

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti cinamaldehida i karvakrola na mikroorganizme prenosive hranom

Velebit Branko¹, Matekalo-Sverak Vesna¹, Petrović Zoran¹, Lakićević Brankica¹, Janković Vesna¹, Lilić Slobodan¹, Vranić Danijela¹

S a d r ž a j: Cilj ovog rada bio je da se ispita antimikrobna aktivnost cinamaldehida i karvakrola pri različitim koncentracijama na grupu od 12 odabranih patogenih mikroorganizama i mikroorganizama uzročnika kvara hrane. Cinamaldehyd i karvakrol razređeni su u nizu lipofilnih i hidrofilnih rastvora do koncentracija od 0,5%, 1%, 2% i 3%. Suspenzije ispitivanih mikroorganizama razređene su do turbidometrijske konstante 1 McFarland jedinice i površinski, u količini od 0,1 mL, zasejane na triptozni soja agar. Nakon apsorpcije inokuluma, na sredinu ploče postavljeni su nanofibrilarni celulozni diskovi na koje je pipetirano po 32 µL odgovarajuće koncentracije cinamaldehida, odnosno karvakrola. Nakon inkubiranja, pri odgovarajućim temperaturama, izmereni su poluprečni zona inhibicije rasta svakog od ispitivanih mikroorganizama. Rezultati ispitivanja pokazali su da cinamaldehyd poseduje znatno jaču antibakterijsku aktivnost prema fekalnim kontaminantima iz familije Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Typhimurium*) kao i prema *Enterococcus faecalis* u odnosu na karvakrol. U pogledu klasičnih uzročnika kvara hrane, kod *Clostridium perfringens* cinamaldehyd je takođe ispoljio jaču antibakterijsku aktivnost u odnosu na karvakrol, i to pri nižim koncentracijama (1%), međutim kada su u pitanju *Brochothrix thermosphacta* i *Lactobacillus sakei*, nije bilo statistički značajne razlike u jačini inhibicije cinamaldehydom i karvakrolom. Prednost cinamaldehida ogleda se i u jačoj inhibiciji rasta *Listeria monocytogenes*, dok karvakrol znatno jače inhibira rast *Staphylococcus aureus* u odnosu na cinamaldehyd. Nijedna od ispitivanih supstanci nije inhibirala rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Ovi rezultati pružaju početnu osnovu za eksperimentalno primenu prirodnih antimikrobnih aditiva u aktivnim pakovanjima hrane.

Ključne reči: antimikrobno pakovanje, cinamaldehyd, karvakrol.

Uvod

Kontaminacija hrane patogenim mikroorganizmima i mikroorganizmima – uzročnicima kvara hrane predstavlja jedno od strateških pitanja za javno zdravlje, kako za subjekte u poslovanju hranom, tako i za potrošače. Najosetljivijim kategorijama hrane smatraju se meso (crvena mesa i pileće meso) i proizvodi od mesa, riba, jaja, pojedini proizvodi od mleka (sirevi), itd. Patogeni mikroorganizmi i uzročnici kvara, najčešće detektovani u hrani, uključuju *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (i enterohemoragične serotipove kao O157), *Salmonella* vrste, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* vrste, *Clostridium perfringens*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, kao i bakterije mlečne kiseline. Rast i preživljavanje ovih mikroorganizama u hrani zavisi od unutrašnjih faktora hrane, kao što su pH vred-

nost, aktivnost vode i koncentracija kiseonika – u slučajevima kada je hrana upakovana u zaštitnu atmosferu gasova, kao i od spoljnih faktora povezanih sa uslovima čuvanja hrane: temperature čuvanja, relativne vlažnosti vazduha i vremena čuvanja (Radetić i dr., 2007). Kao mere prevencije rasta patogene flore i uzročnika kvara, u preradi hrane, koriste se različiti procesi, a najčešće termički tretman, salamurenje, dimljenje i sušenje.

Poslednjih nekoliko godina, zahvaljujući promenama u životnom standardu, razvoju novih tehnologija i dostupnosti informacijama, evoluirali su svest i navike potrošača, pa se danas iskazuje veći interes za hranu koja je bezbedna, sveža, ali pri tom i minimalno obrađena. Nove navike primorale su proizvođače da razvijaju nove metode za produženje održivosti hrane. Krajem 90-ih godina 20. veka proizvođači su se intenzivno okrenuli konceptu aktivnog pakovanja hrane (Velebit i Petrović, 2012). Ova tehnika prvobitno

Napomena: Rad je proistekao iz projekta III 46009, koji u periodu 2010–2014. godine finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

¹Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11000 Beograd, Republika Srbija.

je bila usmerena na sprečavanje naknadne kontaminacije proizvoda i redukcije mikroorganizama uzročnika kvara dodavanjem sintetičkih antimikrobnih aditiva (benzojeva kiselina, EDTA, triklozan, imazalil, i dr.). Međutim, veoma brzo na površinu su isplivali negativni aspekti ovog koncepta: potrošači su pokazali sumnjičavost i/ili odbojnost prema proizvodima tretiranim sintetičkim aditivima usled straha od sporednih efekata ovih supstanci na zdravlje ljudi; tretiranje proizvoda ovim aditivima nije bilo ekonomski opravdano budući da se hrana kontaminira sa spoljne strane i konačno, neki od korišćenih antimikrobnih aditiva menjali su organoleptička svojstva hrane.

Uvidevši negativne aspekte korišćenja sintetičkih antimikrobnih agenasa, proizvođači su se okrenuli prirodnim antimikrobnim jedinjenjima. Kao najjeftinija i najefikasnija jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem pokazala su se esencijalna ulja biljaka i/ili njihove aktivne komponente. Prirodni izvor ovih supstanci su bosiljak, majčina dušica, cimet, origano, ruzmarin i karanfilić. Esencijalna ulja dobijena iz ovih biljaka su isparljiva i poseduju jak miris, a po hemijskoj strukturi mešavine su terpenoida, aldehida, ketona, estera, kiselina i alkohola. Kao sekundarni metaboliti biljaka u ovim uljima nalaze se prirodna antimikrobna jedinjenja, kao što su eugenol, karvakrol, cinamaldehyd, metil-klavikol, linaool itd. Mehanizam antimikrobnog delovanja zasnovan je na prisustvu hidrofilnih grupa, najčešće –OH grupe vezane za fenolni prsten i/ili lipofilnosti. Zahvaljujući hemijskoj strukturi, esencijalna ulja uništavaju mikroorganizme oštećenjem citoplazmatske membrane, koagulacijom intraplazmatskog sadržaja, inhibicijom sinteze proteina, kao i kočenjem i inhibicijom jonskog transporta što za posledicu ima difuziju intraplazmatskog sadržaja u intercelularni prostor, odnosno spoljnu sredinu.

Cinamaldehyd je aktivna komponenta koja se nalazi u esencijalnom ulju ekstrahovanom iz cimeta (*Cinnamomum verum*). Prvi put izolovali su ga Dumas i Peliglot iz esencijalnog ulja cimeta 1834. godine, a veštački ga je sintetisao Chiozza 1854. godine (Anonymous, 1898). Po hemijskoj strukturi je 3-fenilprop-2-enal, dakle poseduje fenolnu grupu zakačenu za nezasićeni aldehyd, pa je strukturno sličan akroleinu. U industriji hrane koristi se kao poboljšivač ukusa (9 mg/kg – 5 g/kg) za konditorske proizvode i pića. Duži niz godina cinamaldehyd se koristi kao aktivna supstanca u preparatima za suzbijanje ili redukciju halitoze (pojava neprijatnog zadaha iz usne duplje), budući da inhibitorno deluje na anaerobne streptokoke koje naseljavaju dorzalnu stranu jezika. Gutierrez i dr. (2009) opisali su antimikrobni uticaj 1–4% rastvora cinamaldehyda na odabrane patogene mikroorganizme i ustanovili da potpuno in-

hibiše rast *Penicillium commune*, *Candida albicans*, *Debaromyces hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium roqueforti*, kao i *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Enterococcus faecalis*. Lopez i dr. (2007) su dokazali da impregniranjem polipropilenskih i polietilenskih zaštitnih filmova rastvorima cinamaldehyda različite koncentracije dolazi do potpune eliminacije *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* i *Candida albicans* u upakovanoj hrani. Rodriguez-Lafuente i dr. (2010) pokazali su da pakovanje kriški hleba parafinskim filmovima impregniranim sa 3–6% cinamaldehydom dovodi do potpune inhibicije rasta gljivice *Alternaria alternata*.

Karvakrol je aktivna komponenta koji se nalazi u esencijalnom ulju ekstrahovanom iz origana (*Origanum vulgare*) i majčine dušice (*Thymus vulgaris*). Po hemijskoj strukturi je 5-izopropil-2-metilfenol. Antimikrobno dejstvo karvakrola relativno je dobro opisano u naučnoj literaturi. Tako su Lin i dr. (2004) ustanovili da ovo jedinjenje dobro inhibira rast *Listeria monocytogenes*, dok su Friedman i dr. (2004) izvestili da je inhibitorni efekat karvakrola na rast *Salmonella enterica* jači nego efekat na rast *Escherichia coli*. Becerril i dr. (2007) implementirali su karvakrol u zaštitni film i ispitivali uticaj na rast koagulaza pozitivnih stafilokoka i *Escherichia coli*. Pri tome su dokazali da karvakrol za 90 minuta uništava *Escherichia coli*, odnosno za 104 minuta *Staphylococcus aureus*. Bagamboula i dr. (2004) dokazali su da ispiranje salate kontaminirane vrstom *Shigella sonnei* sa 1% rastvorom karvakrola dovodi do smanjenja populacije bakterija ispod limita detekcije. Rodriguez-Lafuente i dr. (2010) ispitivali su uticaj karvakrola na rast *Alternaria alternata* i dokazali da ovo jedinjenje u potpunosti inhibira rast ove vrste gljivice. Osim efikasne inhibicije rasta patogenih mikroorganizama, karvakrol inhibiše i rast mikroorganizama – uzročnika kvara, što su pokazali Tepe i dr. 2004. godine (inhibicija rasta *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* itd.).

Metode za dobijanje preliminarnih informacija o jačini antimikrobnog dejstva aktivnih komponenti uključuju agar difuziju, dilucionu metodu (rastvaranje u bujonu ili agaru) kao i korišćenje mikroatmosfera (*Davidson i Zivanovic*, 2003). Agar difuzija koristi se dugi niz godina kao metoda najmanje zahtevna za izvođenje, ali loša strana ove metode je što je samo kvalitativna. Naime, većina aktivnih supstanci rastvorljiva je isključivo u hidrofobnim rastvaračima, što za posledicu ima slabo difundovanje u agar pri niskim radnim koncentracijama i formiranje nejasne zone inhibicije.

Cilj ovog rada bio je da se ispita antimikrobno dejstvo cinamaldehida i karvakrola na grupu mikroorganizama odabranih tako da predstavljaju karakterističnu patogenu floru, odnosno uzročnike kvara.

Materijal i metode

U ovom radu korišćeni su aktivne komponente cinamaldehyd (>93%, Sigma Aldrich, Nemačka) i karvakrol (> 99,8%, Sigma Aldrich, Nemačka). Sva-ka supstanca rastvorena je u 0,3% dimetilsulfoksidu (Sigma Aldrich, Nemačka), a zatim su u 9% etanolu napravljena sledeća razređenja cinamaldehyda, odnosno karvakrola: 0,5%, 1%, 2% i 3% (w/w). Slep-ju probu predstavljao je 9% etanol bez dodataka aktivnih komponenti. Pripremljeni rastvori čuvani su u sudovima od tamnog stakla pri temperaturi od 1°C do početka ogleada.

Kao eksperimentalni model korišćeno je 12 so-jeva sledećih mikroorganizama: *Brochothrix ther-mosphacta* (ATCC 11509), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) *Escherichia coli* (ATCC 11303), *Es-cherichia coli* O157:H7 (ATCC 35150), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Listeria monocytogenes* 4b (ATCC 19115), *Lactobacillus sakei* (ATCC 15521), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mi-rabilis* (ATCC 25933), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) i *Sal-monella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimuri-um (ATCC 14028). „Stock“ kulture svakog mikro-organizma čuvane su u krioampulama (Microbank, USA) pri temperaturi od -30°C. Za potrebe ogleada, kulture su oživljene i to tako da je po 100 µL sadr-žaja krioampule ili 2 inokulatorne perlice („beads“), aseptično pipetirano u 10 mL triptoznog soja bujona sa 0,6% ekstrakta kvasca (TSBYE, Oxoid, UK). Kul-ture su inkubirane pri odgovarajućim temperaturama tokom 18–24 časa, odnosno 48 časova (*Lactobacillus sakei*). Kao rastvor za razređenja suspenzije mikro-organizama korišćena je puferovana peptonska voda (BPW, Merck, Nemačka). Suspenzije mikroorgani-zama turbidometrijski su normalizovane na 1 McFar-land jedinicu, tako da je prosečan broj mikroorgani-zama po jedinici zapremine inokuluma iznosio oko 3×10^8 CFU/mL. Po 0,1 mL pripremljenog inokuluma svakog mikroorganizma površinski je (korišćenjem etalera) zasejano na triptozni soja agar (TSA, Oxoid, UK) u Petrijevim pločama prečnika 90 mm.

Nakon apsorpcije inokuluma u agar, pri sob-noj temperaturi u trajanju od 15 minuta, u sredinu svakog agara aseptično je apliciran po jedan nano-fibrilarni celulozni disk (Celluforce, USA) prečnika 9 mm u koji je pipetirano po 32 µL odgovarajućeg razređenja cinamaldehyda, odnosno karvakrola. TSA

ploče, potom, su inkubirane tokom 24/48 časova pri odgovarajućim temperaturama. Eksperiment je po-novljen tri puta.

Nakon inkubiranja, izmeren je poluprečnik zone inhibicije rasta mikroorganizama za svaku sup-stancu određenog razređenja korišćenjem digitalnog Vernijerovog merila (Mitutoyo, Tokio, Japan).

Za obradu rezultata korišćen je statistički pro-gramski paket Minitab 16.2 (Minitab Inc, USA).

Rezultati i diskusija

U tabeli 1 prikazani su rezultati merenja zona inhibicije rasta mikroorganizama nastalih delova-njem različitih koncentracija cinamaldehyda. Slep-ja proba nije inhibirala rast nijednog ispitiva-nog mikroorganizma. Najjači inhibitorni efekat cinamaldehyd je ispoljio prema *C. perfringens* (5,29–20,60 mm), *E. faecalis* (8,28–19,40 mm) i *L. sakei* (4,80–11,10 mm), čak i pri koncentracija-ma od 0,5%. *S. cerevisiae* pokazao je apsolutnu rez-istentnost na cinamaldehyd pri svim ispitivanim koncentracijama. Fekalni kontaminanti iz familije *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *E. coli* O157:H7, *P. mi-rabilis* i *S. Typhimurium*) takođe su dobro inhibira-ni, s tim da razlika u širini inhibitorne zone *E. coli* (0,00–5,40 mm) nije statistički značajna ($P = 0,910$) u poređenju sa *S. Typhimurium* (0,86–6,93 mm), što nije u skladu sa rezultatima koje su dobili Lopez i dr. (2007). Indikativno je da je soj enterohemoragične *E. coli* (O157:H7) u poređenju sa sojem apatogene *E. coli* imao statistički značajno veću zonu inhibici-je ($p = 0,037$) za ceo opseg ispitivanih koncentracija. Rast aerobnih pseudomonada (*P. aeruginosa*) kao i *B. thermosphacta* nije bio inhibiran pri koncentraciji cinamaldehyda od 0,5%, ali je *B. thermosphacta* bio statistički značajnije inhibiran ($p = 0,0048$) u odnosu na *P. aeruginosa* pri koncentracijama između 1–3% (2,20–6,98 mm naspram 0,32–1,48 mm). U pogle-du antimikrobnog dejstva cinamaldehyda na *L. mo-nocytogenes* i *S. aureus*, obe vrste mikroorganizama bile su inhibirane, ali utvrđena je statistički značaj-nija inhibicija ($p = 0,0248$) na stafilokoke nego na *L. monocytogenes*. Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazom *Wendakoona i Sakaguchija*, 2001. i delimično sa nalazom *Rodriguez-Lafuente i dr.*, 2010.

U tabeli 2. prikazani su rezultati merenja zona inhibicije rasta mikroorganizama nastalih delova-njem različitih koncentracija karvakrola. Najjači in-hibitorni efekat karvakrol je ispoljio prema *S. aureus* (7,24–15,10 mm) i *L. sakei* (5,23–9,32 mm). *S. cere-visiae* i *P. aeruginosa* pokazali su apsolutnu rezisten-tnost na karvakrol pri svim ispitivanim koncentracija-ma. *E. faecalis* i *L. monocytogenes* bili su rezistentni

Tabela 1. Antimikrobna aktivnost cinamaldehida na rast ispitivanih mikroorganizama
Table 1. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde on growth of test microorganisms

Ispitivani mikroorganizam/ Test microorganism	Poluprečnik zone inhibicije ± SD, (mm)/ Radius of inhibitionzone ± SD, (mm)			
	0,5%	1%	2%	3%
<i>B. thermosphacta</i>	ND	2,20 ± 0,030	3,47 ± 0,189	6,98 ± 0,042
<i>C. perfringens</i>	5,29 ± 0,117	5,59 ± 0,213	17,07 ± 0,454	20,60 ± 0,488
<i>E. coli</i>	ND	3,31 ± 0,086	4,94 ± 0,140	5,40 ± 0,084
<i>E. coli O157:H7</i>	1,11 ± 0,095	4,77 ± 0,076	7,32 ± 0,261	8,55 ± 0,190
<i>E. faecalis</i>	8,28 ± 0,335	10,80 ± 0,355	14,01 ± 0,384	19,40 ± 0,647
<i>L. monocytogenes</i>	ND	1,51 ± 0,122	4,00 ± 0,926	4,94 ± 1,280
<i>L. sakei</i>	4,80 ± 0,181	6,47 ± 0,332	10,10 ± 0,196	11,10 ± 0,340
<i>P. aeruginosa</i>	ND	0,32 ± 0,015	1,01 ± 0,023	1,48 ± 0,021
<i>P. mirabilis</i>	ND	0,93 ± 0,092	4,24 ± 0,246	6,13 ± 0,264
<i>S. aureus</i>	1,66 ± 0,198	4,05 ± 0,172	6,32 ± 0,200	6,95 ± 0,067
<i>S. cerevisiae</i>	ND	ND	ND	ND
<i>S. Typhimurium</i>	0,86 ± 0,097	1,54 ± 0,111	4,78 ± 0,219	6,93 ± 0,214

Legenda/Legend: ND – nije detektovano/not detected

Tabela 2. Antimikrobna aktivnost karvakrola na rast ispitivanih mikroorganizama
Table 2. Antimicrobial activity of carvacrol on growth of test microorganisms

Ispitivani mikroorganizam/ Test microorganism	Poluprečnik zone inhibicije ± SD, (mm)/ Radius of inhibitionzone ± SD, (mm)			
	0,5%	1%	2%	3%
<i>B. thermosphacta</i>	ND	3,19 ± 0,253	6,42 ± 0,423	7,56 ± 0,409
<i>C. perfringens</i>	ND	1,93 ± 0,208	2,59 ± 0,272	5,33 ± 0,603
<i>E. coli</i>	ND	1,47 ± 0,337	3,58 ± 0,301	4,36 ± 0,335
<i>E. coli O157:H7</i>	ND	ND	2,23 ± 0,225	4,41 ± 0,190
<i>E. faecalis</i>	ND	ND	ND	2,09 ± 0,348
<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	ND	1,00 ± 0,211
<i>L. sakei</i>	5,23 ± 0,135	5,75 ± 0,186	7,20 ± 0,295	9,32 ± 0,530
<i>P. aeruginosa</i>	ND	ND	ND	ND
<i>P. mirabilis</i>	ND	ND	1,21 ± 0,465	2,80 ± 0,543
<i>S. aureus</i>	7,24 ± 0,333	8,23 ± 0,253	10,10 ± 0,401	15,10 ± 0,775
<i>S. cerevisiae</i>	ND	ND	ND	ND
<i>S. Typhimurium</i>	ND	ND	1,56 ± 0,397	3,38 ± 0,411

Legenda/Legend: ND – nije detektovano/not detected

na delovanje karvakrola u opsegu koncentracija od 0,5–2%, dok je zona inhibicije pri koncentraciji od 3% bila minimalna (2,09 mm, odnosno 1 mm). *P. mirabilis* i *S. Typhimurium* bili su inhibirani delovanjem 2%, odnosno 3% karvakrola, pri čemu razlika u poluprečniku zona inhibicije nije imala statističku značajnost ($p = 0,412$), a po apsolutnim vrednostima bile su slične zonama inhibicije *E. faecalis* i *L. monocytogenes* (1,21–2,80 mm odnosno 1,56–3,38 mm). *E. coli* i *E. coli* O157:H7 ispoljile su rezistentnost prema 0,5% karvakrolu, odnosno 1% karvakrolu (*E. coli* O157:H7), dok razlike u širini zona pri 2% odnosno 3% karvakrolu nisu pokazale statističku značajnost ($p = 0,254$). Tipični mikroorganizmi kvara *B. thermosphacta* i *C. perfringens* pokazali su osetljivost na karvakrol tek pri koncentraciji od 1%. *B. thermosphacta*, u celom ispitivanom opsegu koncentracija, imao je veće zone inhibicije u odnosu na *C. perfringens* (statistički veoma značajne, $p = 0,0112$). Dobijeni rezultati slični su sa nalazom Lamberta i dr., 2001.

U ovom radu, uporednim ispitivanjem cinamaldehida i karvakrola pri različitim koncentracijama (rezultati faktorske analize nisu prikazani), ustanovljeno je da je cinamaldehyd imao znatno jaču antibakterijsku aktivnost prema patogenim mikroorganizmima i uzročnicima kvara u hrani nego karvakrol. Moguće objašnjenje ove pojave je hemijska struktura cinamaldehida. Naime, karbonilna grupa cinamaldehida vezuje se za proteine u citoplazmi i u veoma kratkom roku ireverzibilno inhibira ćelijske enzime. Karvakrol, pak, parcijalno dezintegriše citoplazmatsku membranu stvarajući pore u njima, što uzrokuje konstantan transport jona iz citoplazme u spoljnu sredinu, kome se bakterije opiru do momenta dostizanja maksimuma jonskih pumpi. Dakle, oštećenja ćelija nastala delovanjem karvakrola su reverzibilna do određene granice, pa je i vijabilnost ćelija, a time i njihova rezistentnost, duža. Posebno povoljna okolnost je da je antibakterijski efekat cinamaldehida dostignut pri nižim koncentracijama (0,5–1%) što, sa aspekta primene u industriji mesa (sastojak aktivnog pakovanja, itd.) predstavlja manji rizik za difuziju u lipofilnu fazu mesa, a time i manji rizik za promenu senzorskih svojstava proizvoda.

Iako cinamaldehyd i karvakrol imaju GRAS status (*generally recognized as safe*), prilikom aplikovanja ovih komponenti (zaštitni filmovi, poboljšivači ukusa, sastojci parfema, dijetetski proizvodi, itd.) neophodno je voditi računa o njihovoj toksičnosti. Cinamaldehyd se komercijalno dobija iz cejlonskog cimeta (*Cinnamomum zeilanicum*) ili iz kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*). Kineski cimet daleko je jeftiniji od cejlonskog, a razlikuju se i u senzorskim svojstvima (kineski je kiseliji, cejlonski ima floralnu notu). Sa aspekta toksičnosti, kine-

ski cimet u sebi sadrži visoke doze kumarina (0,5%), dok cejlonski sadrži kumarin tek u tragovima. Ukoliko se cimet povremeno unosi kao začim, smatra se da je bezbedan po zdravlje ljudi. Međutim, ukoliko se unosi kao medicinski proizvod (prah cimeta u obliku mikrokapsula za terapiju *diabetes melitusa* tip II), dokazano je da prekomernom i dugotrajnom upotrebom uzrokuje hepatocelularna oštećenja, kao i narušavanje funkcije jetre sa mogućnošću nastanka hepatokarcinoma (Mereto i dr., 1994; JECFA, 2001). Pored ovih promena, opisano je i da cinamaldehyd kao sastojak parfema pri koncentracijama od 8% uzrokuje alergijske promene na koži u vidu eritema i/ili urtikarija (Johansen i dr., 1996; Temesvari i dr., 2002). Smatra se da je prihvatljiva dnevna doza za unos cimeta 0,063 g/kg telesne mase/danu.

Karvakrol se najčešće dobija iz esencijalnih ulja origana (*Origanum vulgare*), majorana (*Origanum majorana*) i timijana (*Thymus vulgaris*) koja sadrže od 50–80% karvakrola. Podaci o toksičnosti karvakrola nisu konzistentni, zna se da je LD₅₀ za pacove 810 mg/kg odnosno pretpostavlja se da je LD₅₀ za ljude između 50 i 500 mg/kg. Zbog svoje fenolne strukture, karvakrol je izrazito korozivan za kožu i sluzokožu, produženi kontakt sa kožom uzrokuje denaturaciju proteina, gangrenu, a potom i nekrozu. Nakon ingestije jedne kafene kašike karvakrola, u roku od 3–5 dana nastupaju hepatotoksične promene sa razvojem ikterusa (žutice). Izlaganje parama karvakrola dovodi do fotofobije, ali i korozivnih oštećenja sluznice respiratornog trakta.

Zaključak

Cinamaldehyd poseduje niz prednosti kao antibakterijska supstanca:

- ima izraženo znatno jače antibakterijsko dejstvo na patogene mikroorganizme i uzročnike kvara nego karvakrol;
- inhibitorni efekat cinamaldehida na rast mikroorganizama pojavljuje se pri nižim koncentracijama u odnosu na karvakrol;
- znatno manje je korozivan u odnosu na karvakrol.

Prednost korišćenja karvakrola ogleda se u znatno nižoj toksičnosti u odnosu na cinamaldehyd. Obe ispitivane antimikrobne aktivne komponente mogu se smatrati efikasnim sredstvima za konzervisanje hrane i poželjnim prirodnim antimikrobnim agensima. Trebalo bi detaljno da se ispita eventualna mogućnost sinergističkog delovanja obe komponente, ali neophodno je razviti realističke modele pakovanja hrane kako bi se proširila dosadašnja saznanja.

Literatura

- Anonymous, 1898.** "Oleum Cinnamomi (U.S.P.) – Oil of Cinnamon." King's American Dispensatory. http://www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/kings/cinnamomum_oleu.html.
- Bagamboula C. F., Uyttendaele M., Debevere J., 2004.** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiology 21(1): 33–42.
- Becerril R., Gomez-Lus R., Goni P., Lopez P., Nerin C., 2007.** Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 388, 5, 1003–11.
- Davidson P. M., Zivanovic S., 2003.** The use of natural antimicrobials. In: Zeuthen P, Bogh Sorensen L, editors. Food preservation techniques. Boca Raton, Fla.: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC., 5–30.
- Friedman M., Henika P. R., Levin C. E., Mandrell R.E., 2004.** Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 19, 6042–8.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P., 2009.** Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiology 26, 2, 142–50.
- JECFA 2001.** Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additives Series No. 46, Genf.
- Johansen J. D., Andersen K. E., Rastogi S. C., Menne T., 1996.** Threshold responses in cinnamic-aldehyde-sensitive subjects: results and methodological aspects. Contact Dermatitis. Mar, 34, 3, 165–71.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P., Nychas G. J. E., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91, 453–462.
- Lin Y. T., Labbe R. G., Shetty K., 2004.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. Applied and Environmental Microbiology 70, 9, 5672–8.
- Lopez P., Sanchez C., Batlle R., Nerin C., 2007.** Development of flexible antimicrobial film using essential oils as active agents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 21, 8814–24.
- Mereto E., Brambilla-Campart G., Ghia M., Martelli A., Brambilla G., 1994.** Cinnamaldehyde-induced micronuclei in rodent liver. Mutatio Research, 322, 1, 1–8.
- Radetić P., Milijašević M., Jovanović J., Velebit B., 2007.** Pakovanje svežeg mesa u modifikovanoj atmosferi – trend koji traje! Međunarodno 54. savetovanje industrije mesa, Vrnjačka Banja, 2007. godine, Tehnologija mesa, 48, 1–2, 99–108.
- Rodriguez-Lafuente A., Nerin C., Batlle R., 2010.** Active paraffin-based paper packaging for extending the shelf life of cherry tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 11, 6780–6.
- Temesvári E., Németh I., Baló-Banga M. J., Husz S., Kohánka V., Somos Z., Judák R., Remenyik E. V., Szegedi A., Nebenführer L., Mészáros C., Horváth A., 2002.** Multicentre study of fragrance allergy in Hungary. Immediate and late type reactions. Contact Dermatitis, 46, 6, 325–30.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen M., Polissiou M., Sokmen A., 2004.** *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5, 1132–7.
- Velebit B., Petrović Z. 2012.** Antimikrobna pakovanja u industriji hrane. Tehnologija mesa, 51, 1, 71–79.
- Wendakoon C. N., Sakaguchi M., 1995.** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. Journal of Food Protection, 58, 3, 280–283.

Study of antimicrobial activity of cinnamaldehyde and carvacrol against foodborne microorganisms

Velebit Branko, Matekalo-Sverak Vesna, Petrović Zoran, Lakićević Brankica, Janković Vesna, Lilić Slobodan, Vranić Danijela

S u m m a r y: Aim of the paper was to study antimicrobial activity of cinnamaldehyde and carvacrol at different concentrations on the panel of 12 selected and characteristic food pathogens and spoilage microorganisms. Cinnamaldehyde and carvacrol were diluted in a set of lipophilic and hydrophilic diluents down to concentrations of 0.5%, 1%, 2% and 3%, respectively. Suspensions of the test microorganisms were diluted down to 1 McFarland turbidometric unit and 0.1 mL of prepared inoculum was surface inoculated on tryptic soy agar. After absorption of inoculum, a nanofibrillic cellulose disc has been applied at the center of the each Petri dish and 32 μ L of respective dilution of cinnamaldehyde and carvacrol was pipetted. After subsequent incubation, radius of inhibition zone for each tested microorganism had been measured. Results of the study indicated that the strongest inhibitory effect of cinnamaldehyde occurred in *C. perfringens* (5.29–20.60 mm), *E. faecalis* (8.28–19.40 mm) and *L. sakei* (4.80–11.10 mm) even at the lowest concentration (0.5%). *S. cerevisiae* proved to be absolutely resistant at all concentrations tested. Faecal Enterobacteriaceae contaminants (*E. coli*, *E. coli* O157:H7, *P. mirabilis* and *S. Typhimurium*) have also been quite inhibited, while the difference of *E. coli* inhibition zones (0,00–5.40 mm) compared to those of *S. Typhimurium* (0.86–6.93 mm) were not statistically significant ($p = 0,910$).

Strain of enterohaemorrhagic *E. coli* (O157:H7) exhibited statistically significant wider zone of inhibition when being compared with nonpathogenic *E. coli* ($p = 0.037$) at all concentrations tested. When it comes to spoilage-related microbiota, *B. thermosphacta* and *P. aeruginosa*, there were no growth inhibition at 0.5% of cinnamaldehyde. However, at concentration range from 1% to 3%, *B. thermosphacta* has been more strongly inhibited ($p = 0.0048$) than *P. aeruginosa* (2.20–6.98 mm versus 0.32–1.48 mm, respectively). Regarding antimicrobial activity of cinnamaldehyde to *L. monocytogenes* and *S. aureus*, both microorganisms were inhibited, where as *S. aureus* was statistically significantly inhibited than *L. monocytogenes* ($p = 0.0248$). The most potent inhibition on growth carvacrol exhibited on *S. aureus* (7.24–15.10 mm) and *L. sakei* (5.23–9.32 mm). *S. cerevisiae* and *P. aeruginosa* were absolutely resistant to it. *E. faecalis* and *L. monocytogenes* were resistant at concentration range from 0.5%–2%, while the inhibition zone at 3% was minimal (2.09 mm and 1 mm, respectively). *P. mirabilis* and *S. Typhimurium* were inhibited at 2% and 3%, respectively and there was no statistically significant difference in radius of inhibition zones ($p = 0.412$), while absolute values of inhibition radius were as similar as those of *E. faecalis* and *L. monocytogenes* (1.21–2.80 mm and 1.56–3.38 mm, respectively). *E. coli* and *E. coli* O157:H7 were resistant at 0.5% and 1% carvacrol, respectively, whereas there was no statistically significant difference in radius of inhibition zones which occurred at 2% and 3% ($p = 0.254$). Food-spoilage microbiota, *B. thermosphacta* and *C. perfringens* were sensitive to carvacrol starting at 1%. *B. thermosphacta* had through all concentrations tested, wider and statistically significant inhibition zones compared to *C. perfringens* ($p = 0.0112$). These results establish starting point for experimental application of the natural antimicrobial additives in active food packaging.

Key words: antimicrobial packaging, cinnamaldehyde, carvacrol.

Rad primljen: 23.10.2012.

Rad ispravljen: 31.10.2012.

Rad prihvaćen: 1.11.2012.