

EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON MICROBIOLOGICAL PURITY OF FENNEL (*FOENICULUM VULGARE* VAR. *VULGARE* MILL.) DURING STORAGE

Staňková B.¹, Růžičková G.¹, Kalhotka L.²

¹Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Stankova.b@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the effects of plant extracts, which exhibit antimicrobial activity, on microbiological purity of fennel fruit (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare* Mill.) during storage in order to use this method in food industry. The samples of whole fennel fruits (250 g) were treated with aqueous extracts of caraway (*Carum carvi* L.) and of perilla (*Perilla frutescens* L.) and spirituous extracts: marigold (*Tagetes patula* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), caraway (*Carum carvi* L.), hemp (*Cannabis sativa* L.) and celandine (*Chelidonium majus* L.).

After the treating with the extracts, the fruits were stored for 1, 2, 3, 4, and 8 weeks. Using the rinsing method and then the plate method, the quantity of molds and yeasts and the total number of microorganisms in CFU (Colony Forming Units.g⁻¹) were evaluated. It was found that the extracts from the plants have inhibited the growth and proliferation of molds and yeasts in particular. The most active extracts were: spirituous extract of marigold, spirituous extract of caraway, spirituous extract of hemp and spirituous extract of celandine.

Total number of microorganisms was significantly limited by spirituous extract of marigold, spirituous extract of caraway and spirituous extract of hemp.

Key words: *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* Mill., plant extract, antimicrobial activity, pathogenic microorganisms, food industry.

ÚVOD

Koření je bezesporu každodenně používanou přísadou do jídel a dalších potravinářských produktů. Udržet mikrobiální čistotu, a tedy i tolik důležitou kvalitu, by mělo být prioritou každého výrobce a zpracovatele koření. Některé bakterie a mikroskopické vláknité houby (běžně označované jako plísně) (NEDĚLNÍK; MORAVCOVÁ, 2005) totiž v napadených potravinách prokazatelně uvolňují toxické metabolity, jež mohou způsobit lehčí až velmi závažná onemocnění (OSTRÝ, 2006).

Potraviny, rovněž i koření, je proto nutné před spotřebou upravit tak, aby se zamezilo růstu a množení nežádoucích mikroorganismů. U koření jsou nejvyužívanější metody mikrobiální dekontaminace sterilace vodní parou a ozařování ionizujícím zářením dovolující zachovat organoleptické vlastnosti koření (<http://www.safesteril.com/en/theproducts.php>, 2009; MICHALOVÁ, 2004). Jistou alternativou je metoda aplikace rostlinných extraktů.

Velké množství druhů rostlin z různých čeledí obsahuje antibakteriální a antifungální látky. Obecně antimikrobiální vliv vykazují obsahové látky jako silice (především terpenické a fenylypropanové složky), třísloviny, flavonoidy, ale i peptidy a alkaloidy (RŮŽIČKOVÁ, 2009). Výhodou extraktů z rostlin tedy je, že obsahují širší spektrum účinných látek, např. terpenické látky, alkaloidy, třísloviny, hořčiny, saponiny, glykosidy a další chemické sloučeniny (ČESKÝ LÉKOPIS, 2005).

Rostlinné extrakty byly hodnoceny v řadě studií a výzkumů, kde byl sledován vliv především na plísně a bakterie u potravin typu mléko, sýra a maso (TASSOU et al., 2004) nebo na čisté kultury mikroorganismů (TUCHILA et al., 2008; DAMJANOVIC-VRATNICA et al., 2008; ROTA et al. 2004), doposud se však žádná nezabývala kořením či kořeními přípravky.

Cílem práce* bylo zhodnotit rostlinné extrakty, u kterých byla potvrzena antimikrobiální působnost, na plody fenyklu (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare* Mill.), aby svými účinky zabránily mikrobiálnímu znečištění v průběhu skladování. Jako kontrolní vzorky byly zvoleny plody fenyklu ošetřené od dodavatele parní sterilací a neošetřené. Pokusy byly zaměřeny na zjišťování množství KTJ (kolonie tvořící jednotky) na 1 g plodu fenyklu u vzorků ošetřených rostlinnými extrakty a kontrolních vzorků po jednotlivých týdnech ošetření, nikoli však již na konkrétní determinaci mikroorganismů, jak tomu bylo u řady jiných zahraničních studií zkoumajících antimikrobiální vliv rostlinných extraktů a silic v potravinářském odvětví.

* Celý příspěvek vychází z diplomové práce Vliv aplikace rostlinných extraktů na mikrobiologickou čistotu plodového koření, 2009.

MATERIÁL A METODIKA

Pro pokusné účely byl zakoupen fenyklový plod celý (*Foeniculi amari fructus toto*) odpovídající kvalitativním požadavkům Českého lékopisu 2005 ve formě ošetřené parní sterilací od dodavatele a neošetřené. Plod fenyklu ošetřený parní sterilací sloužil jako kontrolní vzorek, neošetřený pro vlastní aplikaci rostlinných extraktů a rovněž jako vzorek kontrolní.

Na vzorky neošetřeného plodu fenyklu byly aplikovány vodné a lihové extrakty z rostlin, jež podle literárních zdrojů vykazují antimikrobiální aktivitu. Při pokusech byly použity tyto rostlinné extrakty: vodný extrakt kmín kořený (*Carum carvi* L.) - plod, vodný extrakt perila křovitá (*Perilla*

frutescens L.) - nať - z perily typu červenolistá a zelenolistá, lihový extrakt aksamitník rozkladitý (*Tagetes patula* L.) - nať, lihový extrakt dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.) - nať, lihový extrakt kmín kořený (*Carum carvi* L.) - plod, lihový extrakt konopí seté (*Cannabis sativa* L.) - nať, lihový extrakt vlašovičnick větš (*Chelidonium majus* L.) - nať. Rostlinné extrakty byly zakoupeny od společnosti PRVNÍ JÍLOVSKÁ, a.s. - divize EXAR, vodné extrakty z perily křovité byly připraveny dle Českého lékopisu 2005 přímo v laboratoři na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství. Všechny lihové extrakty byly vyrobeny z 35% lihu.

Za sterilních podmínek byl na zvolený objem plodu fenýklu (250 g) aplikován vždy 100 % vodný či lihový rostlinný extrakt. Vzorky byly vysušeny v sušárně s aktivní cirkulací vzduchu po dobu 15 - 20 minut a teplotě 50 °C a skladovány ve skleněných lahvích s uzavíratelným víčkem při teplotě 20 °C a relativní vzdušné vlhkosti 60 %, což odpovídá podmínkám skladování ve zpracovatelských podnicích.

Po 1., 2., 3., 4. a 8. týdnu od ošetření byly vzorky při mikrobiologickém stanovování zpracovávány metodou oplachu s následným využitím desetinného ředění a kultivačním vyšetřením plotnovou metodou. Pro plísně a kvasinky byla zvolena živná půda Chloramfenikol, pro celkový počet mikroorganismů PCA.

Kolonie plísní a kvasinek a celkového počtu mikroorganismů byly odečítány po stanovené inkubační době - počty plísní a kvasinek při 25 °C za 125 hodin, celkový počet mikroorganismů při 30 °C za 72 hodin - a dle příslušného ředění (nejčastější hodnoty ředění byly na 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} a 10^{-4} , výjimečně 10^{-5} a 10^{-6}) přepočítány na hodnoty v KTJ.g⁻¹.

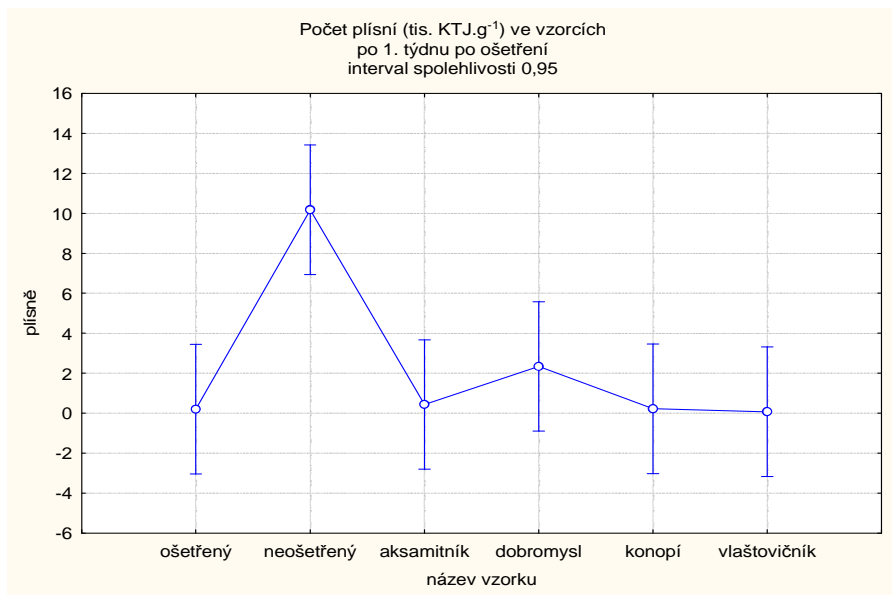
Výsledné hodnoty byly statisticky zpracovány v programu STATISTICA 8,0 CZ po 1., 4. a 8. týdnu po ošetření jednofaktorovou analýzou variance, Tukeyovým HSD testem ($\alpha = 0,05$) a pro grafické vyhodnocení metodou konfidenčních intervalů ($\alpha = 0,05$) konstruovaných kolem průměrů. Dále byly porovnány průměrné hodnoty počtu plísní a kvasinek a celkového počtu mikroorganismů u vzorků po 8. týdnu ošetření v jednotlivých variantách s mezní hodnotou možného výskytu plísní a kvasinek a celkového počtu mikroorganismů povolenou v potravinách. Mezní hodnota pro plísně a kvasinky v potravinách je 10^5 , pro celkový počet mikroorganismů (vyjma plísní a kvasinek) 10^4 (GÖRNER, VALÍK, 2004).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vzorky ošetřené rostlinnými extrakty byly rozděleny do 3 pokusných variant, přičemž u každé varianty bylo porovnání s kontrolními vzorky, tj. neošetřený plod fenýklu a ošetřený plod fenýklu parní sterilací od dodavatele.

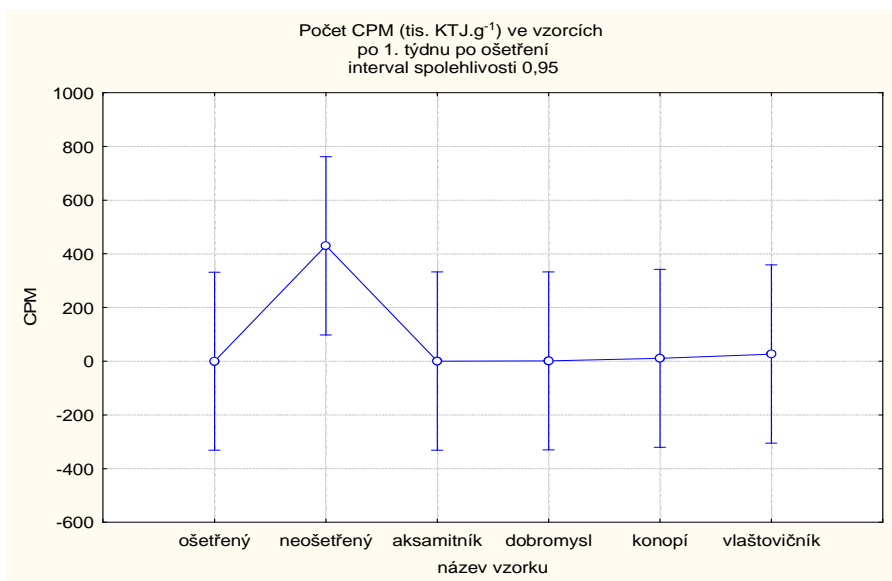
Statistické zhodnocení výsledných dat ukazuje, že mezi jednotlivými vzorky, které byly ošetřené rostlinnými extrakty, jsou v pokusných variantách statisticky neprůkazné až statisticky vysoce průkazné rozdíly. Statisticky neprůkazné rozdíly byly mezi ošetřenými vzorky např. u 2. pokusné varianty v 1. týdnu po ošetření u plísní a kvasinek viz *Graf 1* i u celkového počtu mikroorganismů (CPM) viz *Graf 2*. Statisticky vysoce průkazné rozdíly byly zjištěny mezi ošetřenými vzorky při hodnocení celkového počtu mikroorganismů u 3. varianty v 8. týdnu po ošetření viz *Tabulka 1*, *Graf 3.*, avšak především se statisticky vysoce průkazné rozdíly týkaly vzorků, které v průběhu skladování zplesnivěly chybou např. nedokonalého vysušení vzorku po aplikaci rostlinného extraktu viz *Tabulka 2*, *Graf 4*.

Graf 1 Průměrný počet plísní a kvasinek v tis. KTJ.g⁻¹ ve vzorcích po 1. týdnu ošetření - 2. pokusná varianta*



* vzorek ošetřený a neošetřený jsou kontrolní vzorky

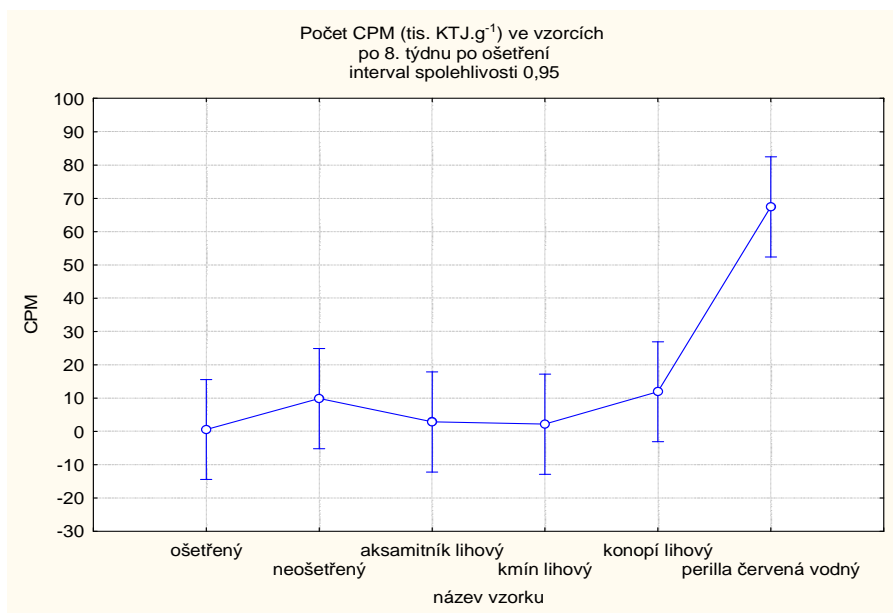
Graf 2 Průměrný počet CPM v tis. KTJ.g⁻¹ ve vzorcích po 1. týdnu ošetření - 2. pokusná varianta



Tab. 1 Průměrné hodnoty CPM v tis. KTJ.g⁻¹ v 8. týdnu ošetření - 3. pokusná varianta

Faktor		CPM
Ošetření	ošetřený	0,54 a
	neošetřený	9,86 a
	aksamitník lihový	2,84 a
	kmín lihový	2,16 a
	konopí lihový	11,9 a
	perila červená vodný	67,42 b

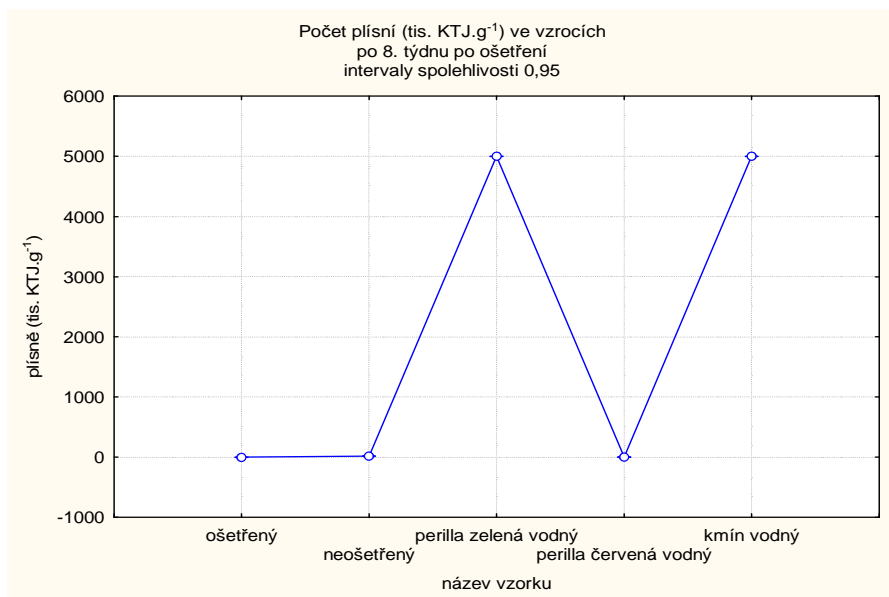
Graf 3 Průměrný počet CPM v tis. KTJ.g⁻¹ ve vzorcích po 8. týdnu ošetření - 3. pokusná varianta



Tab. 2 Průměrné hodnoty počtu plísní a kvasinek v tis. KTJ.g⁻¹ v 8. týdnu ošetření - 1. pokusná varianta

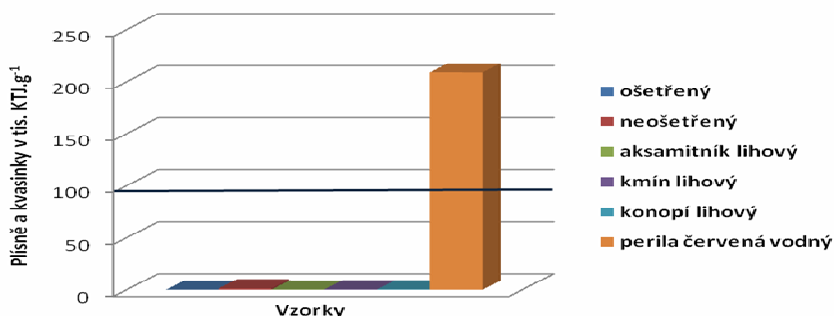
Faktor		Plísně a kvasinky
Ošetření	ošetřený	0,122 a
	neošetřený	19,780 c
	kmín vodný	5000 b
	perila červená vodný	0,694 a
	perila zelená vodný	5000 b

Graf 4 Průměrný počet plísní a kvasinek v tis. KTJ.g⁻¹ ve vzorcích po 8. týdnu ošetření - 1. pokusná varianta



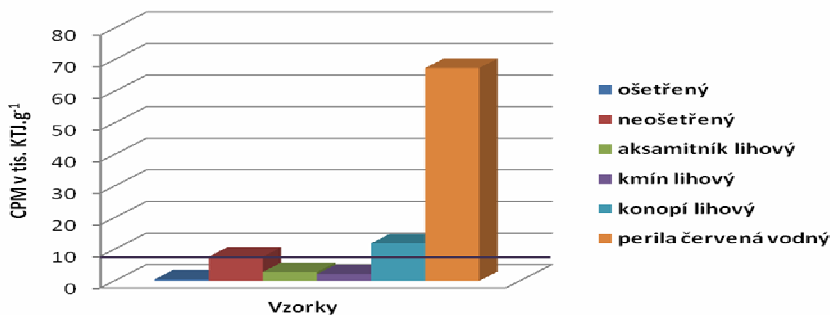
Při porovnání hodnot po 8. týdnu po ošetření s mezními hodnotami 10^5 pro plísně a kvasinky a 10^4 pro celkový počet mikroorganismů - CPM - (vyjma plísní a kvasinek) povolených v potravinářství tento mikrobiologický limit splňovaly všechny vzorky ošetřené rostlinnými extrakty mimo vzorky: vodný extrakt perila křovitá typu červenolistá u plísní a kvasinek viz Graf 5 a CPM u 3. varianty, lihový extrakt konopí seté u CPM u 3. varianty viz Graf 6 a vzorky zplesnivělé (vodný extrakt kmín kořený, vodný extrakt perila křovitá typu zelenolistá u 1. varianty, lihový extrakt aksamitník rozkladitý u 2. varianty).

Graf 5 Graf průměrných hodnot plísní a kvasinek u vzorků po 8. týdnu ošetření v porovnání s hraniční hodnotou 10^5 - 3. varianta



Pozn. Mezní hodnota 10^5 je označena modrou přímkou.

Graf 6 Graf průměrných hodnot CPM u vzorků po 8. týdnu ošetření v porovnání s hraniční hodnotou 10^4 - 3.varianta



Pozn. Mezní hodnota 10^4 je označena modrou přímkou.

Práce se zabývala i ekonomickým zhodnocením metody aplikace rostlinných extraktů oproti běžně užívaným metodám sloužícím k odstraňování stávající mikrobiální kontaminace a bránící vzniku nově.

Cena za ošetření plodového kořene parní sterilací se pohybuje v závislosti na množství odebraného materiálu v rozmezí od 1,00 do 1,50 € za 1 kg, což při současném kurzu české měny odpovídá 25,90 - 38,90 Kč za 1 kg.

Mikrobiální dekontaminace u celých plodů fenýklu ozařováním ionizujícím zářením standardní dávkou 3 - 7 kGy stojí, podle údajů společnosti ARTIM spol. s r.o., 8,90 Kč za 1 kg (<http://www.artim.cz/?lng=cz&pid=6>, 2008).

Společnost PRVNÍ JÍLOVSKÁ, a.s. - divize EXAR, vyrábějící rostlinné extrakty, uvádí, že se výše ceny rostlinných extraktů odvíjí od koncentrace použitého rozpouštědla a obsahu sušiny. Aktuální ceník extraktů platný od 1. 1. 2008 nabízí rostlinné extrakty, jež byly použity pro pokusné účely v této práci, v cenové relaci: Aksamitník rozkladitý nať - lihový extrakt - 210 Kč za 1 kg; Dobromysl obecná nať - lihový extrakt - 115,00 Kč za 1 kg; Kmín kořený plod - lihový extrakt - 145 Kč za 1 kg; Kmín kořený plod - vodný extrakt - 105 Kč za 1 kg; Konopí technické seté nať - lihový extrakt - 200,00 Kč za 1 kg; Vlaštovičnick větší nať - lihový extrakt - 135,00 Kč za 1 kg. Při úvaze 257 ml jako průměrné spotřeby rostlinného extraktu na 1 kg plodu fenýklu byla cena ošetření - viz Tab. 3.

Tab. 3 Ekonomické porovnání jednotlivých metod ošetření kořene

Způsob úpravy kořene	Cena v Kč na 1 kg plodů fenýklu
sterilizace vodní parou	25,90 - 38,90
ozařování ionizujícím zářením	8,90
aplikace extraktů rostlin	
aksamitník rozkladitý nať - lihový extrakt	54,0
dobromysl obecná nať - lihový extrakt	28,80
kmín kořený plod - lihový extrakt	37,30
kmín kořený plod - vodný extrakt	27,0
konopí technické seté nať - lihový extrakt	51,40
vlaštovičnick větší nať - lihový extrakt	34,70

Údaje o ceně rostlinného extraktu perily křovité formy červenolistá a zelenolistá nejsou k dispozici, protože rostliny byly získány od soukromého pěstitele zdarma a samotný extrakt byl připraven na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství.

ZÁVĚR

Účinnost rostlinných extraktů na mikroorganismy v průběhu 8 týdenního sledování u jednotlivých variant kolísala, nicméně prací bylo potvrzeno, že rostlinné extrakty významně působily na plísně a kvasinky, a to tím způsobem, že po 8 týdnech od ošetření byla průměrná hodnota KTJ.g⁻¹ plísní a kvasinek pod mezní hodnotou 10⁵ povolenou v potravinářství, vyjma vzorků, které v průběhu skladování zplesnivěly chybou např. nedokonalého vysušení po aplikaci rostlinného extraktu. Jediný vzorek, který limit 10⁵ nesplnil, byl vzorek ošetřený vodným extraktem z perily křovité typu červenolistá u 3. varianty.

U celkového počtu mikroorganismů (CPM) byla po 8 týdnech od ošetření u vzorků, na které byly aplikovány rostlinné extrakty, několikanásobně překročena hraniční hodnota 10⁴ stanovená pro potraviny, tudíž se staly pro potravinářství nevyhovující. Výjimka byla pouze u 3. varianty v 8. týdnu po ošetření, kdy vzorky kmín lihový a aksamitník lihový byly pod mezní hodnotou.

Hraniční hodnoty 10⁵ pro plísně a kvasinky a 10⁴ pro celkový počet mikroorganismů byly převzaty od autorů GÖRNER, VALÍK, 2004, kteří je uvádí jako mikrobiologické limity pro koření ve státech EU. V České republice dříve mikrobiologické normy pro koření stanovovala vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 132/2004 Sb. o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení. Po zrušení této vyhlášky bylo začleněno do českých právních norem Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, jež mikrobiologické limity pro koření nestanovuje. Pro Českou republiku však existuje platná Česká technická norma - ČSN 569609 z února 2008 - *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace* zabývající se i kořením. Normy však nejsou závazné a dodržování jimi stanovených kritérií je dobrovolné. Za závazné se považují pouze tehdy, pokud na ně zákon nebo vyhláška odkazuje (DRAŠNAROVÁ, BUCHTOVÁ, 2004).

Za neúčinnější rostlinné extrakty na plísně a kvasinky, eventuálně za dobře a stabilně působící rostlinné extrakty, by se na základě výsledků z pokusů mohly považovat: lihový extrakt aksamitníku rozkladitého (u 3. varianty se zaplísněním problémy nebyly), lihový extrakt kmínu kořeněného, lihový extrakt konopí setého a lihový extrakt vlašovičnicku většího. Celkový počet mikroorganismů významněji omezovaly lihové extrakty z aksamitníku rozkladitého, kmínu kořeněného a konopí setého.

Podle výsledků tedy lihové extrakty dosahovaly významné antimikrobiální efektivity. V úvahu se ovšem v tomto případě musí brát nejen působnost rostlinného extraktu, ale i konzervační schopnost samotného lihu. Všechny rostlinné extrakty byly připraveny z 35 % lihu, nicméně podle zvyklostí má líh sterilizační působnost až od 70 % (RŮŽIČKOVÁ, 2009).

Co se týká ekonomického zhodnocení metody aplikace rostlinných extraktů jedná se o metodu finančně náročnější. Do nákladů byly započítány pouze ceny extraktů, nikoli však již další

důležité položky, které by cenu za aplikaci ještě navýšily. Průměrná cena za ošetření se pohybovala kolem 38,90 Kč za 1 kg plodového koření.

Finančně nejvýhodnější by podle průzkumu bylo ošetření koření ozářením ionizujícím zářením (8,90 Kč.kg⁻¹ od společnosti ARTIM spol. s r.o.). Tento způsob ošetření ale vyvolává u spotřebitelů jisté pochybnosti o kvalitě a nezávadnosti takto upravených potravin.

Prací tedy bylo potvrzeno, že vybrané rostlinné extrakty mají antimikrobiální účinky a samotnou metodu aplikace rostlinných extraktů pro udržení mikrobiální čistoty plodového koření by bylo možné v potravinářství plnohodnotně využít po provedení dalších studií.

LITERATURA

ARTIM spol. s r.o. /Dekontaminace a desinsekcce potravin a potravinářských surovin/ [online] [cit. 2008-12-06]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.artim.cz/?lng=cz&pid=6>>

ČESKÝ LÉKOPIS 2005. Praha: Grada Publishing a.s., 2005. ISBN 80-247-1532-5.

DAMJANOVIC-VRATNICA, B. (ed.). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild-growing *Salvia officinalis* L. from Montenegro. JOURNAL OF ESSENTIAL OIL BEARING PLANTS, 2008, Vol. 11, s. 79-89.

DRAŠNAROVÁ, Z., BUCHTOVÁ, I. Situační a výhledová zpráva: Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR, 2004. 48 s. ISBN 80-7084-317-9.

GÖRNER, F., VALÍK L. Aplikovaná mikrobiologie požívatin. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

MICHALOVÁ, I. Ošetřování potravin ionizací. *Potravinářská revue*, 2004, č. 2, s. 27.

NEDĚLNÍK, J., MORAVCOVÁ, H. Současný pohled na problematiku mykotoxinů. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2005, Sborník příspěvků, 2005, s. 20-31.

OSTRÝ, V. Plísňe a potraviny - Mykotoxiny v potravinách 2. část. *Potravinářská revue*, 2006, č. 2, s. 23-25.

PETER, K. V., TASSOU, C., C. (ed.) Handbook of herbs and spices. Boca Raton: CRC Press, 2004. Woodhead Publishing in food science and technology. ISBN 1-85573-721-3.

ROTA, C. (ed.). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. JOURNAL OF FOOD PROTECTION, 2004, Vol. 67, s. 1252-1256.

RŮŽIČKOVÁ, G. Ústní sdělení. [cit. 2009-04-29].

SAFESTERIL. /Safesteril - steam sterilization/. [online] [cit. 2009-04-10]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.safesteril.com/en/theproducts.php>>

TUCHILA, C. (ed.). Evaluation of the antimicrobial activity of some plant extracts used as food additives. JOURNAL OF FOOD AGRICULTURE & ENVIRONMENT, 2008, Vol. 6, s. 68-70.