



Original Contribution

АНТИМИКРОБНАТА АКТИВНОСТ НА ЕКСТРАКТИ ОТ ПОДПРАВЪЧНИ СМЕСИ

Красимира Добрева¹, Снежана Бойчева¹, Велизар Гочев², Албена Стоянова³

¹Тракийски университет – Стара Загора, Технически колеж – Ямбол;

²ПУ „П. Хилендарски” – Пловдив;

³Университет по хранителни технологии – Пловдив.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of ethanol extracts of black pepper, cumin and coriander mixed was carried out by disk diffusion and serial dilutions methods. The extracts obtained in the optimal technological parameters, were found to be highly antimicrobial active against Gram-positive then Gram-negative bacteria.

ВЪВЕДЕНИЕ

Днес, наблюдаваме повишен интерес към намиране на нови, натурални антимикробни агенти. Приоритетно място в тези търсения заемат подправките с антимикробни свойства. В резултат на вторичен метаболизъм растенията биосинтезират редица вещества етерични масла, алкалоиди, флавоноиди, танини, гликозиди и други съединения, с които се обясняват антимикробните свойства на растенията и продуктите, получени от тях [5, 6, 7, 8, 11, 24, 25, 26].

Антимикробната активност на подправките и действието им в хранителните продукти се определя от няколко основни фактора: вид, състав и количеството на подправката; вид на микроорганизмите и степен на осемененост; състав на хранителната среда; условия на технологичния процес и съхранението на хранителните продукти [26].

Едни от най-популярните подправки в света са плодовете от черен пипер, кимион и кориандър, които се използват самостоятелно, под формата на смеси и

различни ароматични продукти - етерични масла, конкрети, резиноиди (олеорезини), абсолюта, тинктури и др.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Използвани са плодове черен пипер (*Piper nigrum* L.) с произход Бразилия; кимион (*Cuminum cyminum* L.) с произход Сирия и дребноплоден кориандър (*Coriandrum sativum* L.), местна популация от землището на гр. Ямбол.

Технологичните изследвания са проведени в лабораторни условия. Преди обработката плодовете са смилани на лабораторна мелница, като големината на фракциите е определена чрез ситов анализ. За получаване на екстрактите е използван етилов алкохол с две концентрации 70 % и 96 %, които най-често се прилагат като разтворители за екстракти от подправки с приложение в ХВП.

Екстракцията е проведена като периодичен, стационарен процес при два хидромодула - 1:8 и 1:10. Изборът на разтворител и стойностите на изследваните технологични параметри е по литературни данни и предварителни наши изследвания [3,4].

Предмет на експерименталната работа е определяне на антимикробната активност на екстракти от смес на плодове от черен пипер: кимион = 1:1 и черен

*Correspondence to: Красимира Добрева - Технически колеж Ямбол, Тракийски университет – Стара Загора, тел/факс (046) 66 91 83, e-mail: krdobрева@mail.bg

пипер:кимион:кориандр = 1,5:1:0,5, които са едни от често използваните в ХВП.

*Тест микроорганизми: Изследвани са тест-култури, които са най-често срещаната микрофлора по хранителните продукти. Една част от тях са изолирани от месни продукти от търговската мрежа, съгласно стандартни методи на ISO [2,12], а референтните тест-култури са получени от НБПМКК (Национална Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни

Култури), София (табл. 1). Идентификацията на изолираните хигиенно-индикаторни и патогенни микроорганизми е осъществена чрез прилагане на 29 биохимични теста [1]. Всички използвани тест-микроорганизми са депозираны в микробната културална колекция на катедра „Биохимия и микробиология” при Биологическия Факултет на ПУ „П. Хилендарски”, Пловдив.

Таблица 1. Използвани тест-микроорганизми.

Микробен вид	Източник	Метод за изолиране
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	НБПМКК	-
<i>Citrobacter diversus</i>	Варено-пушена наденица	18,19
<i>Escherichia coli</i>	Варено-пушена наденица	16, 17
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	НБПМКК	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	Кайма	18, 19
<i>Proteus vulgaris</i>	Кайма	16, 17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Варено-пушена наденица	15
<i>Salmonella abony</i>	Кайма	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	НБПМКК	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Варено-пушена наденица	14

* Получаване на посевна култура: Две-три колонии от 24 h култури на съответния бактериален тест-микроорганизъм, развит на полегат агар, са инокулирани на 2 cm³ месо-пептонен бульон (МПБ). Епруветките с течна среда са култивирани в термостат при 37 °C за 18 - 20 h до достигане на мътност, визуално отговаряща на стандарт 0,5 на McFarland (1,0/1,5.10⁸ cfu/cm³). При необходимост, посевната култура е разреждана със стерилен МПБ, до достигане на желаня титър клетки.

* Дисков Агар Дифузионен Тест (ДАДТ): Проведен е по метода, описан от Sacchetti и съавт. [23], съгласно препоръките на National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [21]. В стандартно петриево блюдо са разляти по 15 cm³ месопептонен агар (МПА). Втвърдената и подсушена среда е инокулирана със 100 µL инокулат. Стерилни хартиени дискове (d=5 mm) са поставени върху инокулираната среда, импрегнирани с 20 µL 1% (w/v) разтвор от изследваната проба в диетилсульфоксид (ДМСО). Пробите са култивирани в термостат при 37 °C за 24 h. Диаметърът на образуваните инхибиторни зони (IZ) е

средноаритметична стойност от три паралелни експеримента.

* Метод на Серийните Разреждания (МСР): Проведен е съгласно методиките на Hili и съавт. [10], Franz и съавт. [9] и Pauli [22] в съответствие с препоръките на NCCLS [20]. Изходният разтвор за серийните разреждания е получен чрез разтваряне на определено количество от пробата в ДМСО. Изследвани са концентрации на екстрактите в диапазон от 3,2 до 0,01 %. Получените серийни разреждания са инокулирани със 100 µL инокулат. Пробите са инкубирани при 37 °C за 24 h. Измерена е светлинната абсорбция при 600 nm, срещу контролни проби от инокулирана среда без екстракт и без ДМСО и среда само с ДМСО без екстракт, за да се елиминира евентуално инхибиращо действие, дължащо се на разтворителите. Използвани са концентрации на ДМСО, за които е известно, че не проявяват инхибиторно действие спрямо микроорганизмите. Минималната инхибиторна концентрация (МИС) е определена, като най-ниската концентрация на изследваната проба, предизвикваща над 90 % понижение на светлинната абсорбция на контролата.

За определяне на минималната

бактерицидна концентрация (МВС), по 100 µL от всяка степен на разреждане са инокулирани върху петриеви блюда с МПА и са култивирани при условията, посочени в Метод на Серийните Разреждания. След края на култивирането е определен броят на колонииите прораснали във всяко петриево блюдо.

МВС е дефинирана, като най-ниската концентрация на изследваната проба, унищожила над 99,9 % от клетките в изходния нетретиран инокулат.

Всички опити в настоящата работа са проведени в трикратна повторяемост. Данните в таблиците са средно аритметични със съответната им грешка, изчислена вариационно-статистически.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНИЯ

Таблица 2. Антимикробна активност на екстракти от смеси на плодове от черен пипер, кимион и кориандър.

Тест-микроорганизми	Екстракт 1		Екстракт 2	
	IZ, mm	МВС*, %	IZ, mm	МВС, %
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	11,3 ± 0,58	0,4	11,7 ± 0,58	0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,7 ± 1,15	0,4	12,3 ± 1,53	0,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	12,7 ± 0,58	0,4	12,7 ± 0,58	0,4
<i>Citrobacter diversus</i>	8,3 ± 0,58	0,8	7,7 ± 0,58	0,8
<i>Escherichia coli</i>	8,0 ± 0,66	0,8	8,3 ± 0,58	0,8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	8,3 ± 0,58	0,8	7,7 ± 0,58	0,8
<i>Pantoea aglomerans</i>	7,3 ± 0,58	0,8	7,7 ± 0,58	0,8
<i>Proteus vulgaris</i>	8,7 ± 0,53	0,8	8,3 ± 0,58	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,3 ± 0,58	0,8	6,7 ± 0,58	0,8
<i>Salmonella abony</i>	7,3 ± 0,58	0,8	7,3 ± 0,50	0,8

* За всички изследвани случаи MIC съвпада МВС

От данните се вижда, че и двата екстракта проявяват антимикробна активност спрямо всички изследвани тест-микроорганизми. Gram-положителните бактерии са по-чувствителни спрямо изследваните екстракти (зони на инхибиране между 11,3 до 12,7 mm), като минималната бактерицидна концентрация е 0,4 %. Изследваните Gram-отрицателни бактерии са по-малко чувствителни (зони на инхибиране между 6,3 до 8,7 mm) с минимална бактерицидна концентрация 0,8 %. Това, се дължи на разликата в строежа и състава на клетъчната стена на двете групи бактерии. Наличието на външна мембрана при Gram-отрицателните бактерии затруднява дифузията на екстрактите през

На ароматичните продукти, при които се получава най-висок добив и съдържание на биологично-активни вещества, е определена антимикробната активност:

* екстракт 1, получен от смес на плодове от черен пипер:кимион = 1:1, екстрахирани със 70 % етилов алкохол при температура 60 °C, продължителност на процеса 6 h и хидромодул 1:8.

* екстракт 2, получен от смес на плодове от черен пипер:кимион:кориандър = 1,5:1,0:0,5, екстрахирани със 70 % етилов алкохол при температура 60 °C, продължителност на процеса 6 h и хидромодул 1:10.

Резултатите от определяне на антимикробния ефект на изследваните екстракти са представени в табл. 2.

мембраната към протоплазмата на клетката, което ги прави по-устойчиви под действието на изследваните екстракти.

Получените резултати за различната устойчивост на Gram-положителните и Gram-отрицателните бактерии спрямо инхибитори на микробния растеж съвпадат с литературните данни за ароматични продукти от изследваните подправки.

Установените малки разлики в зоните на инхибиране за един и същ тест-микроорганизъм при двата екстракта се обясняват с варирането в съдържанието на етеричното масло и съдържащите се в него ароматични вещества, както и с наличието на дъбилни вещества, които също по литературни данни са с доказано

антибактериално действие.

ИЗВОД

Екстрактите, получени при преработката на смес от плодове на черен пипер, кимион и кориандър проявяват по-изявена антимикуробна активност спрямо изследваните Gram-положителни бактерии - *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 в сравнение с Gram-отрицателните бактерии - *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pantoea agglomerans*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella abony*

ЛИТЕРАТУРА

1. Гирова Т., В. Гочев - Ръководство по микробиологичен контрол на храни, КСИ, Пловдив, 2007.
2. Гирова Т., В. Гочев - Микробиологичен мониторинг на месни продукти от търговската мрежа на град Пловдив за периода 2003 - 2006 г.,
3. Добрева К. - Проучване върху добива на олеорезини от смеси на подправки. 1. Плодове от черен пипер (*Piper nigrum* L.) и кимион (*Cuminum cyminum* L.), Юбилейна научна сесия "100 години научно-изследователска работа с етерично-маслените и лечебни култури в България", 1 - 2 юни, Казанлък, 2007, 129 - 135.
4. Добрева К. - Проучване върху добива на екстракти от смеси на подправки. 2. Плодове от черен пипер (*Piper nigrum* L.), кимион (*Cuminum cyminum* L.) и кориандър (*Coriandrum sativum* L.), Научни трудове УХТ, т. 54, 2007, св. 1, 309 - 314.
5. Николаевский В., А. Ерменко, И. Иванов - Биологическая активность эфирных масел, Москва, Изд. "Медицина", 1987.
6. Стоянова А., М. Димитрова, М. Хаджикинова, О. Беров, Б. Захариева, А. Конакчиев - Антимикуробна активност на ароматични продукти. 9. Етерични масла от кориандър (*Coriandrum sativum* L.), Научни трудове АУ, т. 46, 2001, кн. 4, 291 - 294.
7. De M., A. De Krishna, A. Banerjee - Antimicrobial screening of some Indian spices, *Phytother Research*, v. 13, 1999, № 7, 616 - 618.
8. Ertürk Ö. - Antibacterial and antifungal

activity of ethanolic extracts from eleven spice plants, *Biologia*, v. 61, 2006, № 3, 275 - 278.

9. Franz C., A. Mathe, G. Buchbauer (editors) - Essential oils: Basic and Applied research, Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1996, 33 -36.

10. Hili P., C. Evans, R. Veness - Antimicrobial action of essential oils: effect of DMSO on the activity of cinnamon oil, *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 24, 1997, 269-275.

11. Iacobellis N., P. Cantore, F. Capasso, F. Senatore - Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, 2005, № 1, 57 - 61.

12. ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C.

13. ISO 6579:2002 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

14. ISO 6888-1/Amd 1:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

15. ISO 13720:1995 - Meat and meat products - Enumeration of *Pseudomonas* spp.

16. ISO 16649-1:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

17. ISO 16649-2:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

18. ISO 21528-1:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment.

19. ISO 21528-2:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method.

20. National Committee Clinical Laboratory

Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 1990, NCCLS Publication M7-A2, Villanova, PA, USA.

21. National Committee Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test. Approved Standard, 1999, NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA.

22. Pauli A. - Anticandidial low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils, Medicinal Research Reviews, v. 26 2006, № 2, 223 - 268.

23. Sacchetti G., S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R.

Bruni - Evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, Food Chemistry, v. 91, 2005, 621-632.

24. Shetty R., R. Singhal, P. Kulkarni - Antimicrobial Properties of Cumin, World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.10, 1994, № 2, 232 – 233.

25. Souza E., T. Stamford, E. Lima, V. Trajano, J. Filho - Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems, Brazilian Archives of Biology and Technology, v .48, 2005, № 4, 549 - 558.

26. Zaika L. – Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination, Journal of Food Safety, v. 9, 1988, 97 - 118.