

ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA KOŘENÍ ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SPICES

Olga Cwíková, Tomáš Gregor, Viera Šottníková, Hana Mašková

ABSTRACT

There has been a constant and increasing search for alternative and efficient compounds for food conservation, aiming at partial or total replacement of antimicrobial chemical additives. Spices offer a promising alternative for food safety. The aim of this work was to test the antimicrobial activity of selected spices. The antimicrobial activity of clove, black pepper, crushed red pepper and garlic was investigated. Inhibitory effect of these spices was tested against three strains of microorganisms – coliform bacteria, Enterococci and yeast. The disc diffusion method was used to determine the antimicrobial activity of spices. After culture of microorganisms the inhibitory zones around all discs were measured. Clove was found to be the most ($P < 0.01$) effective spice against yeast and *Enterococcus*. Garlic had the strongest ($P < 0.01$) antimicrobial activity against coliform bacteria. Black pepper and crushed red pepper were found to be less ($P < 0.01$) effective against the tested strains of microorganisms.

Key words: antimicrobial activity, microorganisms, spices

ÚVOD

Antimikrobiální vlastnosti koření jsou známy a využívány po staletí, jejich výzkum však začal až v osmdesátých letech devatenáctého století. Nejdříve byly antimikrobiální účinky prokázány u hořčice, hřebíčku a skořice (**Hirasa, Takemasa, 1998**). Hlavní antimikrobiální složkou koření jsou silice, jejichž účinek závisí na druhu a koncentraci (**Ceylan, Fung, 2004**). Většina antimikrobiálních složek koření jsou fenolové sloučeniny obsahující OH-skupinu. Bylo zjištěno, že právě OH-skupina odpovídá za antimikrobiální vlastnosti koření. V současné době je známo asi 3000 nejrůznějších druhů silic, z nichž 300 je využíváno ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu (**Bakkali et al., 2008**). Jednotlivé druhy koření obsahují různé množství esenciálních olejů. V rozmarýnu činí celkový obsah všech silic 0,15 %, kdežto u hřebíčku je to až 19,94 %. Největší antimikrobiální účinek mají esenciální oleje obsahující eugenol, např. hřebíček (obsah silice je 19,81 %), nové koření (9,33 %) a skořice (5,38 %). Skořice obsahuje navíc velké množství skořicového aldehydu (5,37 %) (**Outtara et al., 1997**). Mezi důležité antimikrobiální složky koření patří také allicin v česneku, karvakrol a thymol v oregánu a tymiánu a linalool v koriandru (**Singh et al., 2006**).

Hlavními faktory, které ovlivňují antimikrobiální aktivitu koření, je druh, složení a použité množství koření, druh mikroorganismu, složení potravy (obsah bílkovin, lipidů, soli, fenolických látek, hodnota pH) a teplota prostředí (**Agaoglu et al., 2007**). Antimikrobiální účinek vykazuje koření vůči bakteriím, plísním i virům, přičemž rezistence jednotlivých mikroorganismů je rozdílná, bakterie jsou v porovnání s plísněmi odolnější. Vyšší citlivost na silice koření vykazují Gram-negativní bakterie (**Pasqua et al., 2005**). Nejsilnější antimikrobiální aktivita byla popsána u skořice, hřebíčku a hořčice, střední u nového koření, bobkového listu, koriandru, kmínu, oregána, rozmarýnu, šalvěje a tymiánu, slabá u černého pepře, zázvoru a červené papriky (**Ceylan, Fung, 2004**).

Cílem práce bylo ověřit antimikrobiální aktivitu vybraných druhů koření na růst indikátorových mikroorganismů s ohledem na jejich možné použití v potravinářském průmyslu k prodloužení trvanlivosti potravin.

MATERIÁL A METODY

V pokusu byly použity čtyři druhy běžně používaného koření, které bylo zakoupeno v obchodní síti:

- česnek (*Allium sativum*)
- hřebíček (*Eugenia caryophyllata*)
- paprika pálivá (*Capsicum anuum*)
- pepř černý mletý (*Piper nigrum*)

Pro testování antimikrobiální aktivity těchto druhů koření byly vybrány tři skupiny mikroorganismů:

- koliformní bakterie
- enterokoky
- kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

Enterokoky byly izolovány z fermentovaných masných výrobků, koliformní mikroorganismy z vepřového masa. V případě kvasinky se jednalo o kulturní kmen *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis, Chorvatsko).

Testování antimikrobiální aktivity koření bylo provedeno v laboratořích ÚTP MZLU v Brně.

Příprava ethanolového macerátu

10 g koření bylo zalito 160 ml 96 % ethanolu a tato směs byla macerována 5 dní při teplotě 23 °C bez přístupu světla. Získané maceráty byly přefiltrovány přes filtrační papír (No. 390) a odpařeny na vakuové rotační odparce (RV 05-ST, Německo) při 40 °C.

Ke každému do sucha odpařenému ethanolickému extraktu bylo přidáno 50 ml směsi chloroform/destilovaná voda v poměru 1:1. Po důkladném protřepání došlo v dělicí nálevce k rozdělení směsi na vrstvu vodní a chloroformovou. K vodní vrstvě bylo přidáno 50 ml ethylacetátu. Poté byla tato směs opět důkladně promíchána a v dělicí nálevce rozdělena na podíl vodního acetátu a podíl ethylacetátový. Oba podíly byly odpařeny na vakuové rotační odparce při 40°C.

K chloroformové fázi bylo po odpaření přidáno 50 ml směsi ethanol/petrolether v poměru 1:1 a 25 ml destilované vody. Po protřepání a oddělení fází byly získány další dva podíly: ethanolový a petroletherový, které byly odpařeny na vakuové rotační odparce při 40°C. Od každého druhu koření byly takto získány čtyři podíly: podíl vodního acetátu, ethylacetátový, methanolový a petroletherový podíl. Tyto podíly byly postupně rozpuštěny v 5, 10 a 20 ml ethanolu (Gregor, 1999).

Příprava suspenze testovaných skupin mikroorganismů

Mikrobiální kultury koliformních bakterií a enterokoků a kvasinek byly izolačně přeočkovány a poté pomnoženy za vhodných podmínek v peptonové vodě (koliformní bakterie a enterokoky při 37 °C/24 hod, kvasinky při 30 °C/24 hod. Získané suspenze byly naředěny sterilním fyziologickým roztokem na hustotu, která odpovídala standardu 0,5 dle Mc Farlandovy zákalové stupnice (tj. 1 - 3 x 10⁸ buněk/ml). Touto suspenzí (objem inokula: 0,1 ml) byl naočkován agar, vhodný pro růst daného mikroorganismu. Pro růst koliformních bakterií byl použit VRBL agar (Noack, Francie), pro enterokoky Compass enterococcus agar (Noack, Francie), pro kvasinky Plate Count Agar (Noack, Francie). Na takto připravený agar byly položeny sterilní disky filtračního papíru (No.388) o průměru 0,9 mm napuštěné 10-ti µl příslušného roztoku macerátu koření rozpuštěného v 5, 10 a 20 ml ethanolu, kontrolní disk byl napuštěn 10-ti µl 96% ethanolu. Kultivace naočkovaných misek proběhla za podmínek stanovených ČSN ISO 4832 a ČSN ISO 4833. Enterokoky byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Stanovení inhibičního účinku

Pro stanovení inhibičního účinku koření byla použita disková difúzní metoda (Ryšková et al., 1997, Podstatová, 2001). Po kultivaci byly měřeny inhibiční zóny (mm) vzniklé v okolí disků.

Statistické vyhodnocení

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat 5.5. Byla použita metoda třífaktorové analýzy variance a analýzy rozptylu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Inhibiční účinek koření na koliformní bakterie

Česnek vykazoval vyšší ($P < 0,01$) inhibiční účinek na koliformní bakterie než paprika a pepř. mezi ostatními druhy koření statisticky průkazný rozdíl v antimikrobiální aktivitě vůči koliformním bakteriím zjištěn nebyl. Inhibiční zóna okolo disku napuštěného pouze ethanolem zjištěna nebyla. Naměřené hodnoty velikosti inhibičních zón jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1 Velikost inhibičních zón v mm vzniklých kolem disků napuštěných extrakty koření o různých koncentracích, testovací mikroorganismus: koliformní bakterie

Množství etanolu (ml) na rozpuštění macerátu	Příslušný podíl extraktu	Druh koření, velikost inhibiční zóny v mm			
		Pepř černý	Červená paprika	Hřebíček	Česnek
5	Vodní	1	1	3	3
	Ethylacetátový	1	2	2	3
	Ethanolový	3	1	3	3
	Petroetherový	1	2	2	3
10	Vodní	1	1	2	1
	Ethylacetátový	0	1	2	2
	Ethanolový	1	0	1	1
	Petroetherový	1	2	1	2
20	Vodní	0	0	1	1
	Ethylacetátový	0	0	0	2
	Ethanolový	1	0	1	1
	Petroetherový	0	1	0	2

Antimikrobiální aktivitu česneku vůči koliformním bakteriím, resp. *E. coli* O157 : H7, sledovali Leuschner a Zampariny (2002), kteří zjistili, že přídatek 1 % česneku do majonézy má bakteriostatický a baktericidní efekt. Inhibiční účinek česneku na *E. coli* O157 : H7 testovali také Indu et al. (2006). Jejich studie potvrzují, že česnek má vysokou antimikrobiální aktivitu vůči tomuto druhu mikroorganismu. Nositelem inhibičního účinku česneku je allicin. Hlavní složky česneku, diallyl sulfid a diallyl polysulfid, nevykazují podle Hirasa a Takemasa (1998) žádnou antimikrobiální aktivitu.

Inhibiční účinek koření na enterokoky

Hřebíček má ve srovnání s červenou paprikou vyšší ($P < 0,01$) inhibiční účinek na enterokoky. Mezi ostatními druhy koření statisticky průkazný rozdíl v antimikrobiální aktivitě vůči enterokokům zjištěn nebyl. Inhibiční zóna okolo disku napuštěného pouze ethanolem zjištěna nebyla. Naměřené hodnoty velikostí inhibičních zón jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Antimikrobiální účinek hřebíčku a červené papriky na enterokoky, resp. *Enterococcus faecium*, testovali Agaoglu et al. (2007), kteří zjistili, že hřebíček vykazuje dobrý inhibiční efekt na tento druh mikroorganismu, zatímco červená paprika neměla žádný antimikrobiální

účinek.. **Marcinčák et al. (2008)** testovali antioxidační a antimikrobiální účinek extraktů rostlin přidaných do hovězího masa. Nejvýraznější inhibiční účinek na celkový počet mikroorganismů byl zaznamenán při použití extraktu hřebíčku.

Tabulka 2 Velikost inhibičních zón v mm vzniklých kolem disků napuštěných extrakty koření o různých koncentracích, testovací mikroorganismus: enterokoky

Množství etanolu (ml) na rozpuštění macerátu	Příslušný podíl extraktu	Druh koření, velikost inhibiční zóny v mm			
		Pepř černý	Červená paprika	Hřebíček	Česnek
5	Vodní	3	2	4	3
	Ethylacetátový	3	2	4	2
	Ethanolový	2	3	3	5
	Petroetherový	1	2	5	3
10	Vodní	2	1	3	1
	Ethylacetátový	2,5	2	2	2
	Ethanolový	1	1	2,5	4
	Petroetherový	1	0	3	2
20	Vodní	1,5	0	2,5	1
	Ethylacetátový	1	0	1	1
	Ethanolový	1	1	1	3
	Petroetherový	0	0	1	1

Inhibiční účinek koření na kvasinky

Hřebíček má na kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* vyšší ($P < 0,01$) inhibiční efekt než červená paprika a pepř. Mezi ostatními druhy koření statisticky průkazný rozdíl v antimikrobiální aktivitě vůči *Saccharomyces cerevisiae* zjištěn nebyl. Inhibiční zóna okolo disku napuštěného pouze ethanolom zjištěna nebyla. Naměřené hodnoty velikostí inhibičních zón jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Námi zjištěné výsledky korespondují s výsledky **Arora a Kaur (1999)**, kteří testovali citlivost kvasinek k extraktům různých druhů koření. Zjistili, že právě extrakt hřebíčku je schopný inhibovat růst některých kvasinek rodu *Candida* a také *Saccharomyces cerevisiae* (**Souza et al., 2005**). Určitou antifungální aktivitu pepře černého vůči *A. niger* a *C. albicans* uvádí ve své studii **Ertürk (2006)**. Dobrý antimikrobiální účinek vůči kvasinkám a plísním. vykazují podle **Ceylan, Fung (2004)** i extrakty česneku, které inhibují růst kvasinek rodů *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodototula*, *Torulopsis* a *Trichosporon*. Antifungální aktivita česneku se však výrazně snižuje s rostoucím časem a zvyšující se teplotou (37°C a vyšší; **Ceylan, Fung, 2004**).

Tabulka 3 Velikost inhibičních zón v mm vzniklých kolem disků napuštěných extrakty koření o různých koncentracích, testovací mikroorganismus: *Saccharomyces cerevisiae*

Množství etanolu (ml) na rozpuštění macerátu	Příslušný podíl extraktu	Druh koření, velikost inhibiční zóny v mm			
		Pepř černý	Červená paprika	Hřebíček	Česnek
5	Vodní	2	2	6	1
	Ethylacetátový	2	1	4	3
	Ethanolový	1	3	3	4
	Petroetherový	2	1	2	2
10	Vodní	1	0	3,5	0,5
	Ethylacetátový	1	2	2	2
	Ethanolový	0,5	2	2	3
	Petroetherový	1	1	1	1
20	Vodní	0	0	2,5	0,5
	Ethylacetátový	0	1	1	0
	Ethanolový	0	0	1	2
	Petroetherový	1	0	1	1

ZÁVĚR

V současné době je prováděna celá řada výzkumů, které jsou zaměřeny na antimikrobiální aktivitu koření, a to zejména ve spojitosti s prodloužením trvanlivosti potravin. Námi zjištěné výsledky korespondují se závěry mnoha studií, zabývajících se antimikrobiální aktivitou koření. Z našich výsledků je zřejmé, že právě hřebíček a česnek vykazují dobrou antimikrobiální aktivitu oproti paprice a pepři. U hřebíčku byly zjištěny statisticky průkazně větší ($P < 0,01$) velikosti inhibičních zón u misek inokulovaných kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* a kulturou enterokoků. Na koliformní mikroorganismy měl nejvyšší ($P < 0,01$) inhibiční účinek česnek. Paprika a pepř nevykazovaly dle našich výsledků výrazný antimikrobiální účinek na testované skupiny mikroorganismů. Na základě námi zjištěných výsledků lze konstatovat, že inhibiční účinek koření na jednotlivé skupiny mikroorganismů nezávisí na jednotlivých podílech koření (podíl vodního acetátu, ethylacetátový podíl, ethanolový podíl a petroletherový podíl), ale na použitých koncentracích. V nejvyšší koncentraci, tj. rozpuštění macerátu v 5 ml ethanolu, vyazuje koření nejvyšší ($P < 0,01$) inhibiční účinek, resp. byla naměřena největší velikost inhibičních zón, a to u všech testovaných druhů koření.

Použití koření jako inhibitoru mikrobiálního růstu v potravinách je však často limitováno sensorickými požadavky, protože antimikrobiální dávka může převyšovat organolepticky přijatelnou úroveň. Nicméně, kombinace koření a dalších antimikrobiálních bariér může zvýšit trvanlivost a bezpečnost potravin, což by mohlo vyřešit stále větší poptávku po tzv. zelených potravinách obsahujících méně syntetických látek. Koření a jeho deriváty mohou být tedy vhodnou alternativou pro použití v potravinovém konzervačním systému a mohou působit jako hlavní nebo pomocná antimikrobiální složka.

LITERATURA

- AGAUGLU, S., DOBSTIL, N., AMDAR, S. (2007): Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. In Bull Vet Inst Pulawy, Vol. 51, pp. 53 - 55.
- ARORA, D.S., KAUR, J. (1999): Antimicrobial Activity of Spices. In International Journal of Antimicrobial Agents, Vol. 12, Issue 3, pp. 257-262.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. (2008): Biological effect of essential oils – A review. In Food and Chemical Toxicology, Vol.46, p. 447.

- CEYLAN, E., FUNG, D.Y. C. (2004): Antimicrobial activity of spices. In *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. Vol. 12, Issue 1, pp. 1-55.
- ČSN ISO 4832:1991: Všeobecné podmínky pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií, Český normalizační institut, Praha, 1994, 12s.
- ČSN ISO 4833:2003: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Český normalizační institut, Praha, 2003, 13 s.
- ERTÜRK, Ö. (2006): Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. In *Biologia*, Bratislava, 61/3, p. 227.
- GREGOR, T. (1999): Inhibiční účinek rostlinných extraktů na vybrané druhy kvasinek. 1. vyd. Brno: VUT, 64 s.
- HIRASA, T., TAKEMASA, M. (1998): Spice science and technology. In Marcel Dekker, Tokyo, pp. 163 – 164.
- INDU, M. N., HATHA, A. A. M., ABIROSH, C., HARSHA, U., VIVEKANANDAN, G. (2006): Antimicrobial activity some of the south-indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. In *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 37, pp. 153 - 155.
- LEUSCHNER, R. G. K., ZAMPARINY, J. (2002): Effect of spice on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. In *Food Control*, Vol. 13, pp. 399 - 403.
- MARCINČÁK, S., PETER, T., JEVINOVÁ, P., MARTONOVÁ, M. (2008): Antioxidačný a antibakteriálny účinok extraktov rastlín pridaných do bravčového mäsa. In *Bezpečnosť a kontrola potravín (Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie)*, II. diel. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. Nitra, 398 s.
- OUTTARA, B., SIMARD, R. E., HOLLEY, R. A., PIETTE, G. J.-P., BÉGIN, A. (1997): Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. In *International Journal of Microbiology*, Vol. 37, p. 158.
- PASQUA, R., DE FEO, V., VILLANI, F., MAURIELLO, G. (2005): In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. In *Annals of Microbiology*, Vol.55, Issue 2, p. 140.
- PODSTATOVÁ, H. (2001): Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena. Opava, 283 s. ISBN 81-86297-07-1.
- RYŠKOVÁ, O., HANOVCOVÁ, I., HORÁK, V., HORÁČEK, J., LESNÁ, J., BUCHTA, V., HOZÁK, A. (1997): Návod k praktickým cvičením z lékařské mikrobiologie. Univerzita Karlova, Praha, 165 s. ISBN 80-7184-307-5.
- SINGH, G., SUMITRA, M., LANPASONA, P., CATALAN, A. N. (2006): Studies of Essential oils, Part 14. Chemical composition, antifungal, antioxidant and sprout suppressant activities of coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil and its oleoresin. In *Flavour Fragr. J.* Vol. 21, p. 478.
- SOUZA, E. L., STAMFORD, M. T. L., LIMA, E. O., TRAJANO, V. N., FILHO, J. M. B. (2005): Antimicrobial Effectiveness of Spices: Approach for use in Food Conservation Systems. In *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 48, Issue 4, pp. 549 - 558.

Kontaktní adresa:

MVDr. Olga Cwиковá Ph.D., MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, e-mail: cwikova@node.mendelu.cz