Przeciwdrobnoustrojowa aktywność ekstraktów z owoców żurawiny wielkoowocowej w mikrobiologicznej ochronie mielonej wieprzowiny

AGATA STOBNIKA, MAŁGORZATA GNIEWOSZ*

Pracownia Zagrożeń Biologicznych, Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy,
ul. Czerniakowska 16, 00-701 Warszawa

*Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 161/35, 02-787 Warszawa

Otrzymano 10.04.2017

Zaakceptowano 30.05.2017

Stobnicka A., Gniewosz M.

Antimicrobial activity of American cranberry extract in the antimicrobial protection of minced pork meat

Summary

The aim of the study was to determine the content of bioactive ingredients in American cranberry extracts (*Vaccinium macrocarpon*), the antimicrobial activity of these extracts, and the efficiency of the selected extract in minced pork meat together with its sensory evaluation. Three extracts were made: aqueous (w-FACE), ethanol (e-FACE) and aqueous-ethanol (we-FACE). The content of bioactive components was tested by HPLC. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined against ten Gram-negative bacteria strains and six Gram-positive bacterial strains by the serial macrodilution method. Minced pork meat with or without the addition of 2.5% w-FACE was inoculated with four pathogenic strains (*Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and stored at 4°C for 6 days. At 0, 2, 4 and 6 days, the number of bacteria was determined by the plate method. Sensory evaluation of meat samples with and without in-FACE included general appearance and smell. All extracts contained organic acids (p-coumarin, benzoic, chlorogenic and coffee) and flavone (quercetin, miristin, epicatechin and isorhamnetin). E-FACE also contains ursolic acid. The MIC/MBC values of the extracts were in the range of 1.56-6.25 (3.13-25.0) mg/ml against Gram-positive bacteria and 6.25-12.5 (6.25-25.0) mg/ml against Gram-negative bacteria. Statistically significant ($p \leq 0.05$) inhibition of the growth of all pathogens in minced pork meat containing in-FACE was found. The 2.5% w-FACE had no significant effect ($p \leq 0.05$) on the initial sensory characteristics of minced pork meat and after 4 and 6 days of storage was significantly higher than that of FACE-free meat. The results of the study suggest the possibility of using an aqueous extract of cranberry fruit as a natural preservative of minced pork meat.

Keywords: American cranberry, extract, antimicrobial activity, minced meat

Kwestie dotyczące bezpieczeństwa żywności, w tym mięsa, mają istotny wpływ na kształtowanie postaw konsumentów, dlatego wciąż poszukuje się nowych metod, mogących znaleźć zastosowanie w przedłużaniu mikrobiologicznej trwałości mięsa. Jedną z nich jest stosowanie naturalnych substancji przeciwdrobnoustrojowych (1). Ekstrakty czy koncentraty z żurawiny mogą być stosowane jako dodatki do żywności o wielokierunkowym działaniu (20, 25). Owoce żurawiny ze względu na specyficzne właściwości są ważnym produktem prozdrowotnym. Bioaktywność i korzystny efekt żurawiny w leczeniu chorób zakaźnych, w tym infekcji dróg moczowych, zostały obszernie przebadane i dobrze udokumentowane (24). Konsumpcja różnych

produktów z żurawiny, zwłaszcza przez kobiety, zapobiega infekcjom dróg moczowych, a w połączeniu z antybiotykoterapią pomaga w zwalczaniu zakażenia *Helicobacter pylori* (24). Dzięki obecności i synergistycznemu działaniu różnych polifenolowych składników, w tym antocyjanów, flawonoli i procyanidyn, owoce żurawiny mogą być skuteczne w profilaktyce np. raka sutka (22). Wyniki badań Sun i wsp. (22) wskazują, że żurawina może zapobiegać starzeniu się ludzi w różnym wieku. W licznych badaniach przedstawiono skład owoców żurawiny (6, 14), a także przeciwtleniający potencjał żurawinowych związków fenolowych (3, 15).

Ekstrakty z żurawiny proponowano jako dodatek do produktów mięsnych w celu zahamowania niekorzyst-

nych zmian przechowalniczych lipidów i barwników mięśniowych (8, 12, 20), jednakże mało jest dostępnych badań dotyczących aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z żurawiny wielkoowocowej w stosunku do mikrobioty zanieczyszczającej mięso, w tym patogenów. Z uwagi na dużą popularność owoców żurawiny zasadne było podjęcie badań w zakresie wykorzystania tych owoców do otrzymania ekstraktów o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym i sprawdzenia ich skuteczności jako naturalnych konserwantów.

Celem badań było określenie zawartości bioaktywnych składników w ekstraktach z owoców żurawiny wielkoowocowej i przeciwbakteryjnej aktywności tych ekstraktów wobec szczepów wzorcowych oraz skuteczności działania przeciwbakteryjnego wybranego ekstraktu w próbce mielonej wieprzowiny wraz z oceną sensoryczną. Wyniki badań dostarczą wiedzy na temat przydatności funkcjonalnej ekstraktów jako naturalnych środków konserwujących mięso.

Materiał i metody

Owoce żurawiny wielkoowocowej (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) pochodziły z uprawy „Grąbczewscy. Szkółki od 1936” w Runowie (woj. mazowieckie). Świeże mięso wieprzowe z szynki (*musculus semimembranosus*) zakupiono w lokalnym sklepie.

Zastosowano jednostopniową ekstrakcję owoców żurawiny wodą, 96% etanolem i 40% roztworem wodnym etanolu. Stosunek świeżego surowca (1 kg) do rozpuszczalnika (5 l) wynosił 1 : 5. Owoce ekstrahowano w półtechnicznym, prototypowym urządzeniu do ekstrakcji (3EU01, OBR Pleszew) w temperaturze 70°C przez 2 h. Następnie ekstrakty zagęszczano w wyparce rotacyjnej (R-205, Büchi) i zliofilizowano (Alpha 1-4, Christ). Uzyskano trzy suche ekstrakty: wodny (w-FACE), etanolowy (e-FACE) i wodno-etanolowy (we-FACE), które przechowywano w eksykatorkach w szczelnie zamkniętych plastikowych pojemnikach, bez dostępu światła.

Analizę składu chemicznego przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy zastosowaniu chromatografu ciekłego Agilent 1200 z detektorem DAD. Zastosowano kolumnę Zorbax Eclipse XDB C18, 4,6 × 150 mm, 5 µm, a jako eluenty – acetonitryl i 0,05% TFA w wodzie. Szybkość przepływu wynosiła 0,8 ml/min, a objętość nastrzyku 10 µl. Detekcja następowała przy długości fali 210 nm i 325 nm. Otrzymane wyniki porównywano ze standardami (Sigma-Aldrich) oznaczanych związków.

Minimalne Stężenie Hamujące (MIC) i Minimalne Stężenie Bakteriobójcze (MBC) ekstraktów oznaczono metodą seryjnych makro-rozcieńczeń (5). Wykonano szereg dwukrotnych rozcieńczeń ekstraktów w zakresie 0,098-50 mg/ml w bulionie Mueller-Hinton (BTL). W badaniach użyto referencyjnych szczepów z kolekcji czystych kultur ATCC oraz z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – PZH: *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076, *S. ser. Enteritidis* NIPH-NIH 322/11, *S. ser. Typhimurium* NIPH-NIH 300/11, *Shigella sonnei* NIPH-NIH „s”, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* O26 NIPH-NIH 152/11, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter aerogenes* ATCC

13048, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NIPH-NIH A-529, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* NIPH-NIH 17/11, *Bacillus cereus* ATCC 11778. Inokulum bakteryjne pochodziło z 20 h hodowli szczepów (10^7 jtk/ml). Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. MIC określono jako najniższe stężenie badanego ekstraktu hamujące rozwój bakterii, oceniane wizualnie. Minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) oznaczano przez przeniesienie 0,1 ml z każdej próbki bez widocznego wzrostu szczepów na podłoże Muller-Hinton Agar (BTL). MBC definiowano jako najniższe stężenie ekstraktu, które redukowało liczbę mikroorganizmu o 99,9%.

Na podstawie wartości MIC obliczono aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu (%) według wzoru: $A(\%) = (\text{liczba szczepów hamowanych przez badany ekstrakt}) : (\text{liczba badanych szczepów}) \times 100$.

Przeciwbakteryjną aktywność ekstraktu oceniono w mielonym mięsie wieprzowym. Fragmenty mięsa w kształcie sześciangu o krawędzi 5 cm zanurzano w etanolu (96% v/v) i opalono nad płomieniem palnika. Następnie jałowym skalpelem odkrawano z każdej strony warstwę powierzchniową mięsa grubości około 3 mm. Pozostałe fragmenty mięsa mielono w wyjałowionej etanolem (96%) maszynce do mięsa ze stali z sitkiem o średnicy otworów 4 mm. Szczepy testowe, tj. *S. aureus* A-529, *L. monocytogenes* 17/11, *E. coli* O26 152/11, *S. ser. Enteritidis* 322/11, były dwukrotnie namnożone w 10 ml bulionu odżywczego (BTL), indywidualnie w temperaturze 37°C przez 24 h. Biomasa komórkową odwirowywano w temperaturze 4°C przez 5 min przy $10\,000 \times g$, przemywano sterylnym roztworem 0,1% wody peptonowej (BTL), a następnie zawieszano w 20 ml sterylnej 0,1% wody peptonowej (około $8 \log_{10}$ jtk/ml). Cztery szczepy zmieszano i zastosowano do zaszczepienia próbek mielonego mięsa wieprzowego podzielonego na cztery porcje o masie 100 g każda, które umieszczono w sterylnych plastikowych torebkach. Po 1 ml hodowli dodawano do dwóch próbek, aby uzyskać około $6 \log_{10}$ jtk/g. Do dwóch pozostałych próbek zamiast inokulum dodawano 1 ml sterylnego 0,1% roztworu wody peptonowej. Próbkę dokładnie mieszano sterylną bagietką. Następnie do dwóch próbek (jednej z inokulum i drugiej bez inokulum) dodawano wodny ekstrakt z owoców żurawiny wielkoowocowej (w-FACE) w stężeniu 2,5% (w/w), a następnie dokładnie mieszano. Uzyskano następujące próbki: 1 – (mięso + inokulum + w-FACE), 2 – (mięso + inokulum), 3 – (mięso + w-FACE), 4 – (mięso bez dodatków). Każdą próbkę podzielono na cztery porcje o masie 25 g, umieszczono w sterylnych plastikowych torebkach i przechowywano w temperaturze 4°C przez 6 dni (7, 26). Cały eksperyment powtórzono trzy razy.

Analizę mikrobiologiczną przeprowadzono w dniu 0 (po 30 min od dodania w-FACE do mięsa) oraz po 2., 4. i 6. dniu chłodniczego przechowywania. Do 25 g próbki dodawano 225 ml sterylnej 0,1% wody peptonowej i homogenizowano w Stomacher 400C Lab Blender (Seward, London, UK) w temperaturze pokojowej przez 2 minuty. Następnie przygotowano dziesiętne rozcieńczenia, po czym przenoszono po 100 µl na powierzchnie dwóch równoległych płytek z podłożami Baird Parker Agar, Palcam Listeria

Agar (BTL), Hektoen Agar i Chromogenic Coliform Agar (Merck). Po inkubacji liczono charakterystyczne kolonie. Wynik przeliczano na jtk/g mięsa. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. W celu potwierdzenia przynależności gatunkowej bakterii losowo wybierano kolonie, które barwiono metodą Grama i sprawdzano przy użyciu komercyjnych zestawów diagnostycznych.

pH próbek świeżego mielonego mięsa wieprzowego z i bez w-FACE w stężeniu 2,5% badano przez zmieszanie 10 g próbki z 30 ml destylowanej wody i przy użyciu pehametru (CP-411, Elmetron) wyposażonego w elektrodę 12-01 (Metron).

Ocenę sensoryczną przeprowadził panel 8 osób w wieku od 30 do 51 lat, zgodnie z międzynarodowymi standardami (11). Badano wygląd i zapach próbek surowego mielonego mięsa wieprzowego z i bez w-FACE w stężeniu 2,5% w czasie 0 oraz po 2, 4, 6 dniach chłodniczego przechowywania (4°C). Próbkę oceniano w 9-punktowej skali. Oceny 5 i powyżej wskazywały na akceptowalność próbki, oceny 3 i niższe – na brak akceptowalności próbek.

Obliczenia statystyczne wykonano stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) przy użyciu programu Statistica 10PL. Istotność różnic między wartościami średnimi została oceniona za pomocą testu Tukeya na poziomie istotności $p < 0,05$. Wszystkie eksperymenty były wykonane w trzech powtórzeniach.

Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono zawartość bioaktywnych składników występujących w ekstraktach otrzymanych z owoców żurawiny wielkoowocowej. W składzie ekstraktów dominującym kwasem był kwas p-kumarowy, następnie kwas benzoowy i chlorogenowy. W znacznie mniejszych zawartościach był kwas kawowy. Kwas gentyzynowy obecny był tylko w wodnym i wodno-etanolowym ekstrakcie. Stwierdzono, że wodno-etanolowy ekstrakt zawierał więcej kwasów organicznych w porównaniu z ekstraktem etanolowym i wodnym. Ekstrakt ten charakteryzował się także istotnie statystycznie większą zawartością flawonoli od zawartości tych związków w dwóch pozostałych ekstraktach. Ekstrakt etanolowy jako jedyny zawierał niewielką ilość kwasu ursolowego. Żaden ekstrakt nie zawierał resweratrolu. Związek ten występuje głównie w skórcie owoców (21), stąd jego nieobecność w badanych ekstraktach. Wszystkie ekstrakty zawierały związki o udokumentowanym działaniu przeciwdrobnoustrojowym mimo stwierdzonych różnic w ich zawartości (2, 9). Użycie do ekstrakcji rozpuszczalników polarnych (woda i etanol) spowodowało, że ekstrakty były bogate w związki fenolowe. Dodatkowo z badań Caillet i wsp. (4) wynika, że ekstrakt z żurawiny otrzymany przy użyciu mieszanki wody z etanolem w stosunku 85 : 15

Tab. 1. Zawartość zidentyfikowanych składników ekstraktów z owoców żurawiny wielkoowocowej (FACE)

Składnik	Czas retencji [min]	e-FACE	w-FACE	we-FACE
		mg/100 g $\pm$ SD*		
Kwas p-kumarowy	7,25	146,2 $\pm$ 5,1 ^a	117,4 $\pm$ 7,5 ^b	179,9 $\pm$ 3,4 ^c
Kwas benzoowy	11,77	109,2 $\pm$ 3,1 ^a	108,2 $\pm$ 4,1 ^a	99,8 $\pm$ 1,2 ^b
Kwas chlorogenowy	2,09	60,9 $\pm$ 2,0 ^b	79,3 $\pm$ 2,2 ^a	119,9 $\pm$ 2,9 ^c
Kwas kawowy	4,15	1,4 $\pm$ 0,2 ^a	0,3 $\pm$ 0,1 ^b	0,5 $\pm$ 0,1 ^b
Kwas gentyzynowy	4,82	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,2 ^b	2,2 $\pm$ 0,2 ^a
Suma kwasów		317,7 $\pm$ 10,4	305,9 $\pm$ 14,1	402,3 $\pm$ 8,3
Kwercetyna	18,86	14,3 $\pm$ 0,7 ^a	38,4 $\pm$ 1,2 ^b	44,7 $\pm$ 1,5 ^c
Mirystyna	13,08	8,3 $\pm$ 1,1 ^a	18,2 $\pm$ 1,3 ^b	19,8 $\pm$ 1,3 ^b
Epikatechina	3,94	5,8 $\pm$ 0,2 ^a	16,3 $\pm$ 1,5 ^b	19,1 $\pm$ 1,1 ^c
Izoramnetyna	22,15	2,6 $\pm$ 0,9 ^a	2,8 $\pm$ 0,4 ^a	4,2 $\pm$ 0,9 ^b
Suma flawonoli		31,0 $\pm$ 2,9	75,7 $\pm$ 4,4	87,8 $\pm$ 4,8
Terpeny (kwas ursolowy)	12,34	23,0 $\pm$ 2,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Stilbeny (resweratrol)	15,84	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Objaśnienia: e-FACE – etanolowy ekstrakt, w-FACE – wodny ekstrakt, we-FACE – wodno-etanolowy ekstrakt; * wartości średnie $\pm$ SD (z trzech oddzielnych eksperymentów); a, b, c – średnie oznaczone różnymi literami w tym samym wierszu różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

wykazuje większy potencjał wychwytyjący wolne rodniki i ma większą aktywność przeciwutleniającą niż ekstrakty uzyskane przy zastosowaniu apolarnych rozpuszczalników np. acetonu.

W tab. 2 przedstawiono aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów z żurawiny wielkoowocowej w stosunku do 16 szczepów bakterii. W celu uzyskania pełniejszego

Tab. 2. Wartości MIC i MBC ekstraktów z owoców żurawiny wielkoowocowej (FACE) wobec szczepów testowych

Bakterie	e-FACE	w-FACE	we-FACE
MIC/MBC (mg/ml)			
Gram-dodatnie			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6,25/25,0	1,56/12,5	6,25/25,0
<i>S. aureus</i> A-529	1,56/12,5	3,13/6,25	1,56/6,25
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3,13/6,25	3,13/6,25	3,13/6,25
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6,25/12,5	3,13/12,5	3,13/3,13
<i>L. monocytogenes</i> 17/11	6,25/25,0	3,13/25,0	3,13/25,0
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	6,25/12,5	3,13/6,25	6,25/6,25
Gram-ujemne			
<i>S. ser. Enteritidis</i> ATCC 13076	12,5/12,5	12,5/25,0	12,5/25,0
<i>S. ser. Enteritidis</i> 322/11	12,5/25,0	12,5/25,0	6,25/12,5
<i>S. ser. Typhimurium</i> 300/11	12,5/25,0	12,5/12,5	12,5/25,0
<i>S. sonnei</i> „s”	6,25/25,0	6,25/6,25	6,25/6,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,5/12,5	12,5/12,5	12,5/25,0
<i>E. coli</i> O26 152/11	6,25/25,0	6,25/12,5	6,25/12,5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	12,5/25,0	6,25/25,0	12,5/25,0
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	25,0/25,0	12,5/25,0	12,5/25,0
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	12,5/25,0	6,25/12,5	6,25/12,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12,5/12,5	6,25/6,25	12,5/12,5

go obrazu aktywności ekstraktów, oprócz szczepów referencyjnych, w badaniach użyto również izolatów klinicznych. W grupie bakterii Gram-dodatnich badano wrażliwość ziarniaków, pałeczek oraz przetrwalnikujących laseczek (*Bacillus*) na ekstrakty z owoców żurawiny. Wartości MIC ekstraktów były w zakresie od 1,56 do 6,25 mg/ml, natomiast wartości MBC były większe od wartości MIC (3,13-25,0 mg/ml). W grupie tych bakterii izolat kliniczny *L. monocytogenes* wykazywał największą oporność na badane ekstrakty (MBC 25,0 mg/ml). Poza tym obserwowano silniejsze działanie bakteriostatyczne wszystkich ekstraktów na szczep kliniczny *S. aureus* w stosunku do szczepu referencyjnego.

Hamujące działanie ekstraktów względem bakterii Gram-ujemnych było słabsze niż na bakterie Gram-dodatnie. Wartości MIC ekstraktów były w zakresie 6,25-12,5 mg/ml, z wyjątkiem etanolowego ekstraktu wobec *E. aerogenes* (MIC 25,0 mg/ml). MBC ekstraktów wynosiły 6,25-25,0 mg/ml i były równe lub większe od wartości MIC. Nie zaobserwowano jednoznacznych różnic we wrażliwości *S. ser. Enteritidis* i *E. coli* w zależności od pochodzenia szczepów na badane ekstrakty. Jedynie zauważono, że ekstrakt wodno-etanolowy silniej działał na szczepy kliniczne niż referencyjne tych bakterii.

Aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów z żurawiny głównie jest spowodowana niskim pH (19). Kwasy organiczne zawarte w ekstraktach częściowo biorą udział w uwalnianiu LPS z zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych, przyczyniając się do jej przepuszczalności (16). Poza tym składniki ekstraktów współdziałają z zewnętrzną błoną komórki, zakłócając jej aktywność, a następnie przemieszczają się do wnętrza komórki i hamują transkrypcję genów (25). Może to zapobiec syntezie białek, które są niezbędne dla wzrostu bakterii. Hamowanie transkrypcji genu może nastąpić w bardzo krótkim czasie. Lacombe i wsp. (13) wykazali specyficzne oddziaływanie frakcji cukrów wraz z kwasami organicznymi naturalnie występujących w owocach żurawiny wielkoowocowej, które powodowały widoczny stres osmotyczny w komórkach bakterii *E. coli*. Przeciwbakteryjne działanie ekstraktów z żurawiny związane jest też z działaniem pozostałych związków fenolowych. W przeciwieństwie do kwasów organicznych, związki fenolowe i antocyjany obecne w ekstraktach z żurawiny powodują miejscowe uszkodzenia ściany komórkowej i wyciek cytoplazmy do środowiska (13). Działanie przeciwdrobnoustrojowe żurawiny może być spowodowane przez wiele mechanizmów i synergii, ponieważ zawierają różne związki oraz ich mieszaniny występujące w różnych formach chemicznych (16).

W celu porównania aktywności przeciwbakteryjnej badanych ekstraktów obliczono procentową aktywność (A%) (tab. 3). Żaden z badanych ekstraktów nie wykazywał aktywności hamowania szczepów w stężeniach od 0,098 do 0,78 mg/ml. 6% badanych szczepów było

Tab. 3. Procentowa aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów z owoców żurawiny wielkoowocowej (FACE)

MIC mg/ml	e-FACE	w-FACE	we-FACE
0,098	0	0	0
0,195	0	0	0
0,39	0	0	0
0,78	0	0	0
1,56	6	6	6
3,13	13	34	25
6,25	50	69	63
12,5	94	100	100
25,0	100	100	100
50,0	100	100	100

Objaśnienie: MIC – minimalne stężenie hamujące ekstraktu

hamowanych przez ekstrakty dopiero w stężeniu 1,56 mg/ml. W wyższych stężeniach ekstrakt wodny wyróżniał się większym spektrum działania niż etanolowy i wodno-etanolowy. 100% testowych szczepów było hamowanych przez badane ekstrakty dopiero w stężeniu 25,0 mg/ml. Biorąc pod uwagę rodzaj użytego rozpuszczalnika, do dalszych badań wybrano ekstrakt wodny z żurawiny wielkoowocowej ze względu na skuteczność jego przeciwbakteryjnego działania i możliwość redukcji kosztów produkcji ekstraktu.

Następnie sprawdzono działanie przeciwbakteryjne wodnego ekstraktu z żurawiny wielkoowocowej w mielonym mięsie wieprzowym, które inokulowano patogenami (*E. coli* O26 152/11, *S. ser. Enteritidis* 322/11, *L. monocytogenes* 17/11 i *S. aureus* A-529) i przechowywano w temperaturze chłodniczej przez 6 dni. Średnia wartość pH mielonego mięsa wieprzowego wynosiła 6,59, a z dodatkiem wodnego ekstraktu z żurawiny w stężeniu 2,5% – 6,04. W czasie sześciodniowego przechowywania próbek mięsa pH nie ulegało znaczącym zmianom.

W próbkach kontrolnych mielonego mięsa wieprzowego, tj. (3) zawierającej ekstrakt (mięso + w-FACE) oraz (4) w świeżym mielonym mięsie wieprzowym, nie było wzrostu patogenów. W próbce kontrolnej (2) inokulowanej mieszaniną czterech patogenów (mięso + inokulum) obserwowano wzrost *L. monocytogenes* z początkowej liczby 5,54 log jtk/g do 6,78 log jtk/g po 2 dniach chłodniczego przechowywania, która utrzymywała się na tym poziomie przez kolejne 4 dni (tab. 4). Liczby pozostałych testowych patogenów powoli zmniejszały się i po 6 dniach odnotowano spadek liczby *S. aureus*, *S. ser. Enteritidis* i *E. coli* o jeden cykl logarytmiczny, tj. do 4,70, 4,56 i 4,30 log jtk/g, odpowiednio.

W próbce (1) mielonego mięsa wieprzowego z w-FACE obserwowano spadek liczby komórek podczas ich chłodniczego przechowywania (tab. 4). Stwierdzono, że badany ekstrakt skuteczniej hamował wzrost bakterii Gram-ujemnych niż bakterii Gram-dodatnich. Już po 30 min. po dodaniu w-FACE do mięsa liczba *E. coli*

Tab. 4. Zmiany liczby komórek bakterii w mielonym mięsie wieprzowym z dodatkiem 2,5% wodnego ekstraktu z owoców żurawiny wielkoowocowej (w-FACE) w czasie przechowywania w temp. 4°C

Czas (dni)	Mięso	
	kontrolne (bez w-FACE)	z dodatkiem 2,5% w-FACE
	log ₁₀ jtk/g	
	<i>L. monocytogenes</i> 17/11	
0 (30')	5,54 ± 0,26 ^a	5,28 ± 0,11 ^a
2	6,78 ± 0,14 ^a	1,90 ± 0,18 ^b
4	6,26 ± 0,28	< 1
6	6,06 ± 0,14	< 1
	<i>S. aureus</i> A-529	
0 (30')	5,41 ± 0,36 ^a	5,12 ± 0,21 ^a
2	5,86 ± 0,27 ^a	1,70 ± 0,25 ^b
4	5,18 ± 0,23	< 1
6	4,70 ± 0,31	< 1
	<i>S. ser. Enteritidis</i> 322/11	
0 (30')	5,88 ± 0,14 ^a	5,24 ± 0,33 ^a
2	5,28 ± 0,17	< 1
4	4,95 ± 0,28	< 1
6	4,56 ± 0,12	< 1
	<i>E. coli</i> 026 152/11	
0 (30')	5,65 ± 0,31 ^a	2,09 ± 0,11 ^b
2	5,72 ± 0,24	< 1
4	5,60 ± 0,17	< 1
6	4,30 ± 0,22	< 1

Objaśnienia: wartości średnie ± SD (z trzech oddzielnych eksperymentów); a, b – średnie oznaczone różnymi literami w tym samym wierszu różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

zmniejszyła się o 3,56 cykle logarytmiczne. Po dwóch dniach komórki *E. coli* i *S. ser. Enteritidis* nie były już wykrywane w próbkach mięsa (zmniejszyły się o 4 log cykle) ($p < 0,05$). Z kolei liczby komórek *L. monocytogenes* i *S. aureus* po 2 dniach przechowywania zostały istotnie statystycznie zmniejszone ($p < 0,05$) o 4,88 i 4,16 log cykle, odpowiednio. Po 4 dniach inkubacji próbek nie wykryto już żywych komórek tych szczepów. Lepsza przeżywalność bakterii Gram-dodatnich w mięsie wieprzowym wynika z przystosowania się tych bakterii do niskich temperatur. Onyango i wsp. (18) dowodzą, że bakterie *S. aureus* w niskich temperaturach zachowują dobrą żywotność dzięki morfologicznym, ultrastrukturalnym i biochemicznym zmianom w składzie ściany komórkowej. Czynniki te może mieć znaczenie przy oddziaływaniu ekstraktu z żurawiny, którego aktywność w takiej sytuacji może być utrudniona. Podobnie pałeczki *L. monocytogenes* są bakteriami termotolerancyjnymi i dzięki ochronnym białkom szoku termicznego mogą zachowywać dobrą żywotność w niskich temperaturach (17), co mogło mieć wpływ na ich lepszą przeżywalność w badanej próbce. Nie bez znaczenia jest również wpływ matry-

Tab. 5. Wpływ dodatku wodnego ekstraktu z owoców żurawiny wielkoowocowej (w-FACE) na sensoryczne cechy mielonej wieprzowiny ($\bar{x} \pm SD$; $n = 24$)

Czas (dni)	Mięso	
	kontrolne	z dodatkiem 2,5% w-FACE
	Ogólny wygląd	
0	8,62 ± 0,61 ^a	8,46 ± 0,78 ^a
2	8,04 ± 0,86 ^a	8,29 ± 0,79 ^a
4	7,59 ± 0,23 ^a	8,31 ± 0,52 ^a
6	6,80 ± 0,17 ^a	7,44 ± 0,93 ^a
	Zapach	
0	8,11 ± 1,22 ^a	8,43 ± 0,97 ^a
2	7,68 ± 0,79 ^a	8,38 ± 0,89 ^a
4	6,39 ± 0,93 ^a	8,11 ± 0,90 ^b
6	5,12 ± 0,62 ^a	8,02 ± 0,81 ^b

Objaśnienia: a, b – średnie oznaczone różnymi literami w tym samym wierszu różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

cy żywnościowej, jaką jest surowe mięso wieprzowe. Holzapfel (10) sugeruje lepszą przeżywalność bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych w surowcach mięsnych, szczególnie w warunkach działania niskich temperatur.

W tab. 5 przedstawiono wyniki oceny sensorycznej mielonego mięsa wieprzowego z i bez dodatku w-FACE w czasie 6 dni chłodniczego przechowywania. Dodatek tego ekstraktu w stężeniu 2,5% do mielonej wieprzowiny nie miał istotnego wpływu ($p \leq 0,05$) na początkowe cechy sensoryczne surowego mięsa. Średnia ocena zapachu mięsa mielonego wieprzowego z dodatkiem w-FACE po 4 i 6 dniach chłodniczego przechowywania była istotnie statystycznie wyższa ($p \leq 0,05$) niż mięsa mielonego wieprzowego bez tego ekstraktu.

Ekstrakty z owoców żurawiny wielkoowocowej wykazują szerokie spektrum przeciwbakteryjnego działania. Duża skuteczność hamowania wzrostu patogenów w mielonej wieprzowinie oraz korzystne cechy organoleptyczne podczas chłodniczego przechowywania przez 6 dni sugerują możliwość użycia wodnego ekstraktu z owoców żurawiny jako naturalnego konserwantu.

Piśmiennictwo

1. Aymerich T., Picouet P. A., Monfort J. M.: Decontamination technologies for meat products. Meat Sci. 2008, 78, 114-129.
2. Aziz N. H., Farag S. E., Mousa L. A., Abo-Zaid M. A.: Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios 1998, 93, 43-54.
3. Borges G., Degeneve A., Mullen W., Crozier A.: Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. J. Agr. Food Chem. 2010, 58, 3901-3908.
4. Caillet S., Côté J., Doyon G., Sylvain J.-F., Lacroix M.: Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts. Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts. Food Res. Int. 2011, 4, 1408-1413.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard (M07-A8) (8th ed). Clin. Lab. Standard. Inst. Publ., Wayne 2009.
6. Côté J., Caillet S., Doyon G., Sylvain J. F., Lacroix M.: Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. Crit. Rev. Food Sci. 2010, 50, 666-679.

7. Gadallah M. G. E., Fattah A. A. A.: The antibacterial effect of mango seed kernel powder in minced beef during refrigerated storage. *World J. Dairy Food Sci.* 2011, 6, 219-228.
8. Ganhão R., Morcuende D., Estévez M.: Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Sci.* 2010, 85, 402-409.
9. Herald P. J., Davidson P. M.: Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. *J. Food Sci.* 1983, 48, 1378-1379.
10. Holzapfel W. H.: The Gram-positive bacteria associated with meat and meat-products, [w:] Davies A., Board R. (red.): *Microbiology of Meat and Poultry*, Blackie Academic & Professional, London 1998, s. 53.
11. ISO Standard No. 8586-1. Sensory Analysis – General Guidance for the Selection, Training and Monitoring of Assessors. *Internat. Org. Standard.*, Geneva 1993.
12. Kathirvel P., Gong Y., Richards M. P.: Identification of the compound in a potent cranberry juice extract that inhibits lipid oxidation in comminuted muscle. *Food Chem.* 2009, 115, 924-932.
13. Lacombe A., Wu V. C. H., Tyler S., Edwards K.: Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 139, 102-107.
14. Lin L.-Z., Harnly J. M.: A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all materials. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1084-1096.
15. Narwojsz A., Borowska E. J.: Cranberry and strawberry juices – Influence of method production on antioxidants content and antioxidative capacity. *Pol J. Nat. Sci.* 2010, 25, 209-214.
16. Nohynek L. J., Alakomi H. L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K. M., Riitta H., Puupponen-Pimiä R. H.: Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr. Cancer* 2006, 54, 18-32.
17. Novak J. S., Juneja V. K.: Effects of refrigeration or freezing on survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in under-cooked ground beef. *Food Control* 2003, 14, 25-30.
18. Onyango L. A., Dunstan R. H., Gottfries J., von Eiff C., Roberts T. K.: Effect of low temperature on growth and ultra-s of *Staphylococcus* spp. *PLoS ONE* 2012, 7 (1), e29031.
19. 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. *J. Appl. Microbiol* 2005, 98, 991-1000.
20. Raghavan S., Richards M. P.: Comparison of solvent and microwave extracts of cranberry press cake on the inhibition of lipid oxidation in mechanically separated turkey. *Food Chem.* 2007, 102, 818-826.
21. Stewart J. R., Artime M. C., O'Brian C. A.: Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J. Nutr.* 2003, 133 (7 Suppl.), 2440-2443.
22. Sun J., Liu R. H.: Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2006, 241, 124-134.
23. Sun Y., Yolitz J., Alberico T., Sun X., Zou S.: Lifespan extension by cranberry supplementation partially requires SOD2 and is life stage independent. *Exp. Gerontol.* 2014, 50, 57-63.
24. Vasileiou I., Katsargyris A., Theocharis S., Giaginis C.: Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. *Nutr. Res.* 2013, 33, 595-607.
25. Wu V. C. H., Qiu X. J., Bushway A., Harper L.: Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT Food Sci. Tech.* 2008, 41, 1834-1841.
26. Wu V. C. H., Qiu X. J., de los Reyes B. G., Lin C. S., Pan Y. P.: Application of cranberry concentrate (*Vaccinium macrocarpon*) to control *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and its antimicrobial mechanism related to the down regulated *slp*, *hdeA* and *cfa*. *Food Microbiol.* 2009, 26, 32-38.

Adres autora: dr inż. Agata Stobnicka, ul. Czerniakowska 16, 00-701 Warszawa; e-mail: agsto@ciop.pl