* kultūra. Ji sudarė 23–30 mm skersmens slopinimo zonas. Kitų kultūrų jautrumas tiriamiesiems ekstraktams buvo silpnesnis. Siekiant nustatyti, ar kokybinė pigmentų sudėtis daro įtaką ekstraktų antimikrobiniam aktyvumui, mėlynių ir juodųjų serbentų ekstraktai praskiesti taip, kad antocianinų koncentracija būtų panaši į spanguolių. Taip standartizuotų ekstraktų antimikrobinis aktyvumas visų tiriamųjų kultūrų atžvilgiu susilpnėjo – slopinimo zonos sumažėjo vidutiniškai 7,23 mm. Labiausiai kito jautriausia *Micrococcus luteus* kultūra – jos slopinimo zonos sumažėjo 12,5 mm. Nepriklausomai nuo ekstraktų skiedimo, jų poveikis tirtoms mielių kultūroms buvo silpnas, susidariusių skaidrių zonų skersmuo – minimalus.

Didesniu jautrumu išsiskyrė *T. cutaneum* laštelių kultūra. Palyginus mėlynių, spanguolių ir juodųjų serbentų vandeninius bei etanolinius ekstraktus nustatyta, kad vandeniniuose ekstraktuose antocianinų koncentracija didesnė, bet etanolinių ekstraktų poveikis tirtoms testavimo kultūroms stipresnis. Juodųjų serbentų sultys efektyviai slopino *M. luteus*, *S. aureus* ir *L. monocytogenes* bakterijų kultūrų augimą. Mielės uogų vandeniniams ekstraktams ir sultims gana atsparios.

**Raktažodžiai:** uogos, ekstraktai, antimikrobinės savybės, testavimo kultūros.

## SENSITIVITY OF THE TEST CULTURES TO THE BERRY ETHANOL AND WATER EXTRACTS, AND JUICE

Antanas Šarkinas<sup>1</sup>, Ina Jasutienė<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kaunas University of Technology, Radvilėnų pl. 19, Kaunas LT-50015, Lithuania; e-mail: antanas.sarkinas@ktu.lt

<sup>2</sup>Food Institute of Kaunas University of Technology, Taikos 92, Kaunas, LT-51180, Lithuania;

e-mail: ina.jasutiene@lmai.lt

**Summary.** Undesirable in food products the yeasts and bacteria were used in the test cultures. The assessment of antimicrobial activity of the berry extracts, the following six bacterial test cultures *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), and eight yeast species (*Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra*), obtained due to inoculation of the specimens taken from dairy plants, were used in the study.

The total anthocyanins and phenolics compounds content was different in investigated extracts, however, antimicrobial action of following extracts was comparable. *Micrococcus luteus* was the most sensitive to the cranberry, black currant, bilberry extracts from berries and berry cakes. It makes inhibition zone in 23-30 mm diameter. Other test cultures demonstrate less sensitivity to the antimicrobial action of the extracts. The black currant and bilberry extracts were diluted to obtain the level of anthocyanins like in cranberry extract. Dilution reduced antimicrobial properties of extracts – diameter of inhibition zone down in 7.23 mm. Maximum alteration (12.5 mm) showed the most sensitive *Micrococcus luteus* culture. Yeast shows minimal sensitivity to the ethanol berry extracts. Only *T. cutaneum* makes bigger transparency zone. Significantly higher amounts of anthocyanins were determined in the water extracts compare to ethanol extracts from bilberry and black currant. However, water extracts of berries showed lowest effectivity. Black currant juice had inhibitory effect on *M.luteus*, *S.aureus* and *Listeria monocytogenes*. Yeast shows resistance to water extracts and juice.

**Key words:** berry, extracts, antimicrobial properties, test cultures.

**Įvadas.** Auginės kilmės medžiagos gana plačiai taikomos maisto pramonėje, vis dažniau naudojami augalų ekstraktai. Vertingų komponentų kiekis sausojoje

augalų masėje gali siekti 1–3 proc., jie ganėtinai sunkiai atskiriami nuo natūralios matricos. Distiluoiant vandens garais išskiriamos žemos virimo temperatūros medžiagos,

bet vyksta komponentų denatūracija ir kiti nenaudingi pokyčiai. Organiniai tirpikliai – acetonas, heksanas, izopropanolis, etanolis leidžia gauti vertingesnius pagal sudėtį ekstraktus, nes juose lieka daugiau medžiagų ir skonį gerinančių komponentų. Naudojant hidrofilius tirpiklius (acetoną, etanolį) gaunami ekstraktai, kuriuose daugiau kartais nepageidaujamų dažomųjų medžiagų. Hidrofobiniai tirpikliai – heksanas, dichloretanas – geriau ekstrahuoja riebalines medžiagas, bet nepaima angliavandenių ir dervų (Касьянов, 2005).

Eteriniai aliejai pasižymi daugeliu vertingų savybių, tarp jų – ir antimikrobiniumi poveikiu, nustatomu įvairiais metodais. Įvertintas keletas augalų eterinių aliejų – gvazdikėlių, eukalipto, citrinų, mėtų, pušų, rozmarino, baziliko, arbatžolių – poveikis *E. coli* keturių kolekcinių ir dviejų iš mėsos produktų išskirtų kultūrų augimui ir gyvybingumui. Tyrimai atlikti difuzijos į agarą metodu ir nustatant minimalią inhibitorinę bei baktericidinę koncentraciją. Difuzijos į agarą metodu nustatyta, kad visų kultūrų jautrumas panašus. Stipriausiu poveikiu išsiskyrė eterinis gvazdikėlių aliejus – minimali inhibitorinė ir baktericidinė koncentracija siekė 0,25 ir 0,3 ml/100ml, pakako 15–60 min poveikio (Moreira et al., 2005).

Vertinant augalų ekstraktų antimikrobines savybes nustatyta, kad gelsvių, rozmarinų, raudonėlių, peletrūnų, mairūnų, salierų, petražolių įvairių frakcijų ekstraktai slopino bakterijų augimą skystoje terpėje ir tiriant difuzijos į agarą metodu. Minėtų medžiagų poveikis jaunoms 18 h kultūroms ir išlaikytoms 5 d. kultūroms skyrėsi – pastarosios mažiau jautrios. Tas būdinga ir bakterijų sporoms. Dalis kultūrų buvo jautresnės antimikrobinėms medžiagoms žemesnėje temperatūroje, *Bacillus subtilis* sporos įvairioje temperatūroje sudarė skaidrias vienodo skersmens zonas (Šarkinas, 2005).

Vertinamos ne tik ekstraktų tirpalų, bet ir jų kompozicijų antimikrobinės savybės. Taikant difuzijos į agarą metodą, į įdubas lašinta 50 μl santykiu 1:5, 1:10, 1:20 metanolio praskiestų ekstraktų tirpalų ar jų kompozicijų. Kompozicijų slopinamasis poveikis buvo stipresnis. Tačiau slopinamos buvo ne tik patogeninės, bet ir pieno rūgšties bakterijos (Yasar et al., 2005). Bandomos ne tik ekstraktų kompozicijos, bet ir jų deriniai su cheminėmis medžiagomis. Antimikrobinės medžiagos, išskirtos iš prieskonių, jų kompozicijos su organinėmis rūgštimis ganėtinai gerai slopino *Clostridium perfringens*, kuri sukelia nemažą dalį maistinių apsinuodijimų, augimą (Pichner, 2005).

Introdukuotos ir miško uogos yra turtingos vitaminų, mikroelementų, fenolinių junginių bei antocianinų. Spalvą suteikiantys antocianinai pasižymi ir bioaktyviomis savybėmis – slopina laisvųjų radikalų susidarymą, malšina uždegimą, alergiją, veikia antikancerogeniškai, taip pat slopina kai kurių mikroorganizmų augimą. Spanguolės slopina *E. coli* ir kitus virškinimo ir urologinės sistemos patogenus. Spanguolių sulčių antocianinų ir proantocianinų frakcijai jautrūs *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 10541) ir *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), reikšmingo skirtumo tarp gramteigiamų ir

gramneigiamų bakterijų nenustatyta (Leitão et al., 2005). Suomių mokslininkai ištyrė 13 fenolinių junginių ir 29 augalų ekstraktų slopinamąjį poveikį devynių rūšių mikroorganizmams: *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* ir *Staphylococcus epidermidis* (Rauha et al., 2000). H. M. A. Cavanagh su kolegomis M. Hipwell ir J. M. Wilkinson (2003) nustatė šviežių aviečių, juodųjų serbentų, spanguolių ir gervuogių uogų bei iš jų pagamintų ekstraktų poveikį 12 rūšių bakterijoms ir *Candida albicans* mielėms: aviečių ir juodųjų serbentų ekstraktai, skiesti santykiu 1:5, slopino visas bakterijas ir mieles, visų rūšių ekstraktams buvo jautri *Mycobacterium phlei*. JAV mokslininkai tyrė mėlynių (*Vaccinium myrtillus*) antocianinų ekstrakto ir kitų fenolinių junginių ekstrakto bioaktyvumą (Cevallos-Casals, Cisneros-Zevallos, 2003). Skandinavų mokslininkai toliau tiria spanguolių, aviečių, tekšių, braškių ir mėlynių ekstraktų poveikį žarnyno bakterijoms (Puupponen-Pimiä et al., 2005<sup>a</sup>; 2005<sup>b</sup>). Uogų ekstraktų poveikiui jautriausios buvo *Staphylococcus* ir *Salmonella* bakterijos, *Listeria* buvo atspari visų uogų, išskyrus spanguolių, ekstraktų poveikiui.

Vertinant antimikrobines savybes, taikomas paprastas difuzijos į agarą metodas. Juo lengviausiai galima atrinkti aktyvius ir neefektyvius augalus bei ekstraktus. Paprastai norima nustatyti antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčių ekstraktų minimalią baktericidinę koncentraciją ir reikalingą poveikio trukmę. Yra duomenų, kad koncentracija gali siekti 0,25 ml/100ml ar 2 μg/ml. Augalų ekstraktai į maisto produktus dedami ir siekiant gauti antimikrobinį bei antioksidinį poveikį. Paveikesnės yra ekstraktų kompozicijos ar jų mišiniai su organinėmis rūgštimis. Dalis ekstraktų skatina naudingos mikrofloros augimą.

Literatūros apžvalga rodo, kad įvairių uogų ekstraktai slopina bakterijų augimą, bet informacijos apie uogų ekstraktų ir antocianinų antimikrobines savybes nėra daug. Lietuvoje augančių uogų medžiagos šiuo požiūriu visiškai netyrinėtos. Tyrimai pradėti tik pastaraisiais metais (Šarkinas ir kt., 2005).

**Tyrimų tikslas** – uogų ekstraktų antimikrobinio poveikio įvertinimas difuzijos į agarą metodu, siekiant atrinkti paveikiausius ekstraktus ir žaliavą jų gamybai.

**Medžiagos ir metodai.** Tirtos testavimo kultūros: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) ir aštuonios mielių rūšys (*Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula rubra*), išskirtos pieno perdirbimo įmonėse. Parinkti aptinkami maisto produktuose patogeniniai ir sanitarinė būklę rodantys mikroorganizmai.

Šaldytos juodųjų serbentų, spanguolių ir mėlynių uogos pirktos prekybos tinkle. Etanoliniai ekstraktai ruošti iš uogų ir uogų išspaudų, 3 g ekstrahuojant

parūgštinto etanolio (0,1N HCl) tirpalo porcijomis, iki visiškai neteko spalvos. Ekstrahuota kambario temperatūroje, gautas ekstraktas nufiltruotas ir naudotas antocianinų bei fenolinių junginių koncentracijai ir antimikrobiniam aktyvumui nustatyti. Ruošiant standartizuotus ekstraktus, mėlynių ir juodųjų serbentų ekstraktai praskiesti parūgštintu etanolio taip, kad jų optinis tankis būtų artimas spanguolių ekstrakto optiniam tankiui.

Sausieji maisto dažai iš juodųjų serbentų ekstrakto pagaminti KTU Maisto institute ir laikyti sandariame indelyje kambario temperatūroje. Jie pagaminti vandeninį juodųjų serbentų ekstraktą su maltodekstrino užpildu išdžiovinus purkštuvinėje džiovykloje „Büchi 190“.

Vandeniniai ekstraktai ruošti iš uogų išspaudų. 20 g išspaudų užpilta 100 ml 95°C temperatūros citrinų rūgštimi (0,2 proc.) parūgštinto vandens ir periodiškai pamaišant 2 h laikyta termostate 60°C temperatūroje. Gautas ekstraktas nupiltas, užpilta nauja karšto parūgštinto vandens porcija ir ekstrahuota dar 2 h. Gauti ekstraktai sumaišyti, filtruoti ir koncentruoti smėlio vonioje. Uogų sultys ir vandeniniai ekstraktai naudoti antocianinų bei fenolinių junginių koncentracijai ir antimikrobiniam aktyvumui nustatyti.

Bendras antocianinų kiekis, išreikštas cianidin-3-rutinozidu, nustatytas spektrofotometriškai (bangos ilgis  $\lambda=544$  nm). Antocianinų koncentracija apskaičiuota pagal cianidin-3-rutinozido kalibracinę grafiką (Jasutienė, 2000).

Fenolinių junginių kiekis nustatytas su *Folin-Ciocalteu* reagentu naudojant etaloninį galo rūgšties tirpalą. 5 ml 10 kartų praskiesto vandeniu *Folin-Ciocalteu* reagento sumaišyta su 1 ml tiriamojo mėginio ekstrakto ir 4 ml 7,5 proc.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalo (Singleton, Rossi, 1965). Po 30 min išmatuota absorbcija esant 765 nm bangos ilgiui. Fenolinių junginių kiekis apskaičiuotas pagal formulę:

$$C = c \times V \times m^{-1},$$

čia: C – polifenolių kiekis, išreikštas galo rūgšties ekvivalentais mg/g;

c – galo rūgšties koncentracija, nustatyta pagal kalibravimo kreivę mg/ml;

V – tiriamojo ekstrakto tūris ml;

m – ekstrakcijai paimto bandinio masė g.

Antibakterinį aktyvumą vertinant difuzijos į agarą metodu bakterijų kultūros 18 h augintos 37°C temperatūroje ant nuožulnaus agaro. Nuplauta bakterijų suspensija praskiesta pagal Mc Farland standartą Nr. 0,5, gerai sumaišyta mažąja purtykle ir atitinkamas laštelių skaičius supiltas į ištirpintą ir iki 47°C temperatūros atvėsintą agarizuotą terpę bendram bakterijų skaičiui nustatyti. Dar kartą gerai sumaišyta, kad laštelės pasiskirstytų tolygiai. Taip paruoštas bakterijų laštelių suspensijos mišinys su terpe išpilstytas po 10 ml į 90 mm skersmens stiklines Petri lėkšteles. Sustingusioje terpėje padarytos 6 įdubos (8 mm skersmens), į kurias įpilta 50  $\mu\text{l}$  tiriamojo ekstrakto.

Vertinant kultūros amžiaus įtaką laštelių jautrumui, sumaišytos su terpe kultūros 5 d. laikytos šaldytuve.

Mielėlių kultūros 1 parą augintos 25°C temperatūroje

ant nuožulnaus bulvių-gliukozės agaro. Po 1 paros užaugusios mielių kultūros nuo agaro nuplautos steriliu fiziologiniu tirpalu ir pagal Mc Farland standartą Nr. 1 paruošta laštelių suspensija supilta į ištirpintą ir atvėsintą bulvių-gliukozės agarizuotą terpę ir gerai sumaišyta. Taip paruoštas bakterijų ir mielių laštelių suspensijos mišinys su terpe išpilstytas po 10 ml į 90 mm skersmens Petri lėkšteles. Sustingusioje terpėje padarytos 6 įdubos (8 mm skersmens), į kurias pilta 50  $\mu\text{l}$  tiriamojo ekstrakto.

Antimikrobinis poveikis bakterijų kultūroms įvertintas po 24 h, o mielių kultūroms – po 24–48 h kultivavimo pagal skaidrių zonų, susidariusių aplink įdubas, skersmenį, išreikštą milimetrais. Jei aplink įdubas skaidrios zonos nesusidarė, daroma išvada, kad tirta medžiaga ar jos koncentracija tiriamai kultūrai baktericidinio poveikio nedarė.

**Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.** Skirtingų uogų ekstraktai skiriasi spalvos intensyvumu, kiekybine bei kokybine antocianinų ir fenolinių junginių sudėtimi. Skiriasi ir ekstraktų funkcinės savybės, antimikrobinis aktyvumas. Kaip matome 1 lentelėje, neskiestame spanguolių ekstrakto yra mažiausia antocianinų koncentracija, bet antimikrobinis poveikis panašus į mėlynių ir juodųjų serbentų ekstraktų antimikrobinį veikimą. Jautriausia spanguolių, mėlynių ir juodųjų serbentų uogų bei jų išspaudų etanoliniams ekstraktams buvo *Micrococcus luteus* kultūra. Ji sudarė 23–30 mm skersmens slopinimo zonas. Kitų kultūrų jautrumas tiriamiesiems ekstraktams buvo silpnesnis. Lyginant ekstraktus, pagamintus iš uogų ir uogų išspaudų, reikšmingo antimikrobinio poveikio skirtumo nebuvo. Koreliacijos su antocianinų koncentracija nenustatyta. Vadinas, antimikrobinės savybės lemia ir kiti ekstraktuose esantys biologiškai aktyvūs komponentai.

Siekiant nustatyti, ar ekstraktų kiekybinė antocianinų sudėtis daro įtaką antimikrobiniam aktyvumui, buvo tiriami standartizuoti ekstraktai. Praskiedus ekstraktus iki koncentracijų, artimų spanguolių ekstrakto koncentracijai, juodųjų serbentų ir mėlynių ekstraktų aktyvumas visų tiriamųjų kultūrų atžvilgiu susilpnėjo – slopinimo zonos sumažėjo vidutiniškai 7,23 mm. Didžiausias pokytis buvo jautriausios *Micrococcus luteus* kultūros – jos slopinimo zonos sumažėjo 12,5 mm.

Pakartojus tą patį eksperimentą su senomis kultūromis (2 lentelė), tendencijos liko tos pačios, bet skaidrių zonų skersmuo sumažėjo (*M. luteus* vidurkis mažesnis 4 mm). Vadinas, senos kultūros yra mažiau jautrios uogų ekstraktams.

Neskiesti bei standartizuoti ekstraktai veikia ir mielių kultūras (3 lentelė), bet mielės yra mažiau jautrios, o susidariusių skaidrių zonų skersmuo – minimalus, dažnai siekia tik 8–9 mm. Mažai skiriasi neskiestų ir standartizuotų ekstraktų poveikis, panašus ir senų kultūrų jautrumas. Didesniu jautrumu išsiskiria *T. cutaneum*. Paveikiausius ekstraktus išskirti sunku. Senose kultūrose *S. cerevisiae* augo retai, terpėje išliko mažiau gyvų laštelių. *R. rubra* gali augti žemoje temperatūroje, yra psichrofilinė, laikymo metu pradėjo daugintis ir užaugo visoje lėkštelėje, bet slopinimo zonas įvertinti galima.

1 lentelė. Žaliavos įtaka bakterijų antimikrobiniam poveikiui, tiriant neskiestus ir standartizuotos koncentracijos etanolinius ekstraktus

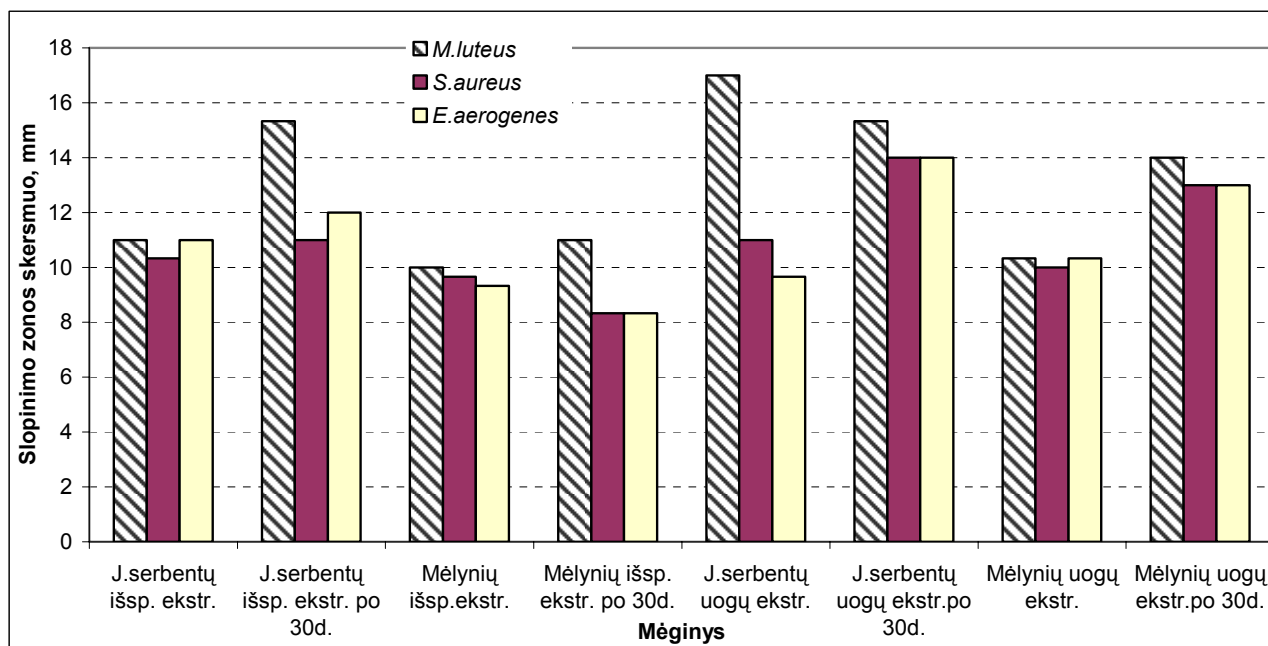
Mėginys		Slopinimo zonų skersmuo, mm				
Žaliava	Antocianinų konc., mg/l	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Neskiesti ekstraktai						
Spanguolių uogos	59,03	29,66±0,47	16,00±0,00	16,33±1,25	16,33±2,00	20,33±1,25
Mėlynių uogos	301,05	19,00±0,00	18,00±0,00	15,39±1,24	13,33±0,47	15,00±0,81
Juodųjų serbentų uogos	171,85	24,66±0,47	15,33±0,47	18,33±1,24	14,00±0,00	18,00±0,00
Spanguolių išspaudos	46,22	22,66±0,47	18,00±0,81	14,33±0,47	20,66±1,90	17,33±0,47
Mėlynių išspaudos	626,05	24,00±0,00	18,00±0,00	17,33±0,47	15,66±1,90	17,00±0,00
Juodųjų serbentų išspaudos	242,44	30,33±0,47	18,00±0,81	18,00±0,81	17,00±1,63	17,00±0,00
Standartizuoti ekstraktai						
Spanguolių uogos	56,93	25,00±0,81	19,00±0,00	15,33±1,24	15,33±2,0	18,66±2,01
Mėlynių uogos	61,55	10,33±0,47	11,00±0,81	9,33±0,47	10,33±0,47	10,00±0,81
Juodųjų serbentų uogos	55,67	17,00±0,81	12,33±0,47	13,00±0,81	9,66±0,47	11,00±0,00
Spanguolių išspaudos	49,79	26,00±0,00	16,00±0,81	14,33±0,47	15,66±1,90	18,00±0,00
Mėlynių išspaudos	61,97	10,00±0,00	11,00±0,81	10,00±0,00	9,33±0,47	9,66±0,47
Juodųjų serbentų išspaudos	61,76	10,66±0,47	12,00±1,24	11,00±0,00	10,33±0,47	10,33±0,47
Etanolis		8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00

2 lentelė. Žaliavos įtaka senų ląstelių kultūrų antimikrobiniam poveikiui, tiriant neskiestus ir standartizuotos koncentracijos etanolinius ekstraktus

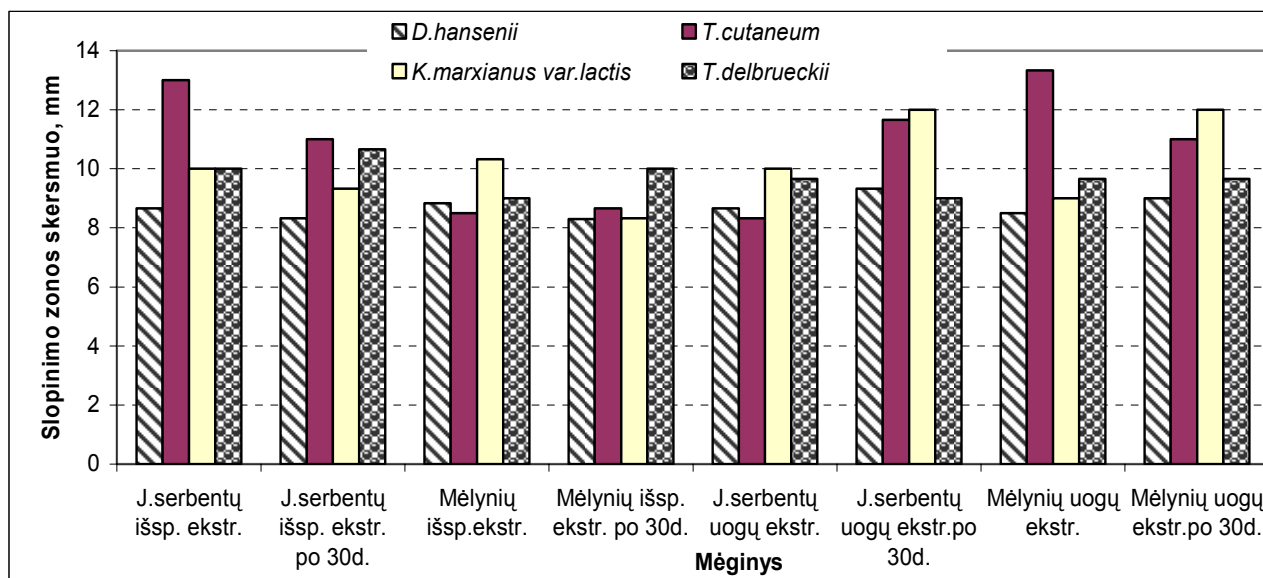
Mėginys		Slopinimo zonų skersmuo, mm				
Žaliava	Antocianinų konc., mg/l	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Neskiesti ekstraktai						
Spanguolių uogos	59,03	26,00±0,00	20,00±0,00	20,00±0,00	25,00±0,81	20,33±1,24
Mėlynių uogos	301,05	22,00±0,00	20,33±0,47	20,00±0,00	18,66±0,47	19,00±0,81
Juodųjų serbentų uogos	171,85	15,00±0,00	21,00±0,00	20,00±0,00	18,66±1,69	19,00±0,00
Spanguolių išspaudos	46,22	14,00±0,00	21,00±0,00	19,33±1,24	18,50±0,47	18,33±0,47
Mėlynių išspaudos	626,05	15,00±0,00	21,66±0,47	19,00±0,81	20,00±0,00	20,00±0,81
Juodųjų serbentų išspaudos	242,44	21,00±0,00	20,33±0,47	19,00±0,81	20,00±0,00	18,00±0,00
Standartizuoti ekstraktai						
Spanguolių uogos	56,93	27,00±0,81	20,00±0,00	20,33±0,47	24,00±0,81	19,33±1,24
Mėlynių uogos	61,55	11,00±0,00	12,33±1,25	13,00±0,00	14,00±0,81	13,33±0,47
Juodųjų serbentų uogos	55,67	12,00±0,00	16,00±0,00	13,33±0,47	15,00±0,81	13,00±0,00
Spanguolių išspaudos	49,79	15,33±0,47	21,66±1,69	16,00±0,81	19,00±0,00	21,00±0,81
Mėlynių išspaudos	61,97	10,00±0,00	12,00±0,00	10,33±0,47	13,33±0,47	9,33±0,47
Juodųjų serbentų išspaudos	61,76	11,00±0,00	14,00±0,00	13,00±0,00	10,33±0,47	12,00±0,81

3 lentelė. Žaliavos įtaka mielių ląstelių kultūrų antimikrobiniam poveikiui, tiriant neskiestus ir standartizuotas koncentracijas etanolinius ekstraktus

Žaliava ekstrakto gamybai	Slopinimo zonų skersmuo, mm							
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. kluyveri</i>	<i>P. kluyveri</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>K. marxianus var. lactis</i>	<i>T. delbrueckii</i>
Neskiesti ekstraktai								
Spanguolių uogos	11,00±0,00	9,00±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00	10,00±0,00	15,33±1,24	12,00±0,00	9,00±0,00
Mėlynių uogos	11,66±0,23	9,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	8,50±0,00	12,66±0,47	10,00±0,00	9,66±0,23
Juodųjų serbentų uogos	11,66±0,23	8,66±0,23	9,00±0,00	9,00±0,00	8,50±0,00	9,00±0,00	9,33±0,47	8,83±0,27
Spanguolių išspaudos	13,33±2,49	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	8,83±0,23	12,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00
Mėlynių išspaudos	12,33±0,47	8,66±0,23	9,33±0,81	9,33±0,81	8,27±0,23	12,00±1,63	19,00±0,81	10,66±0,47
Juodųjų serbentų išspaudos	12,00±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00	8,83±0,23	13,00±1,63	19,00±0,81	10,00±0,00
Standartizuoti ekstraktai								
Spanguolių uogos	10,00±0,00	9,50±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	13,00±0,00	10,00±0,00	9,00±0,00
Mėlynių uogos	12,66±0,23	8,50±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00	8,50±0,00	13,33±0,47	9,00±0,00	9,66±0,23
Juodųjų serbentų uogos	10,00±0,00	8,66±0,23	9,00±0,00	9,00±0,00	8,66±0,23	8,30±0,23	10,00±0,00	9,66±0,23
Spanguolių išspaudos	12,33±1,25	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	8,83±0,23	13,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00
Mėlynių išspaudos	8,66±0,23	8,50±0,00	9,66±0,23	9,66±0,23	8,83±0,23	8,50±0,00	10,33±0,47	9,00±0,00
Juodųjų serbentų išspaudos	9,66±0,23	8,50±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00	8,66±0,23	13,00±0,00	10,00±0,00	10,00±0,00



1 pav. Šviežių ir 30 d. išlaikytų etanolinių ekstraktų poveikis bakterijų kultūroms



2 pav. Šviežių ir 30 d. išlaikytų etanolinių ekstraktų poveikis mielių ląstelių kultūroms

4 lentelė. Dažų tirpalo, vandeninių ekstraktų ir sulčių antimikrobinio poveikio stiprumas bakterijų ląstelių kultūroms

Mėginys			Slopinimo zonų skersmuo, mm			
Žaliava	Fenolinių junginių konc., mg/ml	Antocianinų konc., mg/l	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. mono cytogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>
Sausųjų dažų tirpalas vandenyje, 1g/l	0,05	9,89	9,00±0,00	0,00	12,00±0,00	9,00±0,00
Mėlynių vandeninis ekstraktas	1,70	363,4	15,66±0,94	10,00±0,00	14,00±0,00	10,00±0,00
Spanguolių sultys	1,61	131,9	23,00±0,00	22,00±0,00	23,00±0,00	17,33±2,62
Juodųjų serbentų vandeninis ekstraktas	3,10	306,7	19,00±0,00	14,00±0,00	17,00±0,00	12,00±0,00
Juodųjų serbentų sultys	6,20	226,9	30,00±0,00	18,33±1,24	21,33±0,47	12,33±1,24
Spanguolių vandeninis ekstraktas	1,27	76,05	19,33±0,47	14,00±0,00	15,00±0,00	11,00±0,00
Mėlynių sultys	2,67	617,6	17,66±0,94	13,66±0,94	15,66±0,94	12,00±0,94

5 lentelė. Dažų tirpalo, vandeninių ekstraktų ir sulčių antimikrobinio poveikio stiprumas mielių ląstelių kultūroms

Mėginys		Slopinimo zonų skersmuo, mm			
Žaliava	Antocianinų konc., mg/l	<i>D. hansenii</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>K. marxianus var. lactis</i>	<i>T. delbrueckii</i>
		Sausųjų dažų tirpalas vandenyje, 1g/l	9,89	0,00	0,00
Mėlynių vandeninis ekstraktas	363,4	0,00	0,00	0,00	0,00
Spanguolių sultys	131,9	0,00	8,33±0,47	0,00	0,00
Juodųjų serbentų vandeninis ekstraktas	306,7	0,00	0,00	0,00	0,00
Juodųjų serbentų sultys	226,9	0,00	10,00±0,00	0,00	0,00
Spanguolių vandeninis ekstraktas	76,05	0,00	0,00	0,00	0,00
Mėlynių sultys	617,6	0,00	0,00	0,00	0,00

Siekiant įvertinti ekstraktų antimikrobinio efektyvumo stabilumą, buvo iširtas poveikis bakterijų ir mielių ląstelių kultūroms. Ekstraktai laikyti tamsoje 30 parų +4°C temperatūroje. Aiškia tendencija išskirti sunku: kai kurių kultūrų jautrumas atitinkamo ekstrakto poveikiui sumažėjo, kai kurių – padidėjo (1, 2 pav.). Įtakos tam gali turėti ir mikrobiologinio metodo tiksluminės charakteristikos. Kadangi skaidrių zonų diametras nedidelis, pokyčius gali nulemti ir subjektyvios priežastys, pvz., terpės paruošimas.

Palyginus mėlynių, spanguolių ir juodųjų serbentų vandeninius bei etanolinius ekstraktus nustatyta, kad vandeniniuose ekstraktuose antocianinų koncentracija didesnė, tačiau etanolinių ekstraktų poveikis tirtoms testavimo kultūroms stipresnis (1, 4 lentelė). Silpnu antimikrobinio poveikiu pasižymėjo ir sausų juodųjų serbentų ekstrakto pagrindu pagamintų maisto dažų tirpalas vandenyje. *L. monocytogenes* skaidri zona sudarė 12,00 mm. *S. aureus* buvo atsparus dažų tirpalo poveikiui. Juodųjų serbentų sultys efektyviai slopino *M. luteus*, *S. aureus* ir *L. monocytogenes* bakterijų kultūrų augimą. Vandeninių ekstraktų iš spanguolių ir juodųjų serbentų uogų išspaudų poveikis tirtoms bakterijų kultūroms nesiskyrė, o fenolinių junginių ir antocianinų kiekis juose skyrėsi ženkliai. Vadinasi, antimikrobinį aktyvumą lemia visa grupė biologiškai aktyvių junginių, esančių uogų sultyse ir ekstraktuose.

Analogiškas bandymas su mielių kultūromis parodė, kad jos uogų vandeniniams ekstraktams ir sultims gana atsparios – visi vandeniniai ekstraktai ir sultys veikė silpniau (5 lentelė).

**Aptarimas ir išvados.** Spanguolių, juodųjų serbentų, mėlynių uogų ir išspaudų antocianinų koncentracija ekstraktuose svyruoja nuo 60 iki 600 mg/l, todėl gana sunku palyginti atskirus tyrimo objektus. Standartizavus uogų ekstraktus skiedimo būdu iki 60 mg/l, slopinimo zonų skersmenys skiriasi mažiau, nors ir nekoreliuoja su antocianinų koncentracija. Suvienodinus koncentraciją vidutinis antocianinų kiekis tirpaluose sumažėjo 4 kartus, o slopinimo zonų skersmuo sumažėjo tik 1,6 karto. Senos kultūros ekstraktų veikimui atsparesnės.

Neskiestų ir standartizuotų uogų ekstraktai mieles veikia silpniau, slopinimo zonų skersmuo dažniausiai mažai viršija minimalias ribas.

Lyginant vandenines ir etanolines ekstrakto frakcijas nustatyta, kad vandeniniuose ekstraktuose antocianinų daugiau, bet jų antimikrobinis poveikis bakterijoms silpnesnis. Mielių kultūrų vandeniniai ekstraktai ir sultys neveikia. Tik *T. cutaneum* mielių ląstelių kultūra reagavo į spanguolių ir juodųjų serbentų sultis, tačiau poveikis buvo minimalus.

#### Išvados.

1. Jautriausia spanguolių, mėlynių ir juodųjų serbentų uogų bei jų išspaudų etanoliniams ekstraktams buvo *M. luteus* kultūra, kuri sudarė 23–30 mm skersmens slopinimo zonas.

2. Standartizuotų juodųjų serbentų ir mėlynių etanolinių ekstraktų antimikrobinis aktyvumas visų tiriamųjų kultūrų atžvilgiu susilpnėjo apie 1,6 karto.

3. Mielių kultūras uogų ekstraktai veikė silpnai,

susidariusių skaidrių zonų skersmuo – minimalus. Iš aštuonių tirtų mielių ląstelių kultūrų didesniu jautrumu uogų ekstraktams išsiskyrė *T. cutaneum*.

4. Palyginus mėlynių, spanguolių ir juodųjų serbentų vandeninius bei etanolinius ekstraktus nustatyta, kad vandeniniuose ekstraktuose antocianinų koncentracija didesnė, tačiau etanolinių ekstraktų poveikis tirtoms testavimo kultūroms stipresnis.

5. Uogų ekstraktų antimikrobinis poveikis nekoreliuoja su antocianinų bei fenolinių junginių koncentracija. Vadinasi, antimikrobinės savybės lemia ir kiti ekstraktuose esantys biologiškai aktyvūs komponentai.

**Padėka.** Dėkojame Valstybiniam mokslo ir studijų fondui, finansavusiam šiuos tyrimus.

#### Literatūra

1. Cavanagh H. M. A., Hipwell M., Wilkinson J. M. Antibacterial Activity of Berry Fruits Used for Culinary Purposes. *Journal of Medicinal Food*. 2003. Vol. 6. No. 1. P. 57–61.
2. Cevallos-Casals B. A., Cisneros-Zevallos L. A. A comparative study of antimicrobial, antimutagenic and antioxidant properties of phenolic compounds from purple corn and bilberry colorant extracts. *Nutraceuticals & Functional Foods*. 2003. IFT Annual Meeting – Chicago. Prieiga prie interneto [http://ift.confex.com/ift/2003/techprogram/paper\\_20319.htm](http://ift.confex.com/ift/2003/techprogram/paper_20319.htm).
3. Yasar S., Sagdic O., Kisioglu A. N. *In-vitro* antibacterial effect of single or combined plant extracts. *Journal for Food, Agriculture and Environment*. 2005. Vol. 3. No. 1. P. 39–43.
4. Jasutienė I. Raudoni natūralūs maisto dažai iš vietinių žaliavų: savybės ir technologija. Daktaro disertacija. Kaunas. 2000.
5. Leitão D. P. S., Polizello A. C. M., Ito I. Y., Spadaro A. C. C. Antibacterial Screening of Anthocyanic and Proanthocyanic Fractions from Cranberry Juice. *Journal of Medicinal Food*. 2005. Vol. 8. No. 1. P. 36–40.
6. Moreira M. R., Ponce A. G., Valle C. E., Roura S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT. Food Science and Technology*. 2005. Vol. 38, No. 5. P. 565–570.
7. Pichner R. Mikrobiologie von Fleisch und Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*. 2005. No. 3. S. 108–110.
8. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Alakom i H.L. and Oksman-Caldentey K.M. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 67. N. 1. P. 8–18.
9. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Hartmann-Schmidlin S., Kähkönen M., Heinonen M., Määttä-Riihinen K., Oksman-Caldentey K. M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 98 (4). P. 991–1111.
10. Rauha J. P., Remes S., Heinonen M. et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiol.* 2000. Vol. 56 (1). P. 3–12.
11. Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965. Vol. 16. N. 3. P. 144–158.
12. Šarkinas A. Bakterijų jautrumo antimikrobinėms medžiagoms priklausomybė nuo kultūrų fiziologinės būklės ir temperatūros. *Maisto chemija ir technologija*. 2005. T. 39, Nr. 1. P. 76–82.
13. Šarkinas A., Jasutienė I., Viškėlis P. Mėlynių, spanguolių, juodųjų serbentų antocianinų sudėtis ir antimikrobinės savybės. *Sodininkystė ir daržininkystė*. 2005. 24 (4). P. 100–111.
14. Касьянов Г. И., Латин Н. Н. До- и сверхкритическая экстракция, достоинства и недостатки. *Пищевая промышленность*. 2005. No. 1. С. 36–39.