

Małgorzata Gniewosz, Alicja Synowiec, Marta Dyrda, Agnieszka Kuczerenko¹⁾,
Jarosław L. Przybył¹⁾, Zenon Węglarz¹⁾

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNE FILMU PULLULANOWEGO WZBOGACONEGO W EKSTRAKT Z CZĄBRU GÓRSKIEGO (*SATUREJA MONTANA*)

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
i Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Nauk o Żywności
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. S. Błażejczak

¹⁾ Katedra Roślin Warzywniczych i Lecznicych Wydziału Ogrodnictwa i Architektury
Krajobrazu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. J. Gajc-Wolska

W pracy zaprezentowano badania nad przeciwbakteryjnymi właściwościami filmów pullulanowych wzbogaconymi w ekstrakt z cząbrzu górskiego. Filmy pullulanowe z dodatkiem ekstraktu z cząbrzu wykazały działanie hamujące w stosunku do dwóch testowych szczepów bakteryjnych: B. subtilis ATCC 6633 oraz Tetracoccus sp. Bakteria B. subtilis ATCC 6633 była hamowana przez powłokę pullulanową zawierającą od 300 mg s.s. ekstraktu /100 cm³ roztworu filmu pullulanowego, a Tetracoccus sp. dopiero przy 1000 mg s.s. ekstraktu /100 cm³ roztworu filmu pullulanowego.

Hasła kluczowe: filmy pullulanowe, ekstrakt z cząbrzu górskiego (*Satureja montana*), przeciwbakteryjne powłoki jadalne.

Key words: pullulan film, extract from *Satureja montana*, antibacterial edible film.

Filmy jadalne stanowią nowoczesną generację materiałów wykorzystywanych w pakowaniu żywności. Spełniają one kilka funkcji: zapewniają powolną, ale kontrolowaną wymianę gazową uwzględniającą oddychanie produktu; wybiórczą przenikalność w stosunku do pary wodnej, O₂ i CO₂, wzmacniają cechy wizualne żywności oraz pełnią rolę nośnika aktywnych substancji, działających na powierzchni produktu (Kester i Fennema 1986; Tederko 1995). Zanieczyszczenia mikrobiologiczne stanowią wciąż bardzo poważny problem ograniczający trwałość żywności, szczególnie minimalnie przetworzonej.

Pullulan – polisacharyd wytwarzany przez grzyby *Aureobasidium pullulans* posiada wszelkie cechy, które czynią go odpowiednim materiałem do tworzenia jadalnych filmów, będących nośnikami aktywnych związków. Po wysuszeniu tworzy cienkie, jadalne, nietoksyczne błony, bez smaku i zapachu. Dodatkowo wykazuje silne właściwości adhezyjne, które umożliwiają ścisłe przyleganie i pokrywanie powierzchni produktu (Yuen 1974; Roller i Dea 1992; Leathers 2003). Filmy pullulanowe wykazują dużą wytrzymałość mechaniczną, są odporne na działanie tłuszczu oraz stanowią

doskonałą barierę dla tlenu (Roller i Dea 1992; Kawahara i współpr. 2003). Film pullulanowy może stanowić także formę nośnika różnych dodatków stosowanych w produkcji żywności m.in. substancji przeciwdrobnoustrojowych, dzięki czemu jeszcze lepiej będzie spełniać rolę bariery przed szkodliwą mikroflorą. Od niedawna w kręgu zainteresowania naukowców są substancje roślinne w postaci olejków eterycznych lub ekstraktów wprowadzane do aktywnych opakowań żywności.

Seydim, Sarikus (2006) wzbogacili powłoki białkowe w olejki roślinne z oregano, rozmarynu i czosnku. Najsilniejsze działanie wykazała powłoka z dodatkiem olejku z oregano, powodując zahamowanie wzrostu *S. aureus*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7. Parnoto i współpr. (2005) osiągnęli zwiększenie działania przeciwbakteryjnego powłoki chitozanej przez dodatek olejku z czosnku. Silne zahamowanie wzrostu zaobserwowano w przypadku *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* oraz mniejsze wzrostu *E. coli* i *S. typhimurium*.

Cząber górski (*Satureja montana*) jest rośliną zielną z rodziny jasnowatych (*Lamiaceae*). W swoim składzie zawiera olejek eteryczny (0,5%), garbniki (5%), flawonoidy, śluzę, żywice, sole mineralne (głównie kobalt, miedź, żelazo, mangan). Najlepiej zostało poznane działanie olejku eterycznego cząbrę. Podstawowe składniki olejku to związki fenolowe, m.in. tymol, karwakrol i p-cymol, o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (Kim i współpr., 1995; Kalandar i współpr., 1998; Dorman i Deans, 2000; Friedman i współpr., 2002; Olasupo i współpr., 2003). Stosowanie wyciągów z cząbrę w lecznictwie powoduje poprawę procesów trawienych poprzez polepszenie perystaltyki jelit oraz wydzielania soków żołądkowych. Cząber stosowany jest głównie jako przyprawa, dzięki intensywnemu, korzennemu zapachowi (Kohlmunzer, 1993; Strzelecka i Kowalski, 2000).

Celem niniejszych badań było sprawdzenie właściwości przeciwbakteryjnych filmów pullulanowych z dodatkiem ekstraktu z cząbrę górskiego.

MATERIAŁ I METODY

Pullulan uzyskano z hodowli wglębnej szczepu *Aureobasidium pullulans* B-1 pochodzącego z Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Do hodowli grzyba i produkcji pullulanu użyto podłoża płynnego o składzie (g/L): sacharoza 60,0, K_2HPO_4 7,5, NaCl 1,5, $(NH_4)_2SO_4$ 0,72, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0,4, ekstrakt drożdżowy 0,4. Kwasowość podłoża wynosiła 6,0 i ustalana była przy użyciu 1mol/L HCl (Gniewosz i Duszkiwicz Reinhard 2008). Hodowlę grzyba prowadzono w 28°C przez 96 h na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej przy 200 rpm. Po hodowli biomasę odwirowywano, a do supernatantu dodawano 96% etanol w stosunku 1:1 (v/v) w celu wytrącenia pullulanu. Wytrącony pullulan odwirowywano na wirówce, po czym poddawano oczyszczaniu wg Roukas i Biliaderis, 1995.

Ekstrakty z ziela cząbrę górskiego (*Satureja montana*) przygotowano metodą ekstrakcji ciągłej wyczerpującej za pomocą uniwersalnego systemu ekstrakcyjnego B-811 firmy Büchi. Surowiec ekstrahowano metanolem przez 15 cykli, utrzymując temperaturę wrzenia rozpuszczalnika. Uzyskane ekstrakty surowe przesączono przez filtr bibułowy, po czym odparowano w rotacyjnej wyparce Rotovaporator R-205 firmy Chi. Zastosowano następującą temperaturę: łaźni grzejnej 60°C, skrop-

lin 40°C, a wody chłodzącej 20°C oraz podciśnienie 337 mbar. Ekstrakty surowe zagęszczono do masy równej masie surowca wziętego do ekstrakcji, w wyniku czego otrzymano tzw. ekstrakty płynne. Z ekstraktów płynnych sporządzono wodne roztwory w wodzie destylowanej.

Badaniami zostały objęte następujące szczepy bakterii: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Tetracoccus sp.*; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

Wyznaczenie najmniejszego stężenia hamującego (MIC) dla ekstraktu z cząbrku przeciw testowym bakteriom wykonywano metodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym bulionowym. Do pierwszej probówki dodano 0,4 cm³ (82,5 mg s.s./cm³) ekstraktu z cząbrku. Do każdej probówki wprowadzono 18–20 h hodowlę bakterii testowych zawierającą 10⁶ jtk/cm³. Inkubację prowadzono przez 16–20 h w temperaturze 37°C±1°C. Wynik wyrażono w mg s.s. ekstraktu z cząbrku/cm³ (Irwing i współpr., 2008).

Przygotowanie filmów pullulanowych: 5 g pullulanu rozpuszczano w 100 cm³ gorącej wody destylowanej, sterylizowano w 117°C przez 20 min. Następnie dodawano do roztworu 1–33% (m/v) ekstraktu z cząbrku, a po wymieszaniu 10 cm³ roztworu wylewano na płytki Petriego (średnica płytki 85 mm). Następnie roztwory suszono przez 8–9 godzin w temp. 25°C i przy RH 50±5%. Z uzyskanego filmu wycinano krążki o średnicy 9 mm.

Badanie aktywności przeciwbakteryjnej filmów zawierających ekstrakt z cząbrku wykonywano metodą płytkowo-dyfuzyjną. Posiewano wgłębnie 0,1 cm³ inoculum bakterii testowych (10⁶ jtk/cm³) na podłożu Mueller-Hinton. Na powierzchnię podłoża nakładano wycięte krążki filmów. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C ± 1°C przez 24 h. Po inkubacji mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu wokół krążków. Wynik podawano w mm.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli I przedstawiono MIC ekstraktu z cząbrku wobec badanych szczepów testowych. Najbardziej wrażliwą bakterią na działanie ekstraktu z cząbrku górskiego był *B. subtilis* ATCC 6633, którego wzrost został zahamowany już przy 0,65 mg s.s. ekstraktu/cm³ podłoża. Dwukrotnie większe stężenie ekstraktu z cząbrku (MIC 1,29 mg s.s./cm³) spowodowało zahamowanie wzrostu *Tetracoccus sp.* W przypadku pozostałych bakterii MIC stwierdzono dopiero przy 5,18 mg s.s. ekstraktu /cm³. Podstawowymi składnikami badanych ekstraktów były flawonoidy (7-glukozyd luteoliny) oraz kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, kofeinowy, rozmarynowy) (badania niepublikowane). Prawdopodobnie te związki wykazywały silne działanie przeciw badanym bakteriom.

Tabela I. Minimalne stężenie hamujące (MIC) ekstraktu z cząbrku górskiego przeciwko bakteriom testowym
Table I. Minimal inhibitory concentration (MIC) of winter savory extract against test bacteria

Szczep testowy bakterii	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Tetracoccus sp.</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076
MIC mg s.s. ekstraktu/cm ³	0,65	1,29	5,18	5,18	5,18

Wyznaczenie MIC ekstraktu z cząbrzu wobec badanych bakterii miało ułatwić ustalenie jego dodatku do filmu pullulanowego. Przyjęto szeroki zakres dodatku od 1 do 33 g ekstraktu w 100 cm³ roztworu pullulanu. Filmy zawierające ekstrakt z cząbrzu w zastosowanych stężeniach wykazywały silne działanie hamujące przeciw dwóm bakteriom gramdodatnim: *B. subtilis* ATCC 6633 i *Tetracoccus sp.*, tym samym które charakteryzowały się największą wrażliwością na ekstrakt (tab. II). Hamowanie wzrostu *B. subtilis* ATCC 6633 było widoczne przy zastosowaniu filmu zawierającego 3 g s.s. ekstraktu w 100 cm³ roztworu pullulanu. Do zredukowania wzrostu *Tetracoccus sp.* potrzebne było już wprowadzenie do filmu 10 g s.s. ekstraktu/100 cm³ roztworu pullulanu. W miarę zwiększania zawartości ekstraktu z cząbrzu w filmie obserwowano sukcesywny wzrost średnic stref zahamowania wzrostu bakterii.

Tab e l a II. Aktywność przeciwbakteryjna filmów pullulanowych zawierających ekstrakt metanolowy z cząbrzu górskiego

Tab l e II. Antibacterial activity of pullulan films containing methanol extract of winter savory

Zawartość ekstraktu z cząbrzu w roztworze filmu pullulanowego	(g s.s. ekstraktu/100 cm ³ roztworu)					
	1	3	5	10	15	33
mg s.s. cząbrzu / krążek filmu o średnicy 9 mm	1,1	3,4	5,6	11,2	16,8	37,0
	* średnica stref zahamowania wzrostu (mm) ± SD					
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0	1,91 ±0,20a	2,08 ±0,20a	3,83 ±0,25c	4,08 ±0,20c	8,33 ±0,51d
<i>Tetracoccus sp.</i>	0	0	0	2,08 ±0,20a	2,91 ±0,20b	8,60 ±0,54d
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	0	0	0	0	0	0

SD – odchylenie standardowe; * wielkość średnicy stref zahamowania wzrostu po odjęciu średnicy krążka (9 mm); 0 – brak strefy zahamowania wzrostu

W przypadku *S. aureus* ATCC 25923 oraz dwóch szczepów gramujemnych *E. coli* ATCC 25922 i *S. enteritidis* ATCC 13076 zahamowanie wzrostu nie było widoczne, nawet przy największym dodatku ekstraktu w filmie wynoszącym 33 g s.s./100 cm³. Być może był on za mały do wywołania efektu hamującego, jednakże powyżej tej wartości ekstraktu w roztworze pullulanu uzyskanie filmu nie było możliwe.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie w filmie ekstraktu z cząbrzu może mieć potencjalne zastosowanie w opakownictwie żywności, zwłaszcza przeciwko zanieczyszczeniom wywołanym saprofitycznymi bakteriami gramdodatnimi.

W miarę dalszego zwiększania ilości ekstraktu w filmie obserwowano stopniowy wzrost ich właściwości przeciwbakteryjnych.

M. Gniewosz, A. Synowiec, M. Dyrda, A. Kuczerenko,
J.L. Przybył, Z. Węglarz

RESEARCH ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PULLULAN FILMS ENRICHED WITH
WINTER SAVORY (SATUREJA MONTANA) EXTRACT.

Summary

The present work examines antibacterial properties of pullulan films enriched with winter savory (*Satureja montana*) extract. The pullulan films which were enriched with winter savory extract have shown inhibiting activity against two of the tested bacterial strains i.e. *B. subtilis* ATCC 6633 and *Tetracoccus sp.* The bacteria *B. subtilis* ATCC 6633 was inhibited by a pullulan coating containing over 300 mg of the extract in 100 cm³ of pullulan film solution, and the *Tetracoccus sp.* by a coating containing over 1000 mg of the extract in 100 cm³ of pullulan film solution.

PIŚMIENNICTWO

1. Kester J.J., Fennema O.R.: Edible films and coatings: a review. *Food Technology*. 1986; 47-59. – 2. Tederko A.: Jadalne opakowania żywności. *Przemysł Spożywczy*. 1995; 343-345. – 3. Yuen S.: Pullulan and its applications. *Process Biochemistry*. 1995; 9: 7-9. – 4. Roller S., Dea I.C.M.: Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1992; 12: 261-277. – 5. Leathers T.D.: Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003. 2003; 62: 468-473. – 6. Kawahara M., Mizutani K., Suzuki S., Kitamura S., Fukada H., Yui T., Ogawa K.: Dependence of the mechanical properties of a pullulan film on the preparation temperature. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*; 2003; 67(4), 893-895. – 7. Seydim A.C., Sarikus G.: Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 2006; 39: 639-644. – 8. Pranoto Y., Rakshit S.K., Salokhe V.M.: Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2005; 38 (8): 859-865. – 9. Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston III J.F., Wei C.I.: Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, 1995; 60(6): 1364-1368. – 10. Helander I.M., Alakomi H-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Morris L.G.M., von Wright A.: Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998; (46): 3590-3595.
11. Dorman H.J.D., Deans S.G.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 2000; (88): 308-316. – 12. Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E.: Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 2002; 65(10): 1545-1560. – 13. Olasupo N.A., Fitzgerald D.J., Gasson M.J., Narbad A.: Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36: 448-451. – 14. Köhlmunzer S.: Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa, 1993; wyd. IV, 120-121, 131, 154, 425, 444. – 15. Strzelecka H., Kowalski J.: Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 2000; 54-55, 104-105, 517-518. – 16. Gniewosz M., Duszkiewicz-Reinhard: Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain A.p.-3. *Carbohydrate Polymers*, 2008; 72: 431-438. – 17. Roukas T. and Biliaderis: Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Biochem. Biotechnol*, 1995; 55: 27-44 – 18. Irving W., Boswell T., Ala'Aldeen D.: Mikrobiologia medyczna. Szewczyk E.M. PWN Warszawa 2008; 254-255.