

**ILLÓOLAJOK ÉS KOMBINÁCIÓIK HATÁSA  
ÉLELMISZERROMLÁST OKOZÓ MIKROORGANIZMUSOKRA**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette:

**TSERENNADMID RENTSENKHAND**

Témavezető:

Dr. Krisch Judit

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba

Biológia Doktori Iskola

Mikrobiológiai Tanszék  
Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar

2010  
Szeged

## TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke .....	5
Bevezetés.....	6
<b>1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Az illóolajok jellemzése és története.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Az illóolajok összetevői.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Az illóolajok antimikrobiális hatása .....</b>	<b>9</b>
<i>1.3.1. Az illóolajok hatása baktériumokra .....</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2. Az illóolajok hatása élesztőgombákra .....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3. Az illóolajok hatása fonalas gombákra.....</i>	<i>10</i>
<b>1.4. Egyéb hatások .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. Az illóolajok felhasználása élelmiszerekben .....</b>	<b>12</b>
<i>1.5.1. Illóolajok és élelmiszer-összetevők kölcsönhatása .....</i>	<i>13</i>
<i>1.5.2. Illóolajok növényi eredetű élelmiszerekben .....</i>	<i>13</i>
<i>1.5.3. Illóolajok állati eredetű élelmiszerekben .....</i>	<i>13</i>
<i>1.5.4. Illóolajok és élelmiszerbiztonság - jogi szabályozás .....</i>	<i>14</i>
<b>1.6. A felhasznált illóolajok bemutatása .....</b>	<b>15</b>
<i>1.6.1. Anizs (Pimpinella anisum) .....</i>	<i>15</i>
<i>1.6.2. Boróka (Juniperus communis) .....</i>	<i>15</i>
<i>1.6.3. Citrom (Citrus lemon) .....</i>	<i>16</i>
<i>1.6.4. Édeskömény (Foeniculum vulgare) .....</i>	<i>16</i>
<i>1.6.5. Gyömbér (Zingiber officinale) .....</i>	<i>17</i>
<i>1.6.6. Homoktövis (Hippophae rhamnoides) .....</i>	<i>17</i>
<i>1.6.7. Majoránna (Origanum majorana).....</i>	<i>17</i>
<i>1.6.8. Muskotályzsálya (Salvia sclarea) .....</i>	<i>18</i>
<i>1.6.9. Szőlő (Vitis vinifera) .....</i>	<i>18</i>
<b>1.7. A kísérletek során vizsgált mikroorganizmusok jellemzése .....</b>	<b>18</b>
<i>1.7.1. Gram pozitív baktériumok .....</i>	<i>18</i>
<i>1.7.2. Gram negatív baktériumok .....</i>	<i>19</i>
<i>1.7.3. Élesztőgombák .....</i>	<i>20</i>
<i>1.7.3. Fonalas gombák .....</i>	<i>22</i>
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>24</b>
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>26</b>

3.1. Felhasznált mikroorganizmusok .....	26
3.2. A felhasznált illóolajok és illóolaj összetevők.....	27
3.3. Táptalajok és oldatok .....	28
3.4. Tenyésztési körülmények .....	31
3.5. Antimikrobiális érzékenység vizsgálatok .....	31
3.5.1. <i>Az antimikrobiális hatás tesztelése agardiffúziós lyukteszt módszerrel</i> ....	31
3.5.2. <i>Illóolajok hatása baktériumok és élesztők szaporodási paramétereire</i> .....	32
3.5.3. <i>Az illóolajok spóraölő hatásának tesztelése</i> .....	33
3.5.4. <i>A pH befolyása majoránna olaj antimikrobiális hatására</i> .....	34
3.5.5. <i>Az antimikrobiális hatás tesztelése fonalas gombáknál</i> .....	35
3.5.6. <i>A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása</i> .....	35
3.5.7. <i>Illóolajok és illóolaj komponensek kombinált antimikrobiális hatásának vizsgálata checkerboard módszerrel</i> .....	36
3.5.8. <i>Illóolajok kölcsönhatása élelmiszer összetevőkkel</i> .....	38
3.5.9. <i>Illóolajok antimikrobiális hatása élelmiszerekben</i> .....	38
3.6. Érzékszervi vizsgálatok .....	39
3.7. Alkalmazott statisztikai módszerek .....	40
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS .....	41
4.1. <b>Illóolajok antibakteriális, antifungális hatásának előtesztelése, a megfelelő illóolajok kiválasztása</b> .....	41
4.2. <b>Illóolajok hatása baktériumok és élesztők szaporodási paramétereire</b> .....	43
4.2.1. <i>Illóolajok gátló hatása Gram pozitív baktériumok növekedésére</i> .....	43
4.2.2. <i>Illóolajok hatása Gram negatív baktériumok növekedésének gátlására</i> .....	45
4.2.3. <i>Az illóolajok hatása az élesztőgombák növekedésének gátlására</i> .....	47
4.3. <b>A pH szerepe az illóolajok élesztők elleni hatásában</b> .....	50
4.4. <b>Illóolajok hatása Gram pozitív és Gram negatív baktériumok túlélésére</b> ....	51
4.5. <b>Illóolajok sporocid (spóraölő) hatása</b> .....	52
4.6. <b>Minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározása</b> .....	54
4.6.1. <i>MIC meghatározás baktériumok esetében</i> .....	54
4.6.2. <i>MIC meghatározás élesztők esetében</i> .....	54
4.7. <b>Illóolajok hatása a fonalas gombák telepnövekedésére</b> .....	55
4.8. <b>Az illóolajok kölcsönhatása</b> .....	59
4.8.1. <i>Illóolaj kombinációk kölcsönhatása baktériumok növekedésének gátlására</i> .....	59

4.8.2. <i>Illóolaj kombinációk kölcsönhatása élesztőgombák növekedésének gátlására</i> .....	60
4.9. <b>Illóolajok főkomponenseinek antimikrobiális hatása és kölcsönhatása</b> .....	61
4.9.1. <i>Illóolaj komponensek hatása B. cereusra</i> .....	62
4.9.2. <i>Illóolaj komponensek hatása S. cerevisiae</i> .....	63
4.10. <b>Élelmiszer összetevők kölcsönhatása az illóolajokkal</b> .....	65
4.11. <b>Illóolajok hatása élelmiszerben</b> .....	67
4.11.1. <i>Illóolajok antimikrobiális hatása tejben</i> .....	67
4.11.2. <i>Illóolajok antimikrobiális hatása almalében</i> .....	69
4.11.3. <i>Illóolajok antimikrobiális hatása darált sertéshúsban</i> .....	71
4.11.4. <i>Illóolaj gőztér hatása kenyérpenészesedést okozó penészgombákra</i> .....	72
5. <b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	75
6. <b>SUMMARY</b> .....	78
7. <b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	81
8. <b>A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE</b> .....	90
9. <b>KÖSZÖNÖTNYILVÁNÍTÁS</b> .....	92

## Rövidítések jegyzéke

CFU: telepkepző egységek száma

DMSO: dimetil-szulfoxid

EHEC: enterohemorragiás *E.coli*

EIEC: enteroinvazív *E.coli*

EPEC: enteropatogén *E.coli*

ETEC: enterotoxikogén *E.coli*

FA: *food additive*, élelmiszer adalék

FDA: Food and Drug Administration

FIC: *fractional inhibitory concentration*, frakcionális gátló koncentráció

FICI: *fractional inhibitory concentration index*, frakcionális gátló koncentráció index

GRAS: *generally regarded as safe*, általánosan biztonságosnak tartott

LB: Luria-Bertani táptalaj

MAP: módosított gázösszetételű csomagolási technika

MEA: malátás táptalaj

MEE: kiegészített hústáptalaj

MIC: *minimal inhibitory concentration*, minimális gátló koncentráció

MSC: *minimal sporicidal concentration*, minimális spóraölő koncentráció

QS: *quorum sensing*

ROS: reaktív oxigén származék

TGE: élesztőkivonat-tripton-glükóz táptalaj

$\lambda$  (h): lag fázis

$\mu_m$  (1/h): szaporodási ráta

## BEVEZETÉS

Az utóbbi évek "zöld" mozgalmi és a tudatos vásárlói magatartás elterjedése, valamint a vásárlók idegenkedése a mesterséges élelmiszer összetevőktől, a kutatók és az élelmiszeripar figyelmét természetes és környezetbarát anyagok felé fordította. Az élelmiszergyártásban komoly kihívást jelentenek az élelmiszerrontó mikroorganizmusok és az ellenük való védekezés. A fertőzött élelmiszerek gondot jelentenek az egészségügy számára is; a súlyos, akut megbetegedések mintegy 30%-áért ételmérgezések felelősek. A hagyományos tartósítószer nem csak a fogyasztók ellenérzését váltják ki, de sokszor kellemetlen melléktermékek is keletkezhetnek a használatuk során. A benzooesavból például *S. cerevisiae* és *P. anomala* hatására benzol keletkezhet, míg a szorbinsavat 1,3-pentadiénné dekarboxilezik, ami petróleumszerű szagot eredményez. A *S. pombe* ugyanakkor szulfit jelenlétében kellemetlen szagú és ízű vegyületeket hoz létre (Stratford, 2006).

Mindezekből következően szükségessé vált új, természetes eredetű hatékony antimikrobiális szerek kifejlesztése, amelyek, legalább részben helyettesíthetik a szintetikus tartósítószereket. Az illóolajokat régóta használják az élelmiszeriparban, elsősorban aromaanyagokként, a legtöbbjük rendelkezik a GRAS (általánosan biztonságosnak tekintett) és FA (élelmiszer adalék) besorolással is, a fogyasztók pedig általában elfogadják a használatukat. Felhasználásuknak lényegében egy akadálya van, nagyon erős aromájuk, amely az élelmiszer ízének megváltozásához vezet, ha túl nagy koncentrációban alkalmazzuk őket. Ezért az illóolajokat gyakran vizsgálják kombinációban, így, ha additív vagy szinergista hatást tapasztalnak, kisebb koncentrációban is hatékonyan alkalmazhatók lehetnek.

Munkánk során egyes, kiválasztott illóolajok antimikrobiális hatását teszteltük az élelmiszerekben romlást, illetve élelmiszer eredetű megbetegedést okozó *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli* és *Serratia marcescens* baktériumok, illetve *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *Geotrichum candidum* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgombák, valamint *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* és *Rhizopus stolonifer* penészgombák ellen.

Eredményeink jelentős mértékben bővítették az illóolajok Gram pozitív és Gram negatív baktériumokra, élesztőkre és fonalas gombákra gyakorolt antimikrobiális hatására vonatkozó ismereteket. Az élelmiszerek és az illóolajok kölcsönhatásával kapcsolatos, gyakorlati szempontból is fontos eredményeink, hasznosíthatóak az illóolajok tartósítószerként történő esetleges későbbi felhasználása során.

# 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. Az illóolajok jellemzése és története

Az illóolajok aromatikusan, tömény hidrofób folyadékok, melyeket leggyakrabban vízgőz- desztillációval nyernek a különböző növényi részekből (virágokból, gyümölcsökből, magvakból, virágbimbókból, levelekből, kéregből). A gyógy- és fűszernövények 0,5 - 2,5%-ban tartalmazhatnak illóolajokat, melyeknek jellegzetes illatukat, aromájukat, valamint részben gyógyhatásukat köszönhetik. Az illóolajokat régóta használja a kozmetikai ipar különböző illatszerekben, krémekben, kozmetikumokban, de mostanában egyre nő a szerepük az élelmiszeriparban is, ahol főleg íz-és aromaanyagként hasznosítják őket. Az is régóta ismert, hogy bizonyos illóolajok rendelkeznek baktérium-, gomba-, vírus-, és parazitaellenes hatással, ezért gyógykészítményekben is gyakran találkozhatunk velük (Burt, 2004).

**Illóolaj-történelem:** Már az ókorban használtak illóolajokat, elsősorban testápolás céljára, illatosításra, néha a test festésére, de igazán nagy szerepet a szakrális tevékenységekben kaptak. Szíriában az illóolajos testápolás mindennapos volt a népesség körében, és nem csak a gazdagok között. Az egyiptomiak a halottak balzsamozásához felhasználták az illóolajok baktériumölő és konzerváló hatását. Az olajokat az egészség megőrzésére és gyógyításra is használták. A zsidó kultúrában a tömjént és a mirhát füstölőként és illatszerként alkalmazták, de ismerték fájdalomcsillapító és nyugtató hatásukat is. A kínai kultúrában többféle aromás növényt használtak, és már az egyiptomiak előtt alkalmazták a fahéjat, borsot és a gyömbért járványok ellen. A Védák szerint i.e. 1600-ban, Indiában is ismerték az illatos növényeket. Az egyik legfontosabb gyógymód, a masszázs elképzelhetetlen illóolajok nélkül.

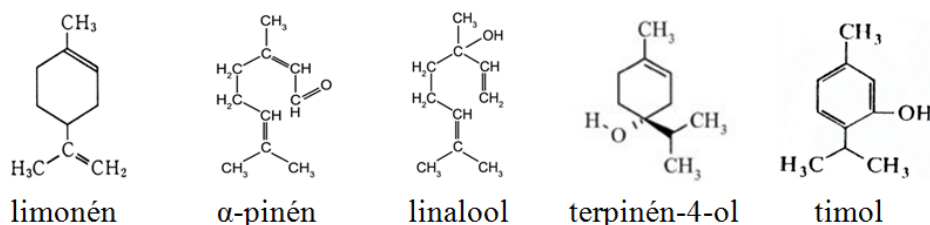
A görög orvostudomány ötvözte a keleti gyógymódokat az egyiptomiakkal. A járványok ellen borókát és babért használtak, a vallási szertartásokon aromás növényekkel füstöltek. A rómaiak szintén felhasználták az aromás növényeket és olajokat. Nagyra becsült fűvük volt a zsálya, amiről azt hitték, minden betegséget gyógyít. A lakásokban kakukkfűvel füstöltek, aratás előtt a munkások kakukkfűteát ittak, hogy megvédjék magukat a kígyómarástól.

A népvándorlások idején az illatszerek eltűntek Európából, az arab orvosok azonban tovább kutatták az illóolajokat, míg végül felfedezték, hogyan lehet lepárlással előállítani őket. A legerősebb illatú növényeket tekintették a leghatékonyabbaknak. A pestisjárványok idején a boróka fájának égetésével védekeztek a fertőzés ellen. A középkort követően az

orvosok és vándor gyógyszerészek eszköztárának fontos részei lettek az illóolajok. A polgárság előretörésével a testápolásban újra fontossá váltak az illatok, egyre többen alkalmaztak illóolajokat. A XX. század kezdetéig a gyógyszerkönyvekben megtalálhatóak voltak a régi, aromaalapú gyógyszerek is. A kis lepárlóüzemek helyét sokhelyütt átvette a nagyüzemi gyártás, ahol kozmetikai célokra mesterségesen is elő tudnak állítani illóolajokat (Frank és Kürti, 2003).

## 1.2. Az illóolajok összetevői

Az illóolajok több mint 50 összetevőből is állhatnak, melyek között a fő komponensek akár 85%-ban jelen lehetnek, míg egyes minor komponensek csupán nyomokban találhatóak meg. Az illóolajok összetevői legnagyobb részben különböző terpének és terpenoidok (oxigén tartalmú terpének): monoterpének (C<sub>10</sub>) vagy szeszkviterpének (C<sub>15</sub>), de kisebb mennyiségben lehetnek diterpének (C<sub>20</sub>) és triterpének is (1. ábra). A terpének felül további jelentős összetevők lehetnek a különböző alacsony molekulatömegű alifás és aromás vegyületek, pl. szénhidrogének, savak, alkoholok, aldehidek, laktonok és kéntartalmú illékony vegyületek. A komponensek mennyisége és aránya változhat az időjárás, a földrajzi elterjedés, és a növényeken belüli egyedi eltérések függvényében (Burt, 2004).



**1. ábra:** Néhány illóolaj összetevő szerkezete

Az illóolajokban kb. 90%-ban monoterpéneket találunk fő összetevőként. A monoterpének két izoprén molekula kondenzációjával jönnek létre, és változatos funkciós csoportjaik alapján több csoportba sorolhatók: szénhidrogének, melyek lehetnek ciklikus szerkezetűek is (terpinének, pinének, szabinén); alkoholok (linalool, gerániol); aldehidek (gerániál, nerál); ketonok (karvon, kámfor); észterek (linalil acetát), fenolok (timol, karvakrol). Az aromás gyűrűt tartalmazó komponensek, mint például a fahéjaldehid, fahéj alkohol, eugenol, esztragon, stb., kevésbé gyakoriak (Bakkali és mtsai, 2008).



### 1.3. Az illóolajok antimikrobiális hatása

A növényi illóolajok antimikrobiális hatása régóta ismert és ma is intenzíven kutatott terület. Hammer és mtsai (1999) 54 növény illóolajának baktérium- és élesztőellenes hatását vizsgálták, Nevas és mtsai (2004) 13 finn fűszernövény illóolajának antibakteriális hatását, míg Viuda-Martos és mtsai (2008) a citrusfélék illóolajának penészgombákra kifejtett hatását tanulmányozták. Számos közlemény jelent már meg az egyes illóolaj komponensek antimikrobiális hatásáról is (Dorman és Deans, 2000; Carson és mtsai, 2002; Bennis és mtsai, 2004; Hammer és mtsai, 2004). Az élelmiszerek eltarthatóságának javítására a természetes eredetű antimikrobiális hatású anyagok, köztük az illóolajok, használata az élelmiszeriparban terjedőben van, mivel a fogyasztók ellenérzése a szintetikus tartósítószerrel szemben egyre nő (Bagamboula és mtsai, 2004; Burt, 2004).

#### 1.3.1. Az illóolajok hatása a baktériumokra

Az illóolajok antibakteriális hatását számtalan humánpatogén (pl. *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*; *Streptococcus pyogenes*, stb.), élelmiszer eredetű megbetegedést okozó (pl. *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Clostridium botulinum*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, stb.) és élelmiszerromlást okozó (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Serratia marcescens*, stb.) baktérium ellen vizsgálták már (Bagamboula és mtsai, 2004; Daifas és mtsai, 2004; Mihajilov-Krtev és mtsai, 2009; Rasooli és mtsai, 2002).

Általános megfigyelés, hogy a Gram pozitív baktériumok érzékenyebbek az illóolajok gátló hatására, mint a Gram negatívak (Burt, 2004). A különbség valószínűleg az eltérő sejtfal szerkezetnek, illetve a Gram negatív baktériumsejtfal külső membránjának köszönhető, mely gátat jelent a hidrofób illóolaj komponensek számára (Burt, 2004; Longbottom és mtsai, 2004).

Mivel az illóolajok sok összetevőből állnak, antibakteriális hatásukat is különböző mechanizmusok útján fejtik ki. A leggyakoribb célpont a bakteriális sejtfal és a sejthártya. A hidrofób komponensek beékelődhetnek a sejthártyába és megnövelhetik annak átjárhatóságát, a fenolos típusú komponensek ugyancsak a sejthártya átjárhatóságát fokozzák. A megnövekedett áteresztőképesség különböző, a sejtplazmában található anyagok kiáramlásához, illetve a sejtplazma fehérjék kicsapódását eredményező illóolaj komponensek beáramlásához vezet (Cristani és mtsai, 2007; Cox és mtsai, 2000; Fu és mtsai, 2010). A

membránszerkezetben bekövetkező változásokat elektronmikroszkópos felvételekkel is igazolták (Carson és mtsai, 2002).

### **1.3.2. Az illóolajok hatása élesztőgombákra**

Az illóolajok élesztők elleni hatását elsősorban humánpatogén *Candida* fajokon (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*), és élelmiszerromlást okozó élesztőkön (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaromyces hansenii*, *Z. bailii*) tesztelték (Cerrutti és Alzamora, 1996; Pinto és mtsai, 2006; Rosato és mtsai, 2008). Az illóolajok és összetevőik gátolták az élesztők szaporodását, a MIC értékek a baktériumoknál tapasztaltakhoz hasonlóak voltak.

A hatásmechanizmus is hasonló, mint a baktériumokban, az elsődleges célpont a sejtfal és a sejthártya. A sejthártya átjárhatósága nő, a sejtől 260 nm-es hullámhosszúságú fényt abszorbeáló anyagok távoznak, az elektronmikroszkópos felvételeken a sejtburrok károsodása figyelhető meg (Cox és mtsai, 2000; Bennis és mtsai, 2004). A teafaolaj csökkentette a *C. albicans* légzésének intenzitását, valószínűleg valamelyik légzési enzim gátlásával (Cox és mtsai, 2000). Rosato és mtsai (2008) közleménye szerint a teafa-, oregáno- és geránium-olaj szinergista módon együttműködött az amfotericin B gombaellenes hatóanyaggal kórokozó *Candida* fajok esetében.

Az egyes illóolaj komponensek közül az  $\alpha$ -terpinén és limonén károsította a *C. tropicalis* sejthártyáját. A sejten kívüli térben megnőtt a 260 nm-en abszorbeáló anyagok aránya, ami a sejtől történő kiáramlásra utal (Adegoke, 2000). Parveen és mtsai (2004) szerint az  $\alpha$ -terpinén befolyásolta az ergoszterin szintézisben és a szterol beépítésben közreműködő géneket *S. cerevisiae*-ben. Az ergoszterin a gombamembrán egyik fontos alkotója, és a sejt belső integritásának megőrzésében kiemelt szerepet játszik. *Thymus pulegioides* (kakukkfű) illóolajának hatására különböző *Candida* fajokban ugyancsak csökkent az ergoszterin szintézis (Pinto és mtsai, 2006).

### **1.3.3. Az illóolajok hatása fonalas gombákra**

Az illóolajok a legtöbb esetben gátló hatást fejtenek ki a penészgombák telepnövekedésére, illetve a konídiumok és a spórák csírázóképeségére. Ebből a szempontból legalaposabban az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség tagjait tanulmányozták, de *Fusarium*, *Alternaria* és *Botrytis* fajok is szerepelnek a vizsgált fonalas gombák között. Leggyakrabban a

borsikafű (*Satureja hortensis*), a citromfű (*Cymbopogon citratus*), a bazsalikom (*Ocimum gratissimum*) és a kakukkfű fajok (*Thymus vulgaris*, *T. pulegoides*) (Fraternale és mtsai, 2005; Nguiefack és mtsai, 2003, 2009; Pinto és mtsai, 2006; Wilson és mtsai, 1999) illóolaj kivonatait használták. A citrusfélék olajának gombaellenes hatását többen is tanulmányozták. Caccioni és mtsai (1998) szerint egyenes arányosság állt fent a mono- és szeszkviterpén tartalom és a gombaellenes hatás mértéke között. Viuda-Martos és mtsai (2008) szerint a narancs illóolaj *A. niger*, a mandarin olaj *A. flavus*, a grépfrút olaj pedig *P. chrysogenum* és *P. verrucosum* ellen mutatott erős gátló hatást.

Az illóolajok gombaellenes hatását a gyakorlatban is alkalmazták, Matan és Matan (2008) gumifa fűrészárut kezeltek ánizs olajjal, ami 12 héten keresztül védelmet nyújtott a farontó *Aspergillus* és *Penicillium* fajok elszaporodása ellen. Atanda és mtsai (2006) cirok és földimogyoró magok közé kevert bazsalikom levelekkel nemcsak az *Aspergillus parasiticus* okozta penészesedést tudta csökkenteni, hanem 66-92%-ban az aflatoxin B1 és G1 termelést is. Dikbas és mtsai (2008) *A. flavus*-szal mesterségesen fertőzött citromot kezeltek borsikafű illóolajjal, és ekkor 20 napon keresztül nem jelentek meg látható telepek a gyümölcs felszínén.

Az illóolajok hatásmechanizmusa penészgombák esetében is elsődlegesen a membránt érinti: léziók jelennek meg, illetve erőteljesen csökken az ergoszterin tartalom (Pinto és mtsai., 2006).

#### **1.4. Egyéb hatások**

Számos illóolajról kimutatták, hogy antimikrobiális hatásuk mellett antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek. Singh és mtsai (2006) a köménymag illóolaját és acetonos kivonatát vizsgálták: az illóolaj antioxidáns hatása valamivel rosszabb volt, mint a kivonaté. Egy másik tanulmányban (Singh és mtsai, 2008) azt állapították meg, hogy a gyömbér illóolaj jobb antioxidáns hatással rendelkezik, mint az élelmiszeriparban használt BHA (butilált hidroxiz-anizol) és BHT (butilált hidroxiz-toluén). Jia és mtsai (2010) különböző kakukkfű fajok illóolaját vizsgálva mindegyiknél jó szabadgyök-fogó képességet talált. Bakkali és mtsai (2008) szerint az illóolajok elsősorban terpenoid és fenolos komponenseiknek köszönhetően rendelkeznek antioxidáns tulajdonságokkal. Továbbá a sejtmembránon átjutva ezek a komponensek károsítják a mitokondriumok membránját is, ahol a megváltozik az elektronáramlás iránya, és szabad gyökök keletkeznek. A fenolos illóolaj összetevők ezekkel a molekulákkal reagálva maguk is fenoxil gyökké alakulnak, és részt vesznek a ROS (reaktív

oxigén származékok) kaszkád kialakulásában. Az antioxidáns molekulák tehát prooxidánssá válnak, és így fejtenek ki citotoxikus hatást.

Baktériumokban az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia géneket gyakran plazmidok (R-plazmid) hordozzák. A baktériumok átadják egymásnak a plazmidokat, így növelve a rezisztens kórokozók számát. Schelz és mtsai (2006) borsmenta, eukaliptusz és rozmarying illóolaj hatására plazmid-vesztést tapasztaltak *E. coli*-ban. Az illóolajok tehát elvben segítségünkre lehetnek a rezisztencia elleni küzdelemben is.

A baktériumok közötti sejt-sejt kommunikáció összehangolt génkifejeződéshez vezet. Mivel a jelenség csak nagy sejtsűrűségnél lép fel, idegen kifejezéssel quorum sensing-nek hívják (quorum az a minimális tömeg, ahol fellép a jelenség, a sensing a környezetből érkező jelek észlelésére utal). A quorum sensing (QS) részt vesz az antibiotikum rezisztencia kialakulásában, befolyásolja a patogenitást és a biofilm képzést. A QS gátlása csökkentheti egyes törzsek patogenitását, illetve rezisztenciáját. A fahéj olaj fő komponense, a fahéj-aldehid ismert QS gátló (Annous és mtsai, 2009). Szabó és mtsai (2010) a rózsaoilaj, geránium olaj, levendula és rozmarying olaj esetében mutattak ki QS gátlást.

### **1.5. Az illóolajok felhasználása élelmiszerekben**

Korunkban egyre nagyobb az igény arra, hogy az élelmiszerek hosszú ideig eltarthatók legyenek károsodás nélkül. Az élelmiszerek eltarthatóságának javítására többféle eljárás is létezik, azonban a friss, minimálisan feldolgozott élelmiszerek iránti növekvő igény, és a fogyasztók ellenérzése a szintetikus tartósítószerrel szemben, újra a figyelem középpontjába állította a természetes eredetű, környezetbarát antimikrobiális hatóanyagokat. Figyelembe kell ugyanakkor venni, hogy ugyanannak a hatásnak az eléréséhez az *in vitro* kísérletekben általában alacsonyabb illóolaj koncentrációra van szükség, mint az élelmiszerben, mivel az élelmiszerekben jelen lévő összetett kémiai környezet fizikai és kémiai gátat jelenthet az illóolaj csíraölő hatásával szemben. Az élelmiszerekbe magasabb koncentrációban adagolt illóolajok ugyanakkor negatívan befolyásolhatják az élelmiszer érzékszervi tulajdonságait (ízét, illatát, zamatát). Ennek a jelenségnek az elkerülésére az illóolajok kombinálhatók egymással, minthogy az egymás hatását felerősítő kombinációkban kisebb koncentráció is elegendő a megfelelő hatás eléréséhez (Burt, 2004; Hammer és mtsai, 1999).

### **1.5.1. Illóolajok és élelmiszer-összetevők kölcsönhatása**

A magas fehérje- és zsír-, illetve olajtartalom általában csökkenti az illóolajok hatását az élelmiszerekben. Az illóolajok jól oldódnak az élelmiszer zsírtartalmában, így kevésbé érik el a vizes fázisban található baktériumokat. A fehérjék hidrofób részei, kölcsönhatásba lépve az illóolaj molekulákkal, megkötik azokat, így csökkentve a membránokra gyakorolt hatást (Burt, 2004; Cava és mtsai, 2007; Smith\_palmer és mtsai, 2001). Gutierrez és mtsai (2008, 2009) kísérleteiben az összetett szénhidrátok, mint a keményítő, 5% feletti koncentrációban csökkentették az illóolajok hatását, míg a szacharóz nem befolyásolta az antibakteriális hatást. Némileg meglepően, a magas fehérje koncentráció viszont növelte az általuk vizsgált illóolajok hatásfokát.

### **1.5.2. Illóolajok növényi eredetű élelmiszerekben**

Az irodalomban leginkább gyümölcs alapú élelmiszerek illóolajokkal történő tartósítására találunk példát. Cerrutti és Alzamora (1996) alma- és banánpüré tartósítására szeretett volna különböző illóolajat használni, de azt tapasztalták, hogy 100 ppm feletti koncentrációban, a borsmenta olajat kivéve, minden illóolaj az élvezhetetlenségig megváltoztatta a pürék ízét. A mentaolaj viszont ebben a koncentrációban nem volt hatásos a modellszervezetként használt *S. cerevisiae* ellen. Lanciotti és mtsai (2004) összefoglaló munkájában a citrusfélék illóolaját sikeresen alkalmazták minimálisan feldolgozott gyümölcskészítmények eltarthatóságának és élelmiszerbiztonságának emelésére. Narancs alapú, szén-dioxid mentes, nem pasztörözött üdítőitalok eltarthatóságát a citrál, linalool és  $\beta$ -pinén megfelelő arányú kombinációja nagymértékben javította. Különösen jó eredményeket értek el, ha 55 °C-on hőkezelték is az italokat (Belletti és mtsai, 2010). Élesztővel beoltott almabor zavarosodását 0,2% gyömbér illóolaj sikeresen megállította (Liang, 2003). Le és Kyang (2006) kovászos uborka fermentációja során fokhagyma illóolaj adásával meggátolta a *Pichia (Hansenula) anomala* hártvaképzését a terméken.

### **1.5.3. Illóolajok állati eredetű élelmiszerekben**

Az illóolajok hatását a leginkább romlékony állati eredetű élelmiszerekben, így például halak, darált hús, illetve belőle készült kolbász esetében próbálták ki. Az illóolajokat gyakran alkalmazzák együtt vákuum vagy módosított gázösszetételű (MAP) csomagolási

technikákkal és hűtéssel. Jellemzően a húskételek készítésében is használt fűszerek illóolajával - oregáno, kakukkfű, babér - végezték a kísérleteket. Meljholm és Dalgard (2002) MAP csomagolású tőkehalban oregáno olaj adásával csökkentette a romlást okozó *Photobacterium phosphorus* csíraszámát. Min és Oh (2009) szintén oregáno olajat használt harcsa szeletek zselatin borításában *S. Typhymurium* és *E. coli* O157H7 ellen, és a *Salmonella*-t találta érzékenyebbnek. Atrea és mtsai (2009) vákuumcsomagolt friss polip eltarthatóságát növelték 11 illetve 20 nappal 0,2 illetve 0,4 % oregáno olaj alkalmazásával. Marha darált húshoz timolt adva csökkent a koliform és *Enterobacter* csíraszám, ugyanakkor a timol nem volt hatással a pszichrotrof baktériumok és a *Pseudomonas*-ok csíraszámára (Del Nobile és mtsai, 2009). Kolbászban a majoránna olaj az *in vitro* megállapított MIC alatti koncentrációban bakteriosztatikus, míg a MIC feletti koncentrációban baktericid hatást fejtett ki, azonban ez a koncentráció már kellemetlen ízváltozást okozott. Sikertelen volt a koriander olaj alkalmazása is vákuumcsomagolt sonkaszeletek tartósítására, mert a szükséges koncentráció már megváltoztatta a termék ízét (Gill és mtsai, 2002).

Mint látjuk, az illóolajok gyakran okoznak ízváltozást, ezért egymással, illetve egyéb tartósítási eljárásokkal kombinálva érdemes őket felhasználni.

#### **1.5.4. Illóolajok és élelmiszerbiztonság - jogi szabályozás**

Az Egyesült Államokban, az élelmiszerekben felhasználható illóolajok FA (food additive – élelmiszer-adalék) és GRAS (generally regarded as safe - általánosan biztonságosnak tartott) státuszt kapnak az FDA-tól (Food and Drug Administration, USA). Európában nem az egyes illóolajokat, hanem az illóolaj összetevőket regisztrálják, mint élelmiszer ízesítőanyagokat. Az engedélyezett összetevők között szerepelnek a karvakrol, timol, eugenol, citrál, limonén, mentol, fahéj-aldehid, karvon és a p-cimén (Burt, 2004). Új anyagokat a listára csak toxikológiai vizsgálatok után lehet felvenni. Mivel az illóolajok összetett vegyületek, nem szerepelhetnek az élelmiszer adalékanyagok között (E-lista), minthogy ott csak ismert, definiált molekulából álló vegyületek lehetnek. Az egyes országok Élelmiszerkönyve (Codex Alimentarius) tartalmazhatja egyes illóolajok nevét, mint engedélyezett ízesítő anyagot. A GRAS és FA lista jó kiindulópontot jelenthet, de egyelőre az Európai Unióban nincs érvényes szabályozás az illóolajok élelmiszerben való felhasználásáról.

## 1.6. A felhasznált illóolajok bemutatása

### 1.6.1. *Ánizs (Pimpinella anisum)*

Az egyéves, lágy szárú ánizs ismert fűszernövény. Fűszerként szürkésbarna, 3,5–5 mm hosszú kellemes illatú magját használjuk. Magvaiból az illóolajat vízgőzzel párolják le. Származási helyétől függően az ánizsmagból 1,3–6% ánizsolaj vonható ki. Az ánizsolaj főbb összetevői: transz-anetol (80,36-94,46%), esztragol (2,49%), metil-kavikol,  $\alpha$ -terpineol, linalool (Arslan és mtsai, 2004; Ozcan és Chalcat, 2006).

Az ánizs eredetileg a Földközi-tenger mellékéről származik, de nagyon sokféle termesztik, így Magyarországon is. Már az ókori Egyiptomban használták fűszerként, és kedvelt volt a középkorban is. Felhasználható édes és sós ételek ízesítésére. Sokféle italhoz is adják, de felhasználása leginkább a likörgyártásban jelentős. Az ánizst étvágyjavító, emésztést serkentő, vértisztító, hurutoldó, idegerősítő, felfúvódást szüntető, gyomor-és epebántalmak elleni szerként is alkalmazzák (Ozcar és Chalcat, 2006). Gombaellenes hatását vizsgálták *Candida* fajok klinikai izolátumai és egyes bőrgombák ellen (Kosalec és mtsai, 2006). Illóolaját gumifa (*Hevea brasiliensis*) faanyagának gombásodás elleni védelmére is javasolják (Arlson és mtsai, 2004).

### 1.6.2. *Boróka (Juniperus communis)*

A boróka illóolaját a növény érett tobozbogyóiból vízgőz-desztillációval állítják elő. Főbb komponensei:  $\alpha$ -pinén (29,17%),  $\beta$ -pinén (17,84%), szabinén (13,55%), limonén (5,52%) és mircén (0,33%) (Pepeljnjak és mtsai, 2005).

Leginkább a vese kiválasztó működésének fokozásában van szerepe, de jótékony, erősítő, tisztító hatású légzőszervi megbetegedések esetén is. Alkalmazzák továbbá külsőleg pikkelysömör, bőrgyulladás, visszértágulat, aranyér kezelésére. Enyhe görcsoldó, antibakteriális, serkenti az emésztőnedvek elválasztását. A boróka illóolaj antibakteriális hatását több Gram pozitív és Gram negatív baktérium (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*) valamint élesztőgombák (*C. albicans*, *C. krusei*, *H. anomala*) és bőrgombák (*Trichophyton rubrum*, *Microspora canis*, stb.) ellen vizsgálták (Pepeljnjak és mtsai, 2005). Az élelmiszeriparban és az italgyártásban ízesítőanyagként használják (pl. gin, borovicska).

### 1.6.3. Citrom (*Citrus lemon*)

A gyümölcséből hideg préseléssel állítják elő az illóolajat. Átlátszó, halványsárga vagy zöldessárga színű, erősen citromillatú illóolaj. Fő komponense a limonén (56-76%),  $\beta$ -pinén (7-17%), szabinén (1-3%),  $\gamma$ -terpinén (6-21%),  $\beta$ -kariofillén (legfeljebb 0.5%), nerál (0.3-1.5%),  $\alpha$ -terpinol (legfeljebb 0.6%), neril-acetát (0.2-0.9%), geranil (0.5-2.3%), és geranil-acetát (0.1-0.8%) (Rodríguez és mtsai, 1998; Vekari és mtsai, 2002).

Az illóolaj élénkíti a szív, a vese és a máj működését. Hatásos vizelethajtónak, izzasztónak, vérzéscsillapító, sebösszehúzó szerek tartották, de asztmás rohamok, légúti megbetegedések ellen is használható. Nyugtató, frissítő, hangulatjavító hatású. Használják kozmetikumokban és az élelmiszeriparban egyaránt.

A citromolaj 90-100%-ban gátolta néhány élelmiszerromlást okozó baktérium növekedését (Dabbah és mtsai., 1970), illetve hatásosnak bizonyult *Aspergillus* és *Penicillium* fajok ellen (Viuda-Martos és mtsai., 2008).

### 1.6.4. Édeskömény (*Foeniculum vulgare*)

Az édeskömény a *Foeniculum* növénynemzetség legelterjedtebb és legismertebb tagja, fűszer és gyógynövény. A termésekben a 2–5% illóolajon kívül sok zsíros olaj, fehérje és cukor van. Az illóolaj fő komponense az édes transz-anetol (70,1%) és a kesernyés, kámforos ízű fenkon (6,9-23,9%). Tartalmaz még 1-8-cineolt (3,1-8%); p-cimént (2-3,1%), és lehet benne metil-kavikol (4,7%), limonén (3,1%) és linalool (1,3%) is (Gulfraz és mtsai, 2008; Özcan és mtsai, 2006; Singh és mtsai, 2006). Illata, melyet az ánizs-aldehyd ad, igen hasonlít az ánizséhoz. Nemcsak a termésben van illóolaj, hanem az egész növényben: a gyökérben 0,6%, a szárban és a levélben 1–1,5%.

Az édeskömény a Mediterráneumból származik, és már az ókorban ismerték és használták. Napjainkban a világ valamennyi mérsékelt, illetve meleg éghajlatú vidékén termesztik – a legtöbbet Franciaországban és Bulgáriában. Magjait levesekbe és halételekbe főzik, a gumóját lereszelik, és káposztasalátához adják. Étvágyjavító, szélhajtó, görcsoldó hatású. Gyakran adják együtt hashajtó drogokkal, hogy kivédje, vagy enyhítse a hashajtó által okozott görcsöket (Gulfraz és mtsai, 2008).



### **1.6.5. Gyömbér (*Zingiber officinale*)**

A gyömbér fűszer- és gyógynövény. Illóolajának összetevői a gerániál (25,9%),  $\alpha$ -zingiberén (9,5%),  $\alpha$ -farnezen (7,6%), nerál (7,4%), geraniol (3,4%) és 1-8-cineol (1,9%) (Singh és mtsai., 2008). Kínában már több évszázaddal időszámításunk kezdete előtt használták, Marco Polo is említi könyvében. Ma Dél-Ázsiában, Dél-Amerikában és Nyugat-Afrikában termesztik. A növény gyöktörzse szolgáltatja a sajátos illatos, csípős, kesernyés ízű fűszert. Kitűnő gyomorerősítő, étvágyjavító, emésztést elősegítő hatása miatt kedvelik. A gyökér forrázata gyógyteaként vértisztító, a meghűlés, torokfájás, gyomorbajok, felfűvódás, étvágytalanság, gyengeség ellenszere. Alkalmazható a hányinger és szédülés megszüntetésére is, ezért a tengeribetegség megelőzése

### **1.6.6. Homoktövis (*Hippophae rhamnoides*)**

A homoktövis az ezüstoffélék (Elaeagnaceae) családjába tartozó, kevés fajt számláló nemzetség tagja, lombhullató, kétlaki, tövises cserje. Termése tojás formájú, 7-9 mm átmérőjű, egymagvú bogyó, melynek karotinoid tartalma 16-28mg/100g. A gyümölcs ezen kívül tartalmaz még flavonoidokat (120-1000 mg/100 g) és olajat. Az olaj (valójában zsíros olaj) halványsárga színű, és tartalmaz palmitinsavat (37,8%), palmitoleinsavat (24,9%), olajsavat (22,3%), linolsavat (4,1%) és linolénsavat (1,9%) (Kaminskans és mtsai, 2006). A homoktövis-olaj E-vitamint és karotenoidokat tartalmaz és sebgyógyító és gyulladáscsökkentő hatású (Zeb, 2004). Kiemelkedő a bogyók C-vitamin tartalma, amely a citrom C-vitamin tartalmának a tízszerese. Feldolgozva dzsem, bor, ivólé, likőr, zselé is készül belőle.

### **1.6.7. Majoránna (*Origanum majorana*)**

A majoránna az árvacsalánfélék (Lamiaceae) családjába tartozó növényfaj. A legmagasabb mennyiségben terpinolént (29,6-35,7%) és terpinén-4-olt (15,8 - 19,5%) tartalmaz, de előfordul benne szabinén (1,6-4,4%),  $\gamma$ -terpinén (4,4-5,6%), cisz-szabinén-hidrát (6,7-7,4%),  $\beta$ -pinén (5,1-5,3%) és 1,8-cineol (3,6-5,4%) (Novák és mtsai, 2003). Eredeti hazája a Földközi-tenger környéke, de ma már világszerte termesztik nagyüzemi módon és kiskertekben egyaránt.

Felhasználható levelek (főleg burgonya- és gombaleves), főzelékek (burgonya-, bab-), mártások, húsételek, köztük szárnyas és vadhúsok, továbbá húskészítmények (kolbász, hurka), valamint borok ízesítésére. A majoránna étvágygerjesztő, szélhajtó, gyomorerősítő, nyugtató hatású fűszer, ezért gyógyteák elengedhetetlen alkotórésze. Teáját fejfájás, köhögés, légzési zavarok enyhítésére használják, olajával a reumás testrészeket dörzsölik be.

#### **1.6.8. Muskotályzsálya (*Salvia sclarea*)**

A muskotályzsálya ugyancsak az árvacsalánfélék családjába tartozó növényfaj. Dél-Európából származik, de az illóolaja és egyéb összetevői miatt már világszerte termesztik. A fő komponensei a linalool (24,5%), és a linalil acetatát (20,9%) (Fraternale és mtsai, 2005). A növény illóolaját orvosi célra is használják (Leung és mtsai, 1996).

#### **1.6.9. Szőlő (*Vitis vinifera*)**

A szőlő a szőlőfélék (Vitaceae) családjának egyik sok fajt és azon belül sok alfajt magába foglaló nemzetségének tagja. Minden ide tartozó növény közös jellemzője, hogy fás szárúak, terméseik fürtökben helyezkednek el, és levelük általában tenyeresen összetett. A szőlő Magyarországon jóformán mindenütt megterem. A szőlőmagolaj tartalmaz linolsavat (72%), olajsavat (16%), palmitinsavat (7%), sztearinsavat (4%) és 1% alatti mennyiségben  $\alpha$ -linolénsavat. (Kamel és mtsai, 1985). Ezen kívül gazdag fenolos vegyületekben (tokoferol) és szteroidokban (Oomah, 1998). A vörös szőlő magjának proantocianidin tartalma felelős a szőlőmagolaj jótékony hatásáért, mely *in vitro* kísérletekben csökkentette kemoterápiás szerek májsejt-károsító hatását (Joshi és mtsai, 2001).

### **1.7. A kísérletek során vizsgált mikroorganizmusok jellemzése**

#### **1.7.1. Gram pozitív baktériumok**

##### ***Bacillus subtilis***

A *Firmicutes* divízióba tartozó *B. subtilis* szaporodása kettéosztódással (bináris hasadás) történik. Pálcika formájú, Gram pozitív baktérium, mely képes endospórákat létrehozni. A baktérium felelős a kenyérnyúlósodásért. Ez egy olyan kenyérbetegség, amelynek során a kenyér bélszerkezete ragadós, kenőcsös állományúvá válik, széttöréskor

szálhúzás figyelhető meg, és a termék gyümölcs-észterre emlékeztető szagú lesz. A spórák különböző utakon kerülhetnek a kenyér tésztájába, és nem pusztulnak el mind a sütés során, így később megfelelő körülmények között vegetatív sejtekké alakulhatnak. Általában minden kenyérben elegendő számú spóra van ahhoz, hogy a nyúlósodás bekövetkezzék, de savanykásra kovászolással hatékonyan lehet védekezni ellene.

A *B. subtilis* géntechnológiailag jól manipulálhatónak bizonyult, így széles körben elterjedt laboratóriumi vizsgálatok modellszervezetként (Pesti, 2001).

### ***Bacillus cereus***

A *Firmicutes* divízióba tartozó *Bacillus* nemzetség egyik leggyakoribb faja a *B. cereus*, endospórákat képző, pálcika formájú, Gram pozitív baktérium. Fakultatív anaerob szervezet, talajban, levegőben egyaránt előfordul. Egyes ételekben (pl. rizs, burgonya, húsfélék) elszaporodva enterotoxinja emésztőszervi panaszokat, láz nélküli hasmenéssel és hányással járó ételmérgezést okoz. A megbetegítéshez  $>10^5$  sejt szükséges az élelmiszer 1 grammjában. Ételromlást elsősorban gabonaféléken (rizs), szárítottanyagokban, tejtermékekben okozhat (Pesti, 2001).

### **1.7.2. Gram negatív baktériumok**

#### ***Escherichia coli***

Az *E. coli* egy rövid, Gram negatív baktérium az *Enterobacteriaceae* családban. 1885-ben fedezte fel Theoder Escherich német gyermekorvos és mikrobiológus. Az *E. coli* a legjobban tanulmányozott mikroorganizmus. K12 jelű törzse évtizedek óta biokémiai, genetikai és géntechnológiai kísérletek alanya. Az első géntechnológiai eredmények (plazmid izolálás és transzformáció) is ezzel a törzsszel születtek (Pesti, 2001). Fakultatív anaerob nem spórázó baktérium. A sejtek peritrich flagellumokkal mozognak, szabályos, egyenes apró pálcika alakúak, 2  $\mu\text{m}$  hosszúak és 0,5  $\mu\text{m}$  átmérőjűek. Sokféle táptalajon képes megélni, kevert savas fermentációval szukcinátot, tejsavat, etanolt, acetátot és szén-dioxidot termel. A nem kórokozó törzsek melegvérű állatok normál bélflórájának tagjai. A tápcsatorna alsó szakaszában élnek, az emésztőrendszer normális flórájához tartoznak, K<sub>2</sub>-vitamin termelnek. Jelenlétük megnehezíti egyes kórokozók elszaporodását a bélrendszerben. Élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatokban a fekáliás szennyeződés fő indikátora.

Néhány *E. coli* törzs kórokozó:

- Enteropatogén *E. coli* = EPEC – csecsemők vizes hasmenését okozza.

- Enteroinvazív *E. coli* = EIEC – a vastagbelet támadja meg, a dizentériához hasonló tüneteket, vizes, véres hasmenést okoz.
- Enterotoxikogén *E. coli* = ETEC – hőlabilis és hőstabil toxint is termel. A toxinok a vékonybélben hatnak, vizes, koleraszerű hasmenést okoznak, amit az „utazók betegségeként” is emlegetnek
- Enterohemorrhágiás *E. coli* = EHEC – vérzéses bélgyulladást okoz, gyakran húgyúti vérzéses gyulladással együtt. Az O157:H7 szerotípus verotoxint termel. Elsősorban a nem kellően hőkezelt húsokban (hamburger kóli), tejtermékekben fordulhat elő (Rodler, 2005).

### ***Serratia marcescens***

A *S. marcescens* fakultatív aerob Gram negatív nem spórás baktérium, az *Enterobacteriaceae* családba tartozik, sejtjei pálcika alakúak. Humanpatogén, húgyúti illetve légúti fertőzéseket, valamint ritkán előforduló kenyérbetegséget okoz. A baktérium vörös színű pigmentet, prodigiosint termel. *S. marcescens* megtalálható a talajban, trágyában, fürdőszobákban, szálló porban (Pesti, 2001).

### **1.7.3. Élesztőgombák**

#### ***Saccharomyces cerevisiae***

A *Saccharomycetaceae* családba tartozó pék- vagy sörélesztő. Sejtjei oválisak, 5–10 mikrométer átmérőjűek. Eukarióta modellszervezet a molekuláris és a sejtbiológiában. Sarjadzással szaporodik, jellemző rá a haplo-diploid fejlődésmenet. A korai idők óta ez a legfontosabb élesztőfaj – a kenyérsütésnél, a bor- és sörkészítésnél használják. Napjainkban is ezzel a fajjal termelik a biológiai iparok négy legnagyobb mennyiségben előállított termékét: a sört, a bort, a takarmányélesztőt, és a sütőélesztőt. Ezt a mikroorganizmust alkalmazzák leggyakrabban a fermentációs eljárásokban is. A biotechnológia fejlődésével az élesztők hasznosításának egyre újabb lehetőségei nyílnak meg, úgymint enzimek, vitaminok, heterológ fehérjék, stb. termeltetése.

Mikrobiális ökológiai szempontból minden élelmiszer az élesztőgombák lehetséges élőhelyéül szolgálhat, hiszen tápanyagokban gazdag. Ha a körülmények lehetővé teszik, az élesztők elszaporodnak és a termék erjedéses romlását okozzák. A romlást gyakran kísérik jól látható jelenségek, mint például gázképződés következtében fellépő puffadás, zavarosodás, üledék- vagy hártvaképződés. Az erjedéses romlások nem okoznak megbetegedést, de az

élelmiszert fogyasztásra alkalmatlanná teszik. A gyümölcslevek, üdítőitalok erjeszhető cukrokban gazdagok, és alacsony pH-juk (2,5-4,0) miatt romlásukat elsősorban a savas környezetet kedvelő élesztők, köztük is leggyakrabban *S. cerevisiae* okozhatja. Összetételük és gyártástechnológiájuk szerint ezek az italok nagyon különbözőek. A természetes alapú gyümölcslevekben több a tápanyag, ezért könnyebben romlanak, a szénsavas üdítőitalokat védi a nagy CO<sub>2</sub> tartalom is. Mikrobiológiai romlás szempontjából az alkoholos italok meghatározó tulajdonsága az alkoholtartalom (borokban 8-14, sörökben 3-5 térf.%) és az alacsony pH (3,0-4,0). Palackozott borok és sörök zavarosodását, üledékességét gyakran okozza *S. cerevisiae* (Deák, 2001).

### ***Pichia anomala***

A *Pichia* (*Hansenula* és *Hyphopichia*) nemzetség a *Saccharomycetaceae* családba tartozik. A faj sejtjei gömb alakúak. A *Pichia* nemzetséget Hansen hozta létre, innen a régebbi elnevezés. A sejt multilaterálisan bimbózik, az aszkusz kalap vagy gömb alakú. Laktózt nem asszimilál, de a nitrátot igen. Ma már a *Pichia* nemzetségben több mint száz fajt ismernek, melyek leginkább korhadó növényeken találhatók. A *P. anomala* mindenfajta élelmiszerben előfordulhat. Gyümölcs- és zöldség-eredetű élelmiszerekben erjedéses romlást okoz. Folyadékok felületén hártvaképzésre hajlamos (Deák, 2001).

### ***Geotrichum candidum***

Az *Endomycetaceae* családba tartozó élesztő. A *Geotrichum* fajok a valódi hifával rendelkező, artrospóraképzésre hajlamos nemzetségek imperfekt alakjai. Közülük a *G. candidum* a legismertebb, gyakran izolálják állati termékből; tejből, tejtermékből, gyümölcsökből és szennyvizekből. Extracelluláris lipáz termelése jelentős. A tej, tejföl, krémsajt keseredését okozhatja (Hudecova és mtsai, 2009). A laktózt és a tejsavat tápanyagként képes hasznosítani, ezen kívül bontja a fehérjéket és a zsírokat. A tejiparban időnként sajt érleléshez szokták felhasználni. A *G. candidum* D-3-fenilecetsavat termel, és ez által gátolja a *Listeria monocytogenes*-szel, illetve bizonyos gombákkal való fertőződést (Deák, 1998).

### ***Schizosaccharomyces pombe***

A *Schizosaccharomycetaceae* családba tartozó élesztő. A sejtjei pálcika alakúak, 7-14 µm hosszúak és 3-4 µm átmérőjűek, vegetatív sejtjei haploidok. Az élesztőgomba ivartalanul hasadással szaporodik, aszkospórái gömb alakúak. Erjedő növényi anyagokon, zöldségeken,

talajban, és nagy cukortartalmú termékekben fordul elő. A *S. pombe* a család legismertebb faja, mind elméleti vizsgálatok (sejtciklus- illetve genetikai kutatás), mind gyakorlati szempontból (potenciális biotechnológiai alkalmazása sokrétű) fontos eukarióta modellszervezet. Először 1893-ban dél-afrikai sörből izolálták. Az afrikai sörök élesztőjeként, a borászatban pedig, mint a bor savasságát okozó almasav egyik lebontóját hasznosítják. A *Schizosaccharomyces* fajok szaporodásukhoz vitaminokat igényelnek. Még 50% glükóz mellett is jól szaporodnak. A *S. pombe* xerotoleráns és tartósítószer-tűrő, ezért gyakran okoz romlást szörpökben, koncentrátumokban, borokban, gyümölcslevekben. (Deák, 1998).

### **1.7.3. Fonális gombák**

#### ***Penicillium chrysogenum***

A *Penicillium* nemzetség tagjai a természetben széles körben elterjedt penészgombák, melyek magas cukortartalmú termékek, gabonafélék, olajos magvak, fűszerek, sajtok, kenyér penészesedését okozhatják. A *P. chrysogenum* a legkülönbözőbb talajtípusokon a talaj mikroflóra egyik közönséges képviselője. Fontos szerepe van a növényi és állati eredetű szerves anyagok lebontásában, gyakran izolálható friss vagy raktározott növényi eredetű élelmiszerről. Telepei szélesen terjedők, kékeszöld színűek, a konídiumok ellipszoid alakúak, sima falúak. A *P. chrysogenum* másodlagos metabolitként a penicillin antibiotikumot termeli (Pesti, 2001). A penicillin akkor válik antibakteriális anyaggá, ha a szabad aminosoportba valamilyen savmaradék épül be. A számos derivátum közül a legjobban ismert származék a G-penicillin, ebben benzilgyök található. Általában a legtöbb Gram pozitív baktériumra, azon kívül a Gram-negatív kokkusokra, aktinomicétákra hatékony. Hatása baktericid - de csak a szaporodó baktériumokra hat, minthogy sajtfaal képződését gátolja és a sejtfaal nélküli sejtek szétesnek (Jakucs és Vajna, 2003).

#### ***Aspergillus niger***

Az *Aspergillus* nemzetség az *Eurotiales* rend *Trichocomaceae* családjába tartozik. Az *A. niger* az iparban az egyik legelterjedtebb gombafaj, számos enzim és szerves sav előállítására alkalmazzák (citromsav, alfa-amiláz, fitáz, glükóamiláz, glükózoxidáz, kataláz, lipáz, pektináz, proteáz (Jakucs és Vajna, 2003). A tüdő-aszpergillózis foglalkozási betegségnek is tekinthető, a penészsporákat tartalmazó por belélegzésével alakulhat ki. Ez a betegség gyakran halálos kimenetelű, de szerencsére aránylag ritka. A kórokozók inkább

fakultatív patogénnek tekinthetők, vagyis csak a legyengült beteg szervezetet támadják meg, de időnként kialakulhatnak erősebben patogén törzsek is (Jakucs és Vajna, 2003).

### ***Fusarium sporotrichioides***

A *Hypocreales* rend *Nectriaceae* családjába tartozik. A növényi kórokozó gombák egyik legjelentősebb csoportját alkotják a *Fusariumok*, amelyek mikotoxinokat termelnek. A zearalenon ösztrogén-szerű hatása vetélést, elhullást okozhat a fertőzött takarmányt fogyasztó állatállományban, elsősorban a sértéseknél. A sejtosztódást gátolják a trichotecének, amelyeket szintén a *Fusariumok* választanak ki. A penészgombák már „lábon” megtámadják a gabonaféléket, és jelentős gazdasági károkat okoznak a termés kieséssel (Jakucs és Vajna, 2003).

### ***Rhizopus stolonifer***

A *Rhizopus* nemzetség a *Mucorales* rend egyik legnagyobb családjának, az *Absidiaceae* családnak jól ismert nemzetsége. Sporangiumaik apofízissel rendelkeznek, a zigospóra szuszpenzorok szemben állóak, a sporangiofórok eredésénél rizoidokat és sztolonokat képeznek. Talajban, korhadó növényeken, élelmiszerek felületén és poros felszíneken gyakran megtalálhatók, de másodlagos növényi és opportunistá humán patogének is előfordulnak köztük. Az egyik leggyorsabban és leglátványosabban szaporodó gomba csoport.

A nemzetség ismertebb fajai a *R. stolonifer*, *R. oryzae*, a *R. microsporus*. és a *R. oligosporus*. Ezek a fajok élelmiszeripari és biotechnológiai szempontból egyaránt nagy jelentőségűek. A *R. stolonifer* a kenyér penészesedését okozhatja.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A fogyasztók egészséges, szintetikus összetevőktől mentes élelmiszerek iránti növekvő igénye miatt napjainkban a kutatók és az élelmiszeripar figyelme ismét a természetes eredetű antimikrobiális hatóanyagok felé fordult, melyek felhasználhatók lehetnek az élelmiszer-tartósításban. A növényi illóolajok többsége rendelkezik a GRAS (általánosan biztonságosnak ítélt) és FA (élelmiszer adalékanyag) besorolással, és a fogyasztók nagy része elfogadja használatukat az élelmiszerekben. Az illóolajokat, illetve összetevőiket eddig főleg íz- és aromaanyagként hasznosította az élelmiszeripar és kisebb figyelmet fordítottak antimikrobiális hatásukra.

**Mindezek alapján a jelen kutatási munka fő célja különböző növényekből származó illóolajoknak, illóolaj összetevőknek, valamint ezek kombinációinak élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusok ellen kifejtett antimikrobiális hatásának vizsgálata volt.**

Munkánk előtt a következő konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Illóolajok és illóolaj kombinációk antimikrobiális hatásának agardiffúziós lyukteszt módszerrel történő előtesztelése *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli* és *Serratia marcescens* baktériumokkal, illetve *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *Geotrichum candidum* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztőgombákkal szemben, valamint a megfelelő illóolajok és izolátumok kiválasztása a további részletesebb vizsgálatokhoz.
2. Az egyes pontban említett tesztek során kiemelkedő gátlást mutató illóolajok esetében, a baktériumok és az élesztőgombák szaporodási paramétereire gyakorolt hatás vizsgálata folyadék tenyészetekben. Az illóolajok csíraölő hatásának vizsgálata.
3. Az illóolajok antimikrobiális hatásának tesztelése *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* és *Fusarium sporotrichioides* fonalas gombákkal szemben.
4. A kiválasztott illóolajok és fő összetevőik minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása makro- és mikrodilúciós módszerekkel.



5. Az illóolajok és fő összetevőik kombinált antimikrobiális hatásának vizsgálata baktérium és élesztőgomba tenyészetekben.
  
6. Az illóolajok antimikrobiális hatásának vizsgálata különböző élelmiszer összetevők jelenlétében, valamint a gátló hatás tesztelése élelmiszerekben.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált mikroorganizmusok

Az alkalmazott mikroorganizmusokat az 1. táblázat tartalmazza. Az egyes izolátumok fenntartása kiegészített hús-, Luria-Bertani- vagy malátás táptalajokon történt kéthavonkénti átolással, a törzseket 4°C-on tároltuk.

1. táblázat. A felhasznált mikroorganizmusok.

Fajnév	Törzsgyűjtemény kódja*	Eredet, Izolálás helye
Baktériumok		
<i>Bacillus subtilis</i>	SZMC 0209	Ismeretlen
<i>Bacillus cereus</i>	SZMC 0042	Ismeretlen
<i>Escherichia coli</i>	SZMC 0582	Ismeretlen
<i>Serratia marcescens</i>	SZMC 0567	Ismeretlen
Élesztők		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MB-021	Vad feketeribizli, Mongólia
<i>Pichia anomala</i>	MB-102	Tejfölgyártás utáni savó, Mongólia
<i>Geotrichum candidum</i>	MB-196	Romlott sovány tej, Mongólia
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	MB-89	Szeszipari hulladék, Mongólia
Fonalgombák		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	SZMC-0514	Ismeretlen
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC-9092	Ismeretlen
<i>Rhizopus stolonifer</i>	FEIC-11	Penészes kenyér, Magyarország
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	FEIC-06	Búzakalász, Magyarország

**SZMC:** Szeged Microbial Collection, Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Szeged, Magyarország; **MB:** Microbial Collection, Mongol Tudományos Akadémia,

Biológiai Intézet, Ulanbaataar, Mongólia; **FEIC**: Food Engineering Institute Collection, Szegedi Tudományegyetem, Élelmiszermérnöki Intézet, Szeged, Magyarország.

### 3.2. A felhasznált illóolajok és illóolaj összetevők

Az alkalmazott illóolajok a 2. táblázatban feltüntetett növények egyes részeiből származnak. A vizsgálatok során néhány illóolaj egy-egy komponensét is tanulmányoztuk (3 táblázat).

**2. táblázat.** A felhasznált illóolajok (Aromax Kft., Magyarország).

Növény ( <i>Latin név</i> )	Növényrész
Citrom ( <i>Citrus lemon</i> )	Gyümölcsbőr
Boróka ( <i>Juniperus communis</i> )	Tobozbogyó
Majoránna ( <i>Origanum majorana</i> )	Hajtás
Muskotályzsálya ( <i>Salvia sclarea</i> )	Hajtás
Ánizs ( <i>Pimpinella anisum</i> )	Mag
Gyömbér ( <i>Zingiber officinale</i> )	Hajtás
Édeskömény ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	Érett termés
Homoktövis ( <i>Hippophae rhamnoides</i> )	Friss termés (bogyó)
Szőlő ( <i>Vitis vinifera</i> )	Mag

Az antimikrobiális érzékenység vizsgálatokhoz az illóolajokat 0,45 µm pórusméretű szűrőn (Millex<sup>®</sup> HV, Millipore) sterilre szűrtük.

### 3. táblázat. A felhasznált illóolaj összetevők (Sigma).

Illóolaj	Fő összetevő	Anyagtartalom (%)
Muskotályzsálya	Linalol	10-25
Boróka	$\alpha$ -pinén	40
Citrom	Limonén	60-80
Majoránna	Terpinén-4-ol	10-25

### 3.3. Táptalajok és oldatok

Élesztőkivonat-tripton-glükóz táptalaj (TGE)      1% glükóz  
0,5% tripton  
0,25% élesztőkivonat  
2,5% agar

Kiegészített hústáptalaj (MEE)      0,4% húskivonat  
0,4% pepton  
1% glükóz  
0,1% élesztőkivonat  
2% agar

Luria-Bertani (LB) táptalaj      1% tripton  
0,5% élesztőkivonat  
1% NaCl  
2% agar

Malátás táptalaj (MEA)

0,5% maláta kivonat

0,5% élesztőkivonat

1% glükóz

2% agar

A vizsgálatok során használt tápoldatok a fenti receptek alapján készültek az agar elhagyásával.

Illóolajok és élelmiszer-összetevők kölcsönhatásának vizsgálatához használt tápoldatok

Hidrolizált állati fehérjével kiegészített tápoldat (*B. cereus*):

0,1% élesztőkivonat

1% glükóz

0,4%, 0,8%, 1,6% vagy 3,2% húskivonat

Hidrolizált állati fehérjével kiegészített tápoldat (*E. coli*):

0,5% élesztőkivonat

1% NaCl

1%, 2%, 4% vagy 8% húskivonat

Hidrolizált növényi fehérjével kiegészített tápoldat (*B. cereus*):

0,1% élesztőkivonat

1% glükóz

0,4%, 0,8%, 1,6% vagy 3,2% szójapepton

Hidrolizált növényi fehérjével kiegészített tápoldat (*E. coli*):

0,5% élesztőkivonat

1% NaCl

1%, 2%, 4% vagy 8% szójapepton

Szacharózzal kiegészített tápoldat (*B. cereus*):

0,1% élesztőkivonat

0,4% húskivonat

1%, 2%, 4%, 8% szacharóz

Szacharózzal kiegészített tápoldat (*E. coli*):

0,5% élesztőkivonat

1% NaCl

1% tripton

1%, 2%, 4%, 8% szacharóz

Illóolajok hígításához használt oldat

50%-os dimetil-szulfoxid (DMSO) oldat  
desztillált vízben

Az oldatot 0,45 µm pórusméretű szűrőn (Millex<sup>®</sup> HV, Millipore) sterilre szűrtük.

Fiziológiás sóoldat

150 mM NaCl  
desztillált víz

Az oldatot 0,45 µm pórusméretű szűrőn (Millex<sup>®</sup> HV, Millipore) sterilre szűrtük.

### 3.4. Tenyésztési körülmények

Az antimikrobiális érzékenység vizsgálatokban alkalmazott mikroorganizmusok közül a *Bacillus* törzseket MEE, az *E. coli* izolátumot LB, míg az élesztőket és a fonalas gombákat MEA tápközegben neveltük. A tesztek során a *Bacillus* törzseket 30 °C, az *E. coli* izolátumot 37 °C, az élesztőket 28 °C, a fonalas gombákat pedig 25 °C hőmérsékleten inkubáltuk.

### 3.5. Antimikrobiális érzékenység vizsgálatok

#### 3.5.1. Az antimikrobiális hatás tesztelése agardiffúziós lyukteszt módszerrel

A módszerrel a különböző illóolajok és illóolaj kombinációk 1. táblázatban felsorolt baktérium és élesztő törzsekre gyakorolt antimikrobiális hatását vizsgáltuk.

#### Illóolajok antimikrobiális hatása

Az antimikrobiális hatás vizsgálatokhoz az adott mikroorganizmusnak megfelelő tápközeget (25 ml) tartalmazó Petri-csészékre 24 órás előtenyésztésből nyert spóra-, vagy sejtszuszpenzióval ( $10^3$ - $10^4$  sejt/ml) masszív oltást végeztünk. A szuszpenziók száradása után steril dugófúróval a leoltott táplemezbe 8 mm átmérőjű lyukakat fúrtunk, melyekbe 50%-os DMSO oldattal 50, 100, 150 és 200 µl/ml koncentrációra hígított illóolajokból 100-100 µl-t pipettáztunk. Kontrollként 100 µl 50%-os DMSO oldatot használtunk. A csészéket az illóolaj oldatok táptalajba diffundálásáig 4°C-on hagytuk (kb. 2 óra), majd ezután a tenyészeteket az 3.4. pontban leírt hőmérsékleten inkubáltuk. A gátlási zónák átmérőit 24, illetve 48 óra inkubálás után is meghatároztuk; a kapott eredmények pontos kiértékeléséhez három párhuzamos mérés átlagával számoltunk.

#### Illóolaj kombinációk antimikrobiális hatása

A vizsgálatok során minden esetben 100 µl/ml koncentrációjú, 50%-os DMSO-ban oldott borókaolajjal különböző arányban (1:0,5; 1:1 és 1:2) kombináltunk egy másik illóolajat. A kombinált illóolajok antimikrobiális hatásának tesztelését szintén agardiffúziós lyukteszt módszerrel, a fent leírt módon végeztük.

Az egyes anyagok antimikrobiális hatását az adott szer alkalmazása során bekövetkezett növekedésgátlás mértékével jellemeztük. Az illóolajok közötti kölcsönhatás mértékét az Abbott képlet segítségével számoltuk ki:  $I_e = X+Y-(XY/100)$ , ahol  $I_e$  a várt gátlás százalékos értéke egy adott kölcsönhatásban, az  $X$  és az  $Y$  pedig a kölcsönhatásban szereplő anyagok külön-külön mért gátlási százaléka. Ha  $I_0$  a mért gátlási százalék, akkor a kölcsönhatás mértékét ( $IR$ ) az  $IR=I_0/I_e$  hányadossal számolhatjuk. Ha  $IR < 0,5$  antagonista, ha  $IR > 1,5$  akkor szinergista kölcsönhatás feltételezhető a két szer között. Ha az  $IR$  értéke 0,5 és 1,5 közé esik, akkor a vizsgált két anyag kölcsönhatása additív jellegű (Moreno és mtsai., 2003).

### **3.5.2. Az illóolajok hatása baktériumok és élesztők szaporodási paramétereire**

A vizsgálatokat a *B. cereus*, *B. subtilis* és *E. coli* baktériumokkal, valamint az 1. táblázatban felsorolt összes élesztő törzssel végeztük.

#### A szaporodási görbék meghatározása

A különböző mikroorganizmusok növekedéséhez megfelelő tápoldat segítségével az egyes illóolajokból 100 µl/ml koncentrációtól kiindulva felező hígítási sort készítettünk 4 lépésben, majd az így kapott törzsoldatokból 30 ml tápoldathoz 300 µl-t adtunk. A hígítások elvégzése után az illóolajok végkoncentrációja 1 µl/ml, 0,5 µl/ml, 0,125 µl/ml és 0,0625 µl/ml lett a tápoldatokban, melyeket 100 µl,  $10^5$ /ml koncentrációjú huszonnégyszórási baktérium, illetve élesztő tenyészetekből készített szuszpenzióval oltottunk be. A kontroll tápoldat illóolajat nem tartalmazott. A tenyészeteket a 3.4. pontban leírt hőmérsékleteken, folyamatos rázatás mellett 48 órán át inkubáltuk. A fermentlevelekből kétóránként mintát vettünk (1 ml) és 580 nm hullámhosszon mértük az optikai denzitás változását (DU<sup>®</sup>-65 Spektrofotométer Beckman). Az eredmények alapján felvettük a szaporodási görbéket, valamint a logaritmikus fázisban kapott egyenesek segítségével meghatároztuk a szaporodási ráták és a lag fázisok hosszát.

#### Az antimikrobiális hatás meghatározása élősejtszám számolással

A szaporodási görbék meghatározásánál kétóránként vett mintákból tízes léptékű hígítási sort készítettünk, majd a hígítási sor tagjait az egyes mikroorganizmusoknak



megfelelő táptalajokat tartalmazó Petri-csészékre szélesztettük. A tenyészeteket 24 órán át a 3. 4. pontban leírt hőmérsékleteken inkubáltuk, majd ezután kiválasztottuk azt a hígítást, amely jól számolható telepmennyiséget ad. A megállapított telepszámot az eredeti tenyészet 1 ml mennyiségére jutó élősejtszám megadásához a hígítás mértékével szoroztuk, majd ezután meghatároztuk a különböző turbiditás értékekhez tartozó élősejtszámot.

#### Az antimikrobiális hatás meghatározása közvetlen sejtszámolási módszerrel

Az optikai denzitás ( $A_{580}$ ) értékek és a sejtszám közötti összefüggés meghatározásához a baktériumokból és élesztőkből az illóolajokat eltérő koncentrációban tartalmazó tápoldatokban 24 órás tenyészeteket állítottunk elő, majd az inkubációs idő letelte után Bürker-kamrában történő sejtszámolással megállapítottuk az egyes tenyészetek milliliterenkénti sejtszámát. A levett mintákból felező hígítási sort készítettünk öt lépésben, a különböző hígításokhoz tartozó optikai denzitás ( $A_{580}$ ) értékeket ábrázoltuk, majd ez alapján meghatároztuk a különböző turbiditás értékekhez tartozó sejtszámot.

#### Az illóolajok hatása Gram pozitív és Gram negatív baktériumok túlélésére

A túlélési kísérletekben 24 órás  $10^8$  CFU/ml koncentrációjú baktérium szuszpenzióhoz 1  $\mu$ l/ml töménységben kevertük az illóolajokat, majd 3 órás 37°C-on történő inkubálás után ötlépcsős tizedelő hígítási sort készítettünk, majd a hígítási sor tagjait Petri csészékre szélesztettük. A számolható telepszámokból meghatároztuk a túlélő sejtek számát.

#### **3.5.3. Az illóolajok spóraölő hatásának tesztelése**

A vizsgálatokban a boróka-, citrom-, majoránna- és muskotályzsálya illóolajok *B. subtilis* baktérium endospóráira gyakorolt spóraölő hatását teszteltük.

Hetvenkét órás baktérium tenyészetből 5 ml steril desztillált vízzel szuszpenziót készítettünk, melyet a vegetatív sejtek elpusztításának érdekében 20 percen át 80 °C hőmérsékleten tartottunk. A szuszpenzió centrifugálása (5000 rpm, 10 perc) után a csapadékot 5 ml steril desztillált vízben felvettük, majd ismételt centrifugálást követően (5000 rpm, 10 perc) a leülepedett endospórákat 5 ml steril fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk fel. A spórakoncentráció meghatározásához Bürker-kamrában történő számolást végeztünk, majd TGE tápoldat segítségével a spóraszámot  $10^6$ /ml töménységűre állítottuk be.

Az egyes illóolajokból 2 ml spóraszuszpenzióhoz 20 µl mennyiséget adtunk, ezután vortex-keverő segítségével történő elegyítést követően 24 órán keresztül 30 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A kontroll elegybe 20 µl steril fiziológiás sóoldatot kevertünk. Az inkubációs idő letelte után a szuszpenziókat centrifugáltuk (5000 rpm, 10 perc), majd a keletkezett csapadékot 2 ml fiziológiás sóoldatban vettük fel. Az endospóra szuszpenzióból tízes léptékű hígítási sort készítettünk négy lépcsőben, majd ezt követően mindegyik hígításból 100-100 µl mennyiséget TGE táptalajra szélesztettünk. A Petri-csészéket 24 órán át 30 °C hőmérsékleten inkubáltuk; az egyes illóolajok sporocid hatását a telepek kontroll tenyészetéhez viszonyított számával határoztuk meg.

#### A minimális sporocid koncentráció (MSC) meghatározása

Az MSC megállapításának érdekében  $10^6$ /ml endospóra töménységű TGE tápoldathoz (2 ml) különböző koncentrációban illóolajat (0, 2, 5 és 10%) adtunk, majd az elegyeket vortex-keverő segítségével történő keverés után 24 órán át 30°C hőmérsékleten inkubáltuk. A kontroll elegyhez 200 µl desztillált vizet adtunk. Ezt követően a sporocid hatás vizsgálatnál alkalmazott módon centrifugáltuk és hígítottuk a szuszpenziókat, melyből ezután 100-100 µl mennyiséget TGE táptalajra szélesztettünk, majd a csészéket 30 °C-on 24 órán át inkubáltuk. Az eredmények kiértékelésénél figyelembe vett MSC az a legkisebb illóolaj koncentráció, amelyenél nem tapasztaltunk telepképződést.

#### ***3.5.4. A pH befolyása a majoránna olaj antimikrobiális hatására***

A kísérletekben a tápoldat kémhatásának majoránnaolaj antimikrobiális hatására gyakorolt következményét vizsgáltuk az 1. táblázatban felsorolt élesztőknél. A tenyésztésekhez 100 ml-es Erlenmeyer lombikokat használtunk, melyekben a 30 ml mennyiségű MEA tápközeg kémhatását 0,1 N NaOH, illetve 0,1 N HCl segítségével pH 4.0, 5.0, 6.0 és 7.0 értékekre állítottuk. A tápoldatokhoz ezután 7,5 µl illóolajat adtunk, majd a lombikokat 100 µl,  $10^5$ /ml koncentrációjú huszonnégyórás élesztő tenyészetekből készített szuszpenzióval oltottunk be. A tenyészeteket 28°C hőmérsékleten 24 óráig inkubáltuk, majd az 580 nm hullámhosszon (DU<sup>®</sup>-65 Spektrofotométer Beckman) meghatározott optikai denzitás értékek alapján felvettük az egyes élesztők különböző pH értéken kapott szaporodási görbéit. A szaporodási görbékből meghatároztuk és összehasonlítottuk a szaporodási rátákat és a lag fázisokat.

### **3.5.5. Az antimikrobiális hatás tesztelése fonalas gombáknál**

A vizsgálatokat az 1. táblázatban felsorolt fonalas gombatörzsekkel végeztük el.

#### Fonalas gombák növekedése illóolaj gőztérben

A tesztekhez az úgynevezett fordított Petri-csésze módszert használtuk (FPCs) (Singh és mtsai, 2008). A Petri-csészékben lévő MEA táptalajra kacsnyi gombafonolat pontba szűrve vittünk fel, majd a csészék fedelébe egy-egy steril szűrőpapír korongot helyeztünk. Az egyes illóolajokból 50%-os DMSO oldat segítségével felező hígítási sort készítettünk 4 lépésben, majd ebből 30 µl mennyiséget a szűrőpapír korongokra pipettáztunk. A tömény illóolajat tartalmazó korongra hígítás nélkül 30 µl mennyiséget, míg a kontroll csészébe került korongra 30 µl 50%-os DMSO oldatot vittünk fel. Ezután parafilm segítségével a csészéket légmentesen lezártuk, így az illóolaj gőze nem képes kijutni a Petri-csészéből. A csészéket fordított helyzetben 30°C hőmérsékleten 4 napig inkubáltuk, mely alatt naponta mértük a telepek átmérőjét. A vizsgálatokat három párhuzamos sorozatban végeztük el.

#### Fonalas gombák növekedése illóolaj tartalmú közegben

Az úgynevezett mérgezett élelmiszer (szubsztrát) módszert (MSz) használtuk (Singh és mtsai, 2008), melyben az illóolajokat a 40 °C-os MEA táptalajba kevertük, úgy hogy a végkoncentráció 1, 0,5, 0,25, 0,125 és 0,0625 µl/ml legyen. Ezekből a táptalajokból 30 ml-t öntöttünk ki, így egy csészébe 30 - 1,875 µl illóolaj került, annyi, amennyi az előző kísérletben a korongon volt. A táptalaj szilárdulása után a csészékre egy-egy oltókacsnyi gombafonolat vittünk fel beszűrőszűrővel. A tenyészeteket 30°C hőmérsékleten 4 napig inkubáltuk, mely alatt naponta mértük a telepek átmérőjét. A vizsgálatokat jelen esetben is három párhuzamos sorozatban végeztük el.

### **3.5.6. A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása**

Az illóolajok MIC értékeinek megállapítását az 1. táblázatban szereplő baktérium (kivéve *S. marcescens*) és élesztő törzseknél, míg az egyes illóolaj komponensekét *B. cereus* és *S. cerevisiae* izolátumoknál vizsgáltuk. A különböző törzseket a növekedésüknek megfelelő, 3.4. pontban leírt tápközegben és hőmérsékleten inkubáltuk.

Az illóolajokra makrodilúciós, míg az illóolaj komponensekre mikrodilúciós módszerrel állapítottuk meg a MIC értéket. Az illóolaj koncentrációk 2 µl/ml-től változtak felező hígítási lépésekben 0,0625 µl/ml-ig, míg a komponensek koncentrációja 8 µl/ml-től 0,25 µl/ml-ig, szintén felező hígításban. A mikroorganizmusok tápoldattal elkészített  $10^6$ /ml sejtszámú szuszpenziójából 100 µl-t adtunk a tápközegekhez, majd a tenyészeteket 24 órán át inkubáltuk. A fotometriás mérést ( $A_{580}$ ) követően megállapítottuk a MIC értéket (DU<sup>®</sup>-65 Spektrofotométer, Beckman; ASYS Jupiter HD mikrotiterlap olvasó, ASYS Hitech), ami az a legkisebb illóolaj vagy komponens koncentráció, amely megakadályozza az adott mikroorganizmus szaporodását. Az illóolaj vagy illóolaj komponens, illetve szuszpenzió nélküli tápoldat (háttér) optikai denzitás értékét minden esetben kivontuk a kapott eredményből.

### ***3.5.7. Illóolajok és illóolaj komponensek kombinált antimikrobiális hatásának vizsgálata checkerboard-módszerrel***

#### Az illóolaj kombinációk hatásának vizsgálata

A tesztek a *B. cereus*, *B. subtilis* és *E. coli* baktériumokkal, valamint az 1. táblázatban felsorolt összes élesztő törzsnél végeztük.

A kísérletekben minden mikroorganizmusnál 36 db Erlenmeyer lombikot használtunk, melyekbe 30 ml, az adott izolátum növekedéséhez megfelelő tápoldatot mértünk. A lombikokat 6x6-os négyzetes elrendezésben helyeztük el, majd az 50%-os DMSO oldattal elkészített, különböző koncentrációjú illóolajokból (1, 0,5, 0,25, 0,125 és 0,0625 µl/ml) 1 ml mennyiséget pipettáztunk a tápoldatokhoz. A vizsgálatok során minden esetben a boróka olajjal kombináltunk egy másik illóolajat. A borókaolaj hígításait megfelelő sorrendben a 6x6-os elrendezésű négyzet soraiba pipettáztuk, míg a hat oszlopba a másik illóolaj hígításait vittük be, ezzel a két kombinálni kívánt illóolaj minden koncentrációja keveredett egymással. A lombikokat  $10^5$ sejt/ml koncentrációjú 24 órás baktérium, illetve élesztő szuszpenzióval oltottuk be. Az illóolaj párolgás gátlásához a lombikokat dupla alufóliával lezártuk, majd az elkészült „sakktabla” elrendezésű lombiksort a 3.4. pontban leírt hőmérsékleten történő folyamatos rázatás mellett 24 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a szemmel láthatóan zavaros, vagy üledéket tartalmazó lombikokat pozitívnak, míg az átlátszó tápoldatot tartalmazókat negatívnak tekintettük.

### Illóolajok fő komponenseinek kölcsönhatása

A fő illóolaj komponensek kölcsönhatásainak vizsgálatát *B. cereus* és *S. cerevisiae* mikroorganizmusok felhasználásával, mikrodilúciós módszerrel vizsgáltuk. Az izolátumokat a növekedésüknek megfelelő, 3.4. pontban leírt tápközegben és hőmérsékleten inkubáltuk.

A folyamat során az  $\alpha$ -pinén borókaolaj komponenssel párosítottunk egy másik illóolaj összetevőt, valamint egy linalol – terpinén-4-ol kombinációt is teszteltünk. A komponensek koncentrációját 8  $\mu$ l/ml-től felező hígításban változtattuk 0,25  $\mu$ l/ml-ig, majd az egyes tápközegekhez a  $10^6$ /ml sejtszámú, tápoldattal elkészített szuszpenziókból 100  $\mu$ l-t adtunk. Az optikai denzitás változását ASYS Jupiter HD (ASYS Hitech) mikrotiterlap olvasó segítségével 580 nm hullámhosszon mértük. Háttérként illóolaj komponens és szuszpenzió nélküli tápoldatot használtunk, melyet minden esetben kivontunk a kapott optikai denzitás értékéből.

### A frakcionált gátlási index (FICI) meghatározása

Az elvégzett checkerboard-titrálások eredményeiből a frakcionált gátlási index (FICI) kiszámolásával megállapítottuk az egyes illóolajok, illetve illóolaj komponensek közötti kölcsönhatásokat. Először az egyes illóolajokra a frakcionált gátlási koncentráció (FIC) értéket számoltuk ki a MIC (minimális gátlási koncentráció) alapján:

$$FIC = \frac{MIC_{\text{kombinációban}}}{MIC_{\text{illóolaj egyedül}}}$$

A FIC index (FICI) egyenlő az egyes illóolajokra megadott FIC-ek összegével. A és B illóolajra:

$$FICI = FIC_A + FIC_B$$

A két illóolaj között fellépő kölcsönhatás (Gutierrez és mtsi, 2008):

szinergista, ha  $FICI < 0,5$

additív, ha  $0,5 \leq FICI \leq 1,0$

indifferens, ha  $1 < \text{FICI} < 4$   
antagonista, ha  $\text{FICI} > 4$ .

### **3.5.8. Illóolajok kölcsönhatása élelmiszer összetevőkkel**

Az élelmiszer összetevőkkel folytatott vizsgálatokat *B. cereus* és *E. coli* izolátumoknál, az 3. 3. pontban leírt, húskivonatot, szójapeptont vagy szacharózt különböző koncentrációban tartalmazó tápoldatok felhasználásával végeztük. A tápoldatokat 100 µl,  $10^5/\text{ml}$  koncentrációjú huszonnégy órás tenyészetekből készített szuszpenzióval oltottunk be. A tenyészeteket folyamatos rázatás mellett 48 órán át inkubáltuk az 3. 4. pontban leírt hőmérsékleteken, majd az 580 nm hullámhosszon (DU<sup>®</sup>-65 Spektrofotométer, Beckman) megállapított optikai denzitás értékek alapján felvettük a szaporodási görbéket, ezután meghatároztuk a szaporodási rátákat és a lag fázisok hosszát.

### **3.5.9. Illóolajok antimikrobiális hatása élelmiszerekben**

#### Illóolajok antimikrobiális hatása élesztőkre almalevekben és tejben

A kísérletek során szűrt almalevet (szárazanyag-tartalom 12%, cukortartalom 12,5%; pH 3.6; Monfresh Juice, Mongólia), szűretlen almalevet (szárazanyag-tartalom 11%, cukortartalom 11,5%; pH 4.5; Monfresh Juice, Mongólia), valamint fölözött tehéntejet (Mongólia) használtunk tápközegként. A tenyésztéseket 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban végeztük.

Az 1. táblázatban felsorolt élesztőgombák 24 órás tenyészetéből  $10^5/\text{ml}$  koncentrációjú szuszpenziót készítettünk, melyből 100 µl mennyiséget 30 ml, 0,25 µl/ml koncentrációban citromolajjal kiegészített tápoldatba oltottunk. A kontroll tápoldat illóolajat nem tartalmazott. Az 24 órán át 28 °C hőmérsékleten, folyamatos rázatás mellett inkubált tenyészetekből kétóránként mintát vettünk (1 ml), melyből tízes léptékű hígítási sort készítettünk 4 lépcsőben, majd ezt követően mindegyik hígításból 100-100 µl mennyiséget MEA táptalajra szélesztettünk. A Petri-csészéket 24 órán át 28 °C hőmérsékleten inkubáltuk, ezután a citromolaj almalevekben és tejben tapasztalt gátló hatását a telepek kontroll tenyészetéhez viszonyított számával vizsgáltuk. A logaritmus sejtszám - idő függvényekből meghatároztuk az illóolajat nem tartalmazó, illetve tartalmazó összeállításokban a szaporodási ráták és a lag fázisok változását.

### Illóolajok antimikrobiális hatása *E. coli* baktériumra darált sertéshúsbán

A vizsgálatokban 100 g darált sertéshúshoz különböző koncentrációban (0,125, 0,25, 0,5 és 1%; m/v%) kakukkfű illetve majoránna illóolajat adtunk, majd beoltottuk 1 ml  $10^4$ /ml *E. coli*-al. A 24 órás 5 °C-on való tárolás után a csíraszám változást csészére szélesztéses módszerrel vizsgáltuk. A húskeverékből 10 g-ot bemértünk 90 ml fiziológiás sóoldatba, laposan összekevertük és 10 percig állni hagytuk. Ezután a felülúszóból ötlépcsős tizedelő hígítási sort készítettünk. Mindegyik hígításból kivettünk 100-100  $\mu$ l-t és 2-2 csészére szélesztettük, majd a csészéket 24 órára 37 °C-os inkubátorba helyeztük. Az inkubációs idő végén a telepszámból megállapítottuk a darált hús 1 g-jában található telepkepző egységek számát (CFU/ml).

### Illóolajok gombaellenes hatása kenyérszeleten

Csomagolt, szeletelt fehér, félbarna és rozskenyérből antiszeptikus körülmények között (steril fülke alatt, UV-val besugárzott alufólián) egy 9 cm-es formával kör alakú szeleteket vágunk ki, melyeket Petri csészékbe helyeztünk. A kenyérszeletek magassága 10-11 mm volt. *A. niger*, *P. chrysogenum* és *F. sporotrichioides*, illetve egy előzőleg kenyérről izolált *R. stolonifer* 72 órás tenyészetéről steril fiziológiás sóoldattal lemostuk a spórákat, és Bürker kamrás sejtszámolás segítségével  $10^4$ /ml-re hígítottuk a szuszpenzió spóraszámát. Ebből a szuszpenzióból 30  $\mu$ l-t vittünk fel a kenyerek közepére. A Petri csésze fedelébe egy csepp agarral beragasztottunk egy 10 mm átmérőjű steril papírkorongot, amire 30  $\mu$ l majoránna vagy muskotályzsálya-olajat vittünk fel. A kontroll csészékben az illóolaj helyett 30  $\mu$ l steril desztillált vizet cseppentettünk a korongra. A csészéket parafilmmel lezártuk, hogy megelőzzük a párolgást, és szobahőmérsékleten (22 °C) 14 napon keresztül figyeltük a penészgombák megjelenését. Az első megjelenéstől számítva naponta mértük a gombatelepek átmérőjét.

### **3.6. Érzékszervi vizsgálatok**

Az almalevek és fölözött tej esetében egy négytagú bíráló bizottság végezte az érzékszervi vizsgálatot. Az illóolajjal kiegészített és az illóolajat nem tartalmazó italok illatát és ízét hasonlították össze egyszerű leíró módszerrel. A vizsgálat lényege, hogy a két tulajdonságcsoport jellemzésére legfeljebb 3-3 pozitív és 3-3 negatív jelzöt fogalmaztatunk

meg az egyes bírálókkal, majd ezeket összegezve kiválasztjuk a bírálói csoport által megfogalmazott, maximum 3 legfontosabb pozitív és maximum 3 legfontosabb negatív jelzöt. A kapott eredmény alapján megállapítjuk a mintáról, hogy inkább pozitív vagy negatív a megítélése. A pozitív és negatív jelzők számaránya minősíti a terméket jónak vagy rossznak.

### **3.7. Alkalmazott statisztikai módszerek**

Vizsgálati eredményeinket páros T próba vagy egyutas ANOVA analízissel vizsgáltuk SPSS 9.0 szoftver segítségével  $p < 0,05$  szignifikancia szint mellett.



## 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

### 4.1. Illóolajok antibakteriális, antifungális hatásának előtesztelése, a megfelelő illóolajok kiválasztása

Az előtesztelést agardiffúziós lyukteszttel végeztük. Több oldószert is kipróbáltunk, különböző koncentrációjú etanolt, illetve dimetil-szulfoxidot (DMSO). Etanol esetében gyakori tapasztalat volt, hogy a lyuk alján tömény illóolaj maradékot láttunk, ami nem diffundált be a táptalajba. Végül az 50%-os DMSO mellett döntöttünk, és inkubáció előtt 2 órára hűtőszekrénybe (+8 °C) helyeztük a csészéket, hogy megakadályozzuk az illóolaj elpárolgását, és segítsük a táptalajba történő bediffundálást. A 4. táblázat adataiból látható, hogy ezekben a tesztekben a legkevésbé érzékeny baktérium a Gram negatív *S. marcescens* és *E. coli* volt. A Gram pozitívak közül a *B. cereus* érzékenyebbnek bizonyult a *B. subtilis*-nél. Az élesztők mindegyike érzékenynek bizonyult, kivéve a *P. anomala*-t. A két zsíros olaj, a szőlőmag- és homoktövis-olaj alig vagy egyáltalán nem mutatott gátló hatást. Gyenge gátlás lépett fel az édeskömény és gyömbér illóolaj esetében. A majoránna és muskotályzsálya olaj közepes, míg a boróka- és citromolaj jó gátló hatással rendelkezett.

**4. táblázat:** Gátlási zónák (mm) 100 µl/ml illóolaj koncentráció mellett.

Faj / Illóolaj	Ánizs	Boróka	Citrom	Édes- kömény	Gyömbér	Homok- tövis	Majoránna	Musk. zsálya	Szőlő
<i>B. subtilis</i>	-	10	12	-	-	-	-	13	-
<i>B. cereus</i>	-	12	10	15	10	-	10	13	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	12	-	-	12	11	-
<i>E. coli</i>	-	13	11	-	-	-	10	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	11	18	14	-	-	-	10	11	-
<i>S. pombe</i>	10	-	20	12	12	-	-	12	-
<i>G. candidum</i>	-	11	12	-	11	11	12	-	-
<i>P. anomala</i>	-	15	12	-	-	-	-	-	-

**5. táblázat:** Illóolajok közötti kölcsönhatás vizsgálata lyukdiffúziós rendszerben

Faj / Illóolaj	Illóolaj	Citrom			Édeskömény			Homoktövis			Majoránna			Ánizs			Muskotályzsálya			Szőlő			Gyömbér		
		Konc.:	50	100	200	50	100	200	50	100	200	50	100	200	50	100	200	50	100	200	50	100	200	50	100
<i>B. subtilis</i>		S	A	-	S	S	S	-	S	S	S	S	A	-	-	-	S	A	A	-	-	-	-	S	S
<i>B. cereus</i>		A	A	A	N	N	N	A	A	-	S	A	A	A	A	N	A	N	N	A	A	N	A	A	A
<i>E. coli</i>		S	S	A	S	S	A	-	-	-	-	S	A	S	S	A	-	S	A	S	-	A	A	A	A
<i>S. marcescens</i>			S	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>		S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	N	S	S	S	S	S	S
<i>S.pombe</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-	S	S	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. candidum</i>		A	A	A	A	-	-	A	A	N	S	A	N	S	S	S	S	A	A	A	A	A	A	A	N
<i>P. anomala</i>		A	A	A	A	A	A	A	N	N	A	A	A	-	-	-	A	N	N	A	A	N	N	N	N

A - additív hatás; S- szinergizmus; N- antagonizmus; - nincs kölcsönhatás

Az illóolajok kölcsönhatásának vizsgálatához 100 µl/ml koncentrációjú borókaolajhoz kevertük a többi illóolajat 50, 100 és 200 µl/ml koncentrációban (5. táblázat). A kölcsönhatás-vizsgálatokból látható, hogy gyakran szinergista vagy additív hatás lépett fel. Ugyanaz a kombináció a különböző mikroorganizmusok esetében különböző hatást eredményezett: *S. marcescens* és *S. pombe* esetében gyakran nem volt semmilyen kölcsönhatás, míg *B. cereus*, *G. candidum* és *P. anomala* esetében a két illóolaj gyakran kioltotta egymás hatását, azaz antagonizmus lépett fel. A legjobb kombináció a citrom- és borókaolaj volt, mely szinte minden koncentrációban pozitív kölcsönhatást mutatott. Ezekben az illóolajokban a fő komponensek, a limonén és  $\alpha$ -pinén, hasonló szerkezetűek, a ciklikus terpének közé tartoznak - talán ezzel magyarázható, hogy kiegészítik egymás hatását.

Az előkísérletek eredményei alapján a következő 4 illóolajat választottunk ki: boróka-, citrom-, majoránna- és muskotályzsálya-olaj. A továbbiakban ezekkel dolgoztunk.

## **4.2. Illóolajok hatása baktériumok és élesztők szaporodási paramétereire**

Az illóolajok hatását a baktériumok és élesztők - abszorbancia mérések alapján meghatározott - szaporodási paramétereiben bekövetkező változásokkal mértük. A szaporodási rátát és a nyugalmi szakaszok hosszát (lag fázis) a szaporodási görbe exponenciális szakaszára illesztett egyenes meredekségéből és metszéspontjából határoztuk meg. Összehasonlítottuk a stacioner fázisban elért maximális sejtszámokat is.

### **4.2.1. Illóolajok gátló hatása Gram pozitív baktériumok növekedésére**

Általánosságban elmondható, hogy az illóolajok növekvő koncentrációja egyre hosszabb lag fázisokat eredményezett, *B. cereus* esetében 0,5 és 1 µl/ml muskotályzsálya-olaj hatására 48 órán keresztül nem volt szaporodás megfigyelhető (6. táblázat). Boróka és majoránna esetében csak a két legnagyobb koncentrációnál nyúlt meg szignifikánsan a nyugalmi szakasz, míg a citromnál minden koncentráció egyre hosszabb lag fázist eredményezett. A szaporodási ráták csökkenése a kontrollhoz képest többé-kevésbé független volt a koncentrációtól, kivéve a majoránna- és a citromolaj esetét, ahol a szaporodási ráta szignifikánsan csökkent a növekvő koncentrációkkal ( $p < 0.01$ ).

**6. táblázat:** Illóolajok hatása *Bacillus cereus* növekedési paramétereire

	Koncentráció ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	Lag fázis (h) $\pm$ szórás	Maximum specifikus szaporodási ráta ( $\text{h}^{-1}$ ) $\pm$ szórás
Kontroll	0	5,63 $\pm$ 0,47 a*	0,311 $\pm$ 0,022 a
Muskotályzsálya	0,0625	8,87 $\pm$ 1,10 a	0,262 $\pm$ 0,028 a
	0,125	10,16 $\pm$ 1,34 b	0,202 $\pm$ 0,108 a
	0,25	20,02 $\pm$ 3,35 c	0,138 $\pm$ 0,069 b
	0,5	>48,00 -	-
	1	>48,00-	-
Boróka	0,0625	7,28 $\pm$ 0,87 a	0,260 $\pm$ 0,011 a
	0,125	6,79 $\pm$ 0,21 a	0,257 $\pm$ 0,000 a
	0,25	7,64 $\pm$ 0,36 a	0,222 $\pm$ 0,006 b
	0,5	10,81 $\pm$ 1,51 b	0,176 $\pm$ 0,040 b
	1	15,74 $\pm$ 4,09 b	0,207 $\pm$ 0,062 b
Citrom	0,0625	6,72 $\pm$ 0,85 a	0,296 $\pm$ 0,001 a
	0,125	7,11 $\pm$ 1,11 b	0,236 $\pm$ 0,022 b
	0,25	7,73 $\pm$ 0,52 b	0,240 $\pm$ 0,005 b
	0,5	11,89 $\pm$ 0,04 c	0,235 $\pm$ 0,010 b
	1	23,48 $\pm$ 0,55 d	0,215 $\pm$ 0,011 b
Majoránna	0,0625	6,98 $\pm$ 0,83 a	0,293 $\pm$ 0,017 a
	0,125	7,05 $\pm$ 0,82 a	0,294 $\pm$ 0,026 a
	0,25	7,24 $\pm$ 0,24 a	0,208 $\pm$ 0,000 b
	0,5	10,50 $\pm$ 1,10 b	0,127 $\pm$ 0,006 c
	1	27,66 $\pm$ 0,79 c	0,099 $\pm$ 0,020 c

\*A különböző betűkkel jelölt értékek között az eltérés szignifikáns ( $p < 0,05$ ).

*B. subtilis* esetében a lag fázisok változása hasonló volt, mint a *B. cereus*-nál, azaz általában csak a legmagasabb illóolaj koncentrációk okoztak szignifikáns hosszabbodást, és a muskotályzsálya olaja 1  $\mu\text{l/ml}$  koncentrációban itt is 48 óránál hosszabb nyugalmi szakaszt eredményezett. Citromolaj hatására koncentrációtól függetlenül csökkentek a szaporodási ráták, míg – némileg meglepő módon – a majoránna-olaj hatására nőtt a szaporodási sebesség (7. táblázat). A 48 órás mérési periódus végén meghatározott sejtszámok csak a citrom- és muskotályzsálya-olaj legmagasabb koncentrációja mellett mutattak egy nagyságrendnyi csökkenést a kezeletlen mintához viszonyítva,  $10^9$  sejt/ml-ről  $10^8$  sejt/ml-re csökkentek mindkét baktérium esetében.

**7. táblázat:** Illóolajok hatása *Bacillus subtilis* növekedési paramétereire

	Koncentráció ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	Lag fázis (h) $\pm$ szórás	Maximum specifikus szaporodási ráta ( $\text{h}^{-1}$ ) $\pm$ szórás
Kontroll	0	$3,15 \pm 1,16$ a*	$0,293 \pm 0,074$ a
Muskotályzsálya	0,0625	$4,17 \pm 0,77$ a	$0,254 \pm 0,017$ a
	0,125	$7,69 \pm 0,27$ ab	$0,251 \pm 0,011$ ac
	0,25	$10,55 \pm 0,53$ b	$0,285 \pm 0,027$ ac
	0,5	$33,34 \pm 1,80$ c	$0,106 \pm 0,021$ b
	1	>48,00-	-
Boróka	0,0625	$2,26 \pm 0,23$ a	$0,297 \pm 0,005$ a
	0,125	$3,25 \pm 0,23$ a	$0,316 \pm 0,042$ a
	0,25	$3,49 \pm 0,44$ a	$0,325 \pm 0,022$ a
	0,5	$14,49 \pm 0,47$ b	$0,315 \pm 0,027$ a
	1	$28,57 \pm 0,51$ d	$0,313 \pm 0,052$ a
Citrom	0,0625	$2,96 \pm 0,27$ a	$0,211 \pm 0,009$ c
	0,125	$2,84 \pm 0,31$ a	$0,218 \pm 0,011$ ca
	0,25	$2,88 \pm 0,15$ a	$0,215 \pm 0,010$ c
	0,5	$2,78 \pm 0,23$ a	$0,199 \pm 0,008$ c
	1	$12,06 \pm 0,30$ b	$0,210 \pm 0,017$ c
Majoránna	0,0625	$5,30 \pm 0,26$ a	$0,431 \pm 0,041$ d
	0,125	$5,25 \pm 0,27$ a	$0,419 \pm 0,018$ d
	0,25	$8,84 \pm 0,74$ ab	$0,405 \pm 0,033$ d
	0,5	$18,32 \pm 0,59$ b	$0,320 \pm 0,008$ a
	1	$36,51 \pm 0,43$ c	$0,443 \pm 0,030$ d

\* A különböző betűkkel jelölt értékek között az eltérés szignifikáns ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Illóolajok hatása Gram negatív baktériumok növekedésének gátlására

A Gram negatív *E. coli* fontos indikátorszervezet az élelmiszeripari mikrobiológiában, mivel a nem megfelelő üzemi és személyi higiénia következtében elszaporodhat az élelmiszerekben. Néhány törzs, mint az *E. coli* O157H7 komoly humánpatológiai tényező, mely az ételmérgezés mellett szervkárosodásokat (vese és máj) is okozhat. A védekezésben a szigorú technológiai fegyelem mellett szerepe van a különböző csíraszám-csökkentő eljárásoknak is.

**8. táblázat:** Illóolajok hatása *Escherichia coli* növekedési paramétereire

	Koncentráció ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	Lag fázis (h) $\pm$ szórás	Maximum specifikus szaporodási ráta ( $\text{h}^{-1}$ ) $\pm$ szórás
Kontroll	0	9,05 $\pm$ 0,95 a*	0,385 $\pm$ 0,019 a
Muskotályzsálya	0,0625	9,67 $\pm$ 2,33 a	0,363 $\pm$ 0,003 a
	0,125	11,10 $\pm$ 0,48 a	0,373 $\pm$ 0,053 a
	0,25	11,60 $\pm$ 0,40 a	0,358 $\pm$ 0,052 a
	0,5	11,39 $\pm$ 0,86 a	0,371 $\pm$ 0,028 a
	1	13,13 $\pm$ 5,08 a	0,298 $\pm$ 0,025 a
Boróka	0,0625	10,56 $\pm$ 1,44 a	0,399 $\pm$ 0,039 a
	0,125	10,38 $\pm$ 0,89 a	0,415 $\pm$ 0,014 a
	0,25	11,37 $\pm$ 0,32 a	0,419 $\pm$ 0,034 a
	0,5	11,25 $\pm$ 0,38 a	0,419 $\pm$ 0,039 a
	1	12,06 $\pm$ 0,09 a	0,403 $\pm$ 0,011 a
Citrom	0,0625	10,95 $\pm$ 1,05 a	0,361 $\pm$ 0,009 a
	0,125	11,03 $\pm$ 0,97 a	0,249 $\pm$ 0,000 b
	0,25	11,30 $\pm$ 0,70 a	0,257 $\pm$ 0,022 b
	0,5	11,72 $\pm$ 0,28 a	0,255 $\pm$ 0,023 b
	1	12,13 $\pm$ 0,13 a	0,319 $\pm$ 0,051 a
Majoránna	0,0625	8,55 $\pm$ 1,91 a	0,353 $\pm$ 0,006 a
	0,125	10,95 $\pm$ 0,43 a	0,365 $\pm$ 0,043 a
	0,25	11,62 $\pm$ 0,00 a	0,331 $\pm$ 0,025 a
	0,5	29,86 $\pm$ 1,80 b	0,331 $\pm$ 0,056 a
	1	>48,00-	-

\* A különböző betűkkel jelölt értékek között az eltérés szignifikáns ( $p < 0,05$ ).

Az általunk vizsgált illóolajok közül csak a majoránna volt számottevő hatással az *E. coli* lag fázisának hosszára: 1  $\mu\text{l/ml}$  feletti koncentrációban 48 óránál hosszabb volt a nyugalmi szakasz (8. táblázat). A szaporodási ráták gyakorlatilag nem változtak egyik illóolaj hatására sem (kivéve a citromolajat) és a lag fázisok sem különböztek szignifikánsan a kontrollhoz képest.

#### 4.2.3. Az illóolajok hatása az élesztőgombák növekedésére

Az élesztők a magas cukortartalmú és alacsony pH-jú élelmiszerek erjedéses romlását okozhatják. Különösen érzékenyek az ilyen romlásokra a gyümölcs- és zöldségkészítmények, levek, pürék, CO<sub>2</sub>-mentes üdítőitalok (Deák, 2007; Stratford, 2006). A 10. és 11. táblázatban az illóolajoknak a hártvaképző *P. anomala*, a tej keseredését okozó *G. candidum*, valamint a romlott gyümölcslevekből leggyakrabban izolált *S. cerevisiae* és *S. pombe* szaporodási paramétereire kifejtett hatását láthatjuk.

A legtöbb esetben a lag fázisok szignifikánsan hosszabbodtak az egyre nagyobb illóolaj koncentrációk hatására, különösen 0.25 µl/ml koncentráció felett. A 48 órás vizsgálati idő alatt a *S. cerevisiae* a legmagasabb citrom- és borókaolaj koncentrációk mellett nem kezdett el szaporodni. A legérzékenyebb élesztő a *S. pombe* volt; egyáltalán nem szaporodott az 1 µl/ml illóolaj koncentrációknál egyik olaj esetében sem (10. táblázat). A szaporodási rátáknál szignifikáns csökkenés csak 0.5 µl/ml koncentrációk felett volt (9. táblázat). A stationer fázisban elért maximális sejtszám majoránna hatására *P. anomala* és *S. cerevisiae* esetében egy nagyságrenddel, míg *G. candidum* esetében két nagyságrenddel csökkent. *S. pombe* sejtszáma szintén egy nagyságrenddel csökkent muskotályzsálya- (0.5 µl/ml) és citromolaj (0.25 µl/ml) hatására.

Összefoglalva eredményeinket, elmondhatjuk, hogy az abszorbancia mérések alapján megállapított szaporodási paraméterek közül mind a baktériumoknál, mind az élesztőknél az illóolaj jelenléte kevésbé befolyásolta a szaporodási sebességet, mint a lag fázis hosszát. A nyugalmi szakaszban a mikroorganizmusok alkalmazkodnak a környezetükhöz, enzimeket termelnek, és energiatartalékokat képeznek. Ha ez az alkalmazkodás sikeres volt, és képesek voltak az osztódásra, a szaporodási sebességet már nem befolyásolta jelentősen a cidikus dózis alatti koncentrációban jelenlévő gátlóanyag. A stationer fázisban elért maximális sejtszámok csupán 1-2 nagyságrenddel csökkentek, vagy egyáltalán nem változtak a különböző koncentrációjú illóolajok hatására. A Gram pozitív baktériumok érzékenyebbnek bizonyultak a Gram negatívaknál, mint azt több szerző is leírta már (Burt, 2004; Hammer és mtsai, 1999). A Gram negatív baktériumok külső membránja gátolja a kismolekulájú hidrofób anyagok és a nagy molekulatömegű anyagok bejutását, ami magyarázhatja e baktériumok viszonylagos érzéketlenségét az illóolajok iránt.

**9. táblázat:** Illóolajok hatása élesztők szaporodási sebességére tápoldatban

		Szaporodási ráta (1/h, átlag ± szórás)			
	Koncentráció ( $\mu\text{l/ml}$ )	<i>G. candidum</i>	<i>P. anomala</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sch. pombe</i>
Kontroll	0	0,243 ± 0,020 a*	0,187 ± 0,026 a	0,149 ± 0,009 a	0,171 ± 0,010 a
Muskotályzsálya	0,0625	0,213 ± 0,027 b	0,144 ± 0,026 b	0,135 ± 0,011 a	0,175 ± 0,010 a
	0,125	0,203 ± 0,008 b	0,153 ± 0,013 b	0,141 ± 0,002 a	0,226 ± 0,029 b
	0,25	0,204 ± 0,009 b	0,159 ± 0,019 b	0,141 ± 0,008 a	0,101 ± 0,035 c
	0,5	0,150 ± 0,002 c	0,137 ± 0,011 b	0,104 ± 0,012 b	0,013 ± 0,002 d
	1	0,131,± 0,002 c	0,081 ± 0,002 c	0,127,± 0,005 b	0,000
Boróka	0,0625	0,254 ± 0,020 a	0,163 ± 0,011 a	0,146 ± 0,019 a	0,163 ± 0,011 a
	0,125	0,239 ± 0,020 a	0,193 ± 0,034 a	0,138 ± 0,005 a	0,193 ± 0,034 a
	0,25	0,238 ± 0,011 a	0,179 ± 0,035 a	0,141 ± 0,006 a	0,179 ± 0,035 a
	0,5	0,223 ± 0,034 ab	0,160 ± 0,006 b	0,216 ± 0,048 b	0,000
	1	0,192 ± 0,019 b	0,065 ± 0,019 c	0,000	0,000
Citrom	0,0625	0,201 ± 0,014 b	0,198 ± 0,033 a	0,148 ± 0,034 a	0,174 ± 0,031 a
	0,125	0,228 ± 0,015 ab	0,160 ± 0,005 b	0,162 ± 0,018 a	0,111 ± 0,013 b
	0,25	0,212 ± 0,013 b	0,184 ± 0,024 a	0,159 ± 0,010 a	0,000
	0,5	0,171 ± 0,019 c	0,190 ± 0,041 a	0,172 ± 0,005 a	0,000
	1	0,138 ± 0,007 d	0,092 ± 0,004 c	0,000	0,000
Majoránna	0,0625	0,216 ± 0,024 b	0,183 ± 0,016 a	0,129 ± 0,018 b	0,152 ± 0,016 b
	0,125	0,189 ± 0,014 c	0,186 ± 0,026 a	0,129 ± 0,006 b	0,149 ± 0,007 b
	0,25	0,196 ± 0,015 bc	0,183 ± 0,008 a	0,121 ± 0,010 b	0,141 ± 0,005 b
	0,5	0,127 ± 0,002 d	0,099 ± 0,013 b	0,122 ± 0,001 b	0,155 ± 0,013 b
	1	0,078 ± 0,019 e	0,040 ± 0,014 c	0,029 ± 0,020 c	0,000

\* A különböző betűk szignifikáns eltéréseket jeleznek ( $p < 0.05$ )



**10. táblázat:** Illóolajok hatása élesztők lag fázis időtartamára tápoldatban

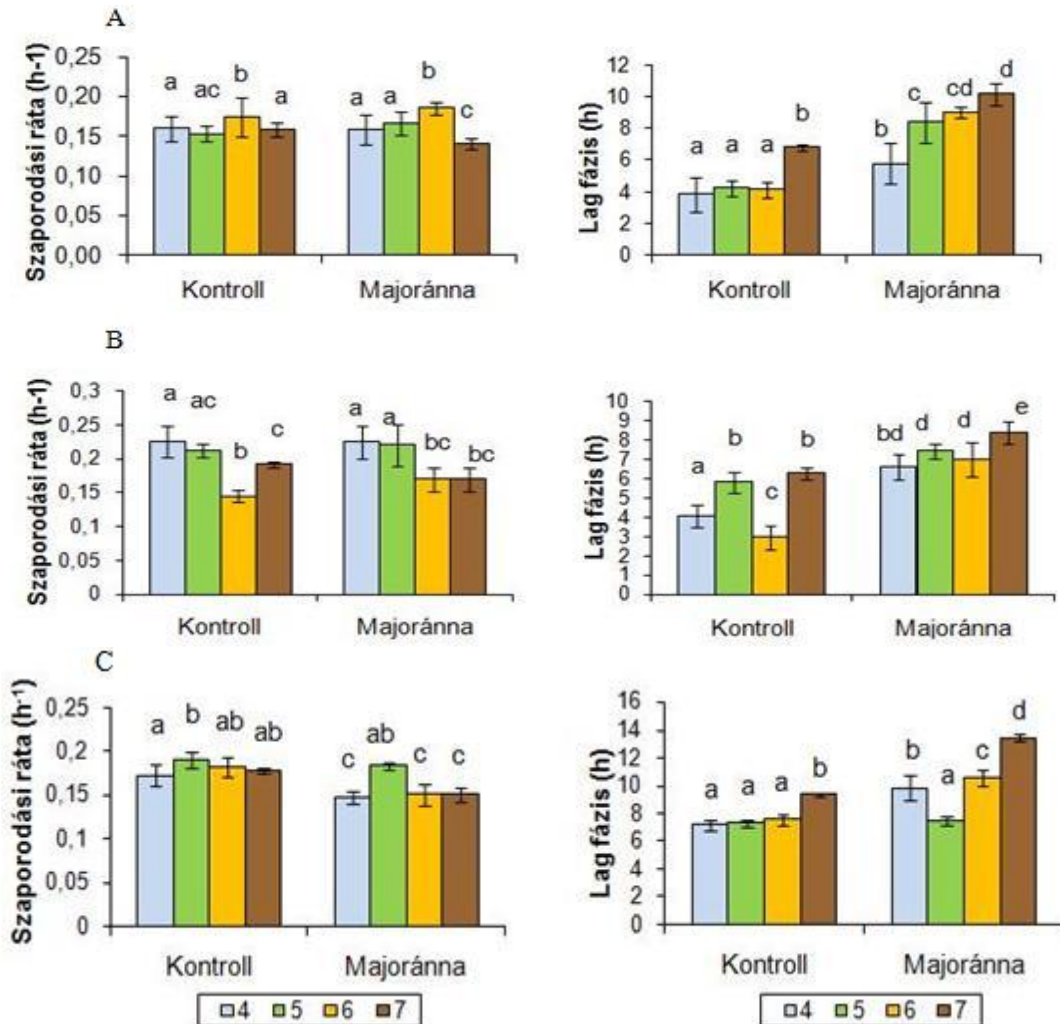
	Koncentráció ( $\mu\text{l/ml}$ )	Lag fázis (h, átlag $\pm$ szórás)			
		<i>G. candidum</i>	<i>P. anomala</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sch. pombe</i>
Kontroll	0	7,44 $\pm$ 0,34 a*	5,47 $\pm$ 0,57 a	6,38 $\pm$ 0,36 a	7,35 $\pm$ 0,30 a
Muskotályzsálya	0,0625	10,12 $\pm$ 0,44 b	6,58 $\pm$ 0,52 b	7,21 $\pm$ 0,83 a	9,64 $\pm$ 1,16 a
	0,125	9,80 $\pm$ 0,36 b	8,15 $\pm$ 0,54 c	6,74 $\pm$ 0,49 a	14,65 $\pm$ 3,70 b
	0,25	9,83 $\pm$ 0,22 b	11,42 $\pm$ 1,06 d	9,67 $\pm$ 1,05 b	18,25 $\pm$ 1,88 c
	0,5	14,56 $\pm$ 0,26 c	18,45 $\pm$ 0,55 e	11,32 $\pm$ 1,27 c	17,55 $\pm$ 0,37 c
	1	20,55 $\pm$ 0,23 d	18,76 $\pm$ 0,51 e	22,20 $\pm$ 1,21 d	>48
Boróka	0,0625	8,95 $\pm$ 0,43 b	4,40 $\pm$ 0,42 a	6,87 $\pm$ 0,76 a	7,77 $\pm$ 1,24 a
	0,125	9,14 $\pm$ 0,46 b	5,67 $\pm$ 0,78 ab	7,13 $\pm$ 0,58 b	15,87 $\pm$ 4,86 b
	0,25	8,57 $\pm$ 0,25 b	6,53 $\pm$ 1,13 b	19,85 $\pm$ 0,15 c	19,61 $\pm$ 1,22 c
	0,5	9,76 $\pm$ 0,46 c	19,26 $\pm$ 0,87 c	26,63 $\pm$ 0,96 d	>48
	1	12,05 $\pm$ 0,40 d	21,74 $\pm$ 2,31 d	>48	>48
Citrom	0,0625	8,67 $\pm$ 0,35 b	6,35 $\pm$ 0,79 b	6,02 $\pm$ 0,30 a	18,55 $\pm$ 1,21 b
	0,125	11,37 $\pm$ 0,13 c	5,27 $\pm$ 0,13 a	6,85 $\pm$ 0,90 ab	17,82 $\pm$ 0,61 b
	0,25	13,68 $\pm$ 0,34 d	10,13 $\pm$ 0,53 c	7,40 $\pm$ 0,42 b	>48
	0,5	20,88 $\pm$ 0,38 e	19,38 $\pm$ 1,05 d	21,41 $\pm$ 0,40 c	>48
	1	22,95 $\pm$ 0,20 f	22,05 $\pm$ 0,16 e	>48	>48
Majoránna	0,0625	9,40 $\pm$ 0,40 b	6,72 $\pm$ 0,60 a	5,73 $\pm$ 0,47 a	21,66 $\pm$ 1,22 b
	0,125	9,78 $\pm$ 0,37 b	9,55 $\pm$ 1,33 b	6,11 $\pm$ 0,20 a	22,22 $\pm$ 1,06 b
	0,25	10,72 $\pm$ 0,39 c	10,82 $\pm$ 0,59 b	6,13 $\pm$ 0,28 a	22,25 $\pm$ 0,36 b
	0,5	20,49 $\pm$ 0,10 d	19,18 $\pm$ 0,66 c	7,25 $\pm$ 0,09 a	27,21 $\pm$ 0,44 c
	1	34,17 $\pm$ 0,10 e	26,43 $\pm$ 1,34 d	39,14 $\pm$ 1,91 b	>48

\*Különböző betűk szignifikáns eltéréseket jeleznek ( $p < 0.05$ )

Nem volt lényeges különbség az eukarióta élesztők és a prokarióta baktériumok érzékenysége között, ami arra utal, hogy az illóolajok fő támadáspontja, mindkét esetben, az alapvető felépítésben megegyező sejthártya lehet (Cox és mtsai, 2000; Burt, 2004; Cristani és mtsai, 2007).

### **4.3. A pH szerepe az illóolajok élesztők elleni hatásában**

A legtöbb illóolaj antimikrobiális hatása savas közegben nagyobb. Ilyenkor ugyanis nem disszociált formában találhatók, hidrofób tulajdonságuk dominál (Burt, 2004), a kismolekulájú hidrofób komponensek pedig könnyebben átjutnak a sejtmembránon. Az élesztők elsősorban alacsony pH-jú élelmiszerekben szaporodnak el, ezért feltételezhető, hogy az illóolajok gátló hatása jól érvényesül ebben a környezetben. Kísérleti eredményeink alapján a majoránna-olaj a semleges pH-án mutatta a legerősebb gátlást: a lag fázis hossza szignifikánsan nőtt, míg a szaporodási ráta szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. Azonban *S. cerevisiae* és *G. candidum* esetében illóolaj nélkül is hosszabbak voltak a pH 7-en mért lag fázisok, annak megfelelően, hogy az élesztők növekedéséhez ideális pH tartomány 4 és 6 között van (2. ábra). Ebben a savas tartományban az illóolaj kevésbé volt hatással a szaporodási rátákra, de a lag fázisok itt is hosszabbak voltak a kontrollhoz képest. A legérzékenyebbnek ebben a kísérletben is a *S. pombe* bizonyult; majoránna-olaj mellett nem tapasztaltunk szaporodást a 24 órás vizsgálati idő alatt a pH 6 és pH 7-re állított tápoldatban. Eredményeink alapján az élesztők számára megfelelő savas pH-án az illóolajok antimikrobiális tulajdonsága jól érvényesül, még ha nem is itt fejtik ki a maximális hatásukat. Tapasztalatainkat megerősíti Nguefack és mtsai (2009) közlése, mely szerint nemcsak a közeg pH-ja, hanem a vizsgált mikroorganizmus savas vagy bázikus környezeti igénye is befolyásolja a gátlóanyagok hatását.

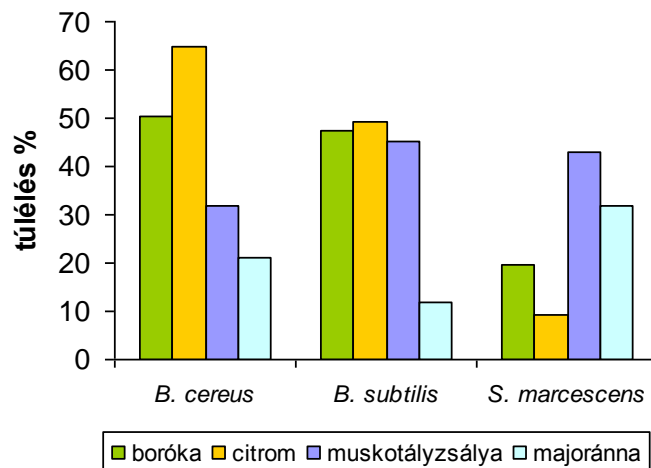


**2. ábra:** A pH hatása (pH 4-7 között, ld. ábramagyarázat) az élesztők szaporodási paramétereire majoránna olaj jelenlétében.

A különböző betűk szignifikáns eltéréseket jeleznek ( $p < 0.05$ ). A- *S. cerevisiae*, B - *P. anomala*, C- *G. candidum*

#### 4.4. Illóolajok hatása Gram pozitív és Gram negatív baktériumok túlélésére

A túlélési kísérletekben 24 órás, korai stationer fázisban lévő  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml baktérium szuszpenzióhoz kevertük az illóolajokat 1  $\mu$ l/ml koncentrációban, és 3 óráig 37 °C-on történő inkubálás után csészére szélesztéses módszerrel határoztuk meg a túlélő sejtek számát.



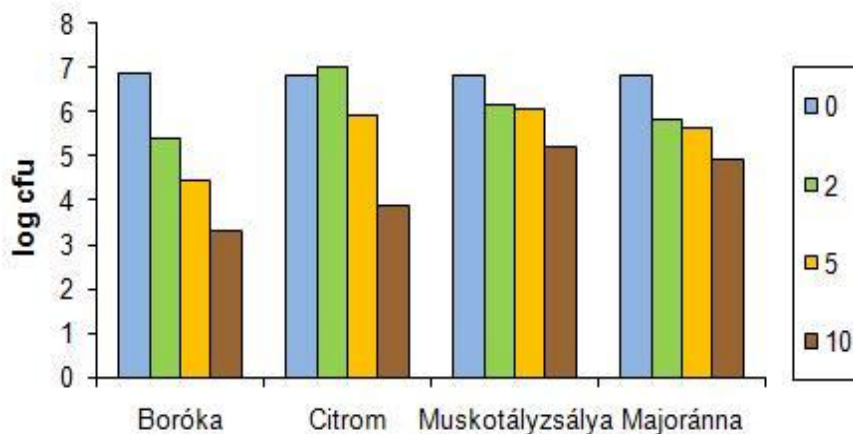
**3. ábra:** Gram pozitív és negatív baktériumok túlélése 1 µl/ml illóolaj hozzáadása után. (A kezelési idő 3 óra volt.)

A 3. ábrán látható a különböző illóolajok eltérő hatása a Gram pozitív és negatív baktériumokra. Míg a Gram pozitív *Bacillus*-okra a majoránna és a muskotályzsálya fejtette ki a legerősebb gátló hatást, a Gram negatív *S. marcescens*-re a boróka- és citromolaj. Az előző, a szaporodási paraméterek befolyásolására vonatkozó eredményekből a lag fázisok hossza alapján az illóolajok hatása *B. cereus* esetében a következőképpen változott: muskotályzsálya > majoránna > citrom > boróka; míg *B. subtilis* esetében: muskotályzsálya > majoránna > boróka > citrom. Úgy tűnik, hogy a *Bacillus*-okra a terpén alkoholokat, mint fő komponenset tartalmazó illóolajok fejtenek ki erősebb hatást, míg a Gram negatív *S. marcescens*-re a monoterpén fő komponenseket tartalmazó olajok. A két Gram negatív baktérium (*E. coli* és *S. marcescens*) érzékenysége az egyes illóolajfajtákra eltérő volt. Ennek az eltérésnek a tisztázása további kutatásokat igényel.

#### 4.5. Az illóolajok sporocid (spóraölő) hatása

Az endospóra képzés bizonyos baktériumoknál komoly higiéniai és élelmiszerbiztonsági gondokat okozhat, hiszen az alkalmazott fertőtlenítési és hőkezelési

módszerek nem biztos, hogy elpusztítják az összes spórát. A *B. subtilis* a kenyérgyártásban okoz gondot. A kenyér belsejében életben maradt endospórák vegetatív sejtekké alakulnak kenyérnyúlósodást okoznak. Kísérletünkben az illóolajok sporocid hatásának tesztelésére ezért választottuk modellszervezetnek a *B. subtilis*-t. A 4. ábrán látható, hogy 10% illóolaj koncentráció mellett is meglehetősen magas a túlélő spórák száma. Legjobb hatást a borókaolaj mutatta, a legmagasabb koncentrációban kb. 4 nagyságrenddel csökkentette a spóraszámot. A majoránna és muskotályzsálya esetében a csökkenés 1,5 - 2 nagyságrend. Érdekes különbség, hogy míg a vegetatív sejtek szaporodására a muskotályzsálya és majoránna fejtette ki a legerősebb gátló hatást, addig a spórák életképességét ezek kevésbé befolyásolták. Ez a jelenség valószínűleg annak tudható be, hogy más a támadáspont a vegetatív sejtek és a spórák esetében. Hayley és munkatársai (2009) 13 illóolaj hatását vizsgálták *B. subtilis* spórákra, melyek közül a kardamom-, teafa- és borókaolaj volt a leghatásosabb: 1% feletti koncentrációkban 3 nagyságrenddel csökkentették az életképes spórák számát. Az elektronmikroszkópos felvételeken az illóolajjal kezelt spórák összetöppedtek és laposnak látszottak, mintha ozmotikus sokk érte volna őket. Feltételezhető, hogy a mégannyira ellenálló spóraburok átjárhatósága is megváltozik az illóolajok hatására, és a spóra anyagainak egy része kiáramlik. További megfigyelésük volt, hogy 60 °C-on nőtt az illóolajok sporocid hatása. Mivel már 1% illóolaj koncentráció is erős íz- és illatváltozást okozhat az élelmiszerekben, valószínűleg a kombinált kezelés, a magas hőmérséklet és illóolajjal együtt alkalmazva lenne megfelelő.



4. ábra: Illóolajok hatása *B. subtilis* endospóráinak túlélésére (0-10% koncentrációban)

## 4.6. A minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározása

### 4.6.1. MIC meghatározás baktériumok esetében

A MIC értékeket, azaz az illóolajnak azt a koncentrációját, ahol már nem tapasztalható növekedés, 24 órás inkubáció után állapítottuk meg. A 11. táblázatból leolvasható, hogy a szaporodási paraméterekre kifejtett hatáshoz hasonlóan a két *Bacillus* törzs esetében itt is a majoránna és a muskotályzsálya mutatta a legalacsonyabb MIC értéket, azaz a legerőteljesebb gátló hatást. A Gram negatív *E. coli* esetében meghatározott MIC értékek magasabbak voltak, kivéve a majoránna-olajat, ahol az érték a Gram pozitív törzseknél tapasztalt értékkel megegyező volt.

**11. táblázat:** Illóolajok MIC ( $\mu\text{l/ml}$ , átlag  $\pm$  szórás) értéke tápoldatban

Illóolaj / Faj	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Boróka	$0,75 \pm 0,35$	$0,5 \pm 0,0$	$2,0 \pm 0,0$
Citrom	$1,0 \pm 0,0$	$0,375 \pm 0,17$	$4,0 \pm 0,0$
Majoránna	$0,25 \pm 0,0$	$0,375 \pm 0,17$	$0,375 \pm 0,17$
Muskotályzsálya	$0,375 \pm 0,17$	$0,29 \pm 0,19$	$2,0 \pm 0,0$

### 4.6.2. MIC meghatározás élesztőgombák esetében

A 24 órás MIC értékek alapján is a *S. pombe* volt a legérzékenyebb törzs, míg a legmagasabb MIC értékeket *G. candidum* esetében mértük (12. táblázat). Sachetti és mtsai (2005) közleményében, ahol 11 illóolaj antimikrobiális hatását vizsgálták, a két legérzékenyebb élesztő a *S. pombe* és *S. cerevisiae* volt, hasonlóan a mi eredményeinkhez. Az általunk meghatározott MIC értékekhez hasonló eredményt kapott Hammer és mtsai (1999), akik *C. albicans* élesztőnél a boróka és citrom esetében  $2 \mu\text{l/ml}$ , míg majoránna esetében  $0,25 \mu\text{l/ml}$  MIC értéket állapítottak meg.

**12. táblázat:** Illóolajok MIC ( $\mu\text{l/ml}$ , átlag  $\pm$  szórás) értéke tápoldatban

Illóolaj / Faj	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>G. candidum</i>	<i>P. anomala</i>
Boróka	$0.5 \pm 0.0$	$0.25 \pm 0.13$	$2 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.0$
Majoránna	$0.75 \pm 0.25$	$0.0625 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.0$
Muskotályzsálya	$0.75 \pm 0.25$	$0.625 \pm 0.25$	$1 \pm 0.0$	$0.75 \pm 0.25$
Citrom	$0.375 \pm 0.13$	$0.15 \pm 0.09$	$0.75 \pm 0.25$	$0.625 \pm 0.13$

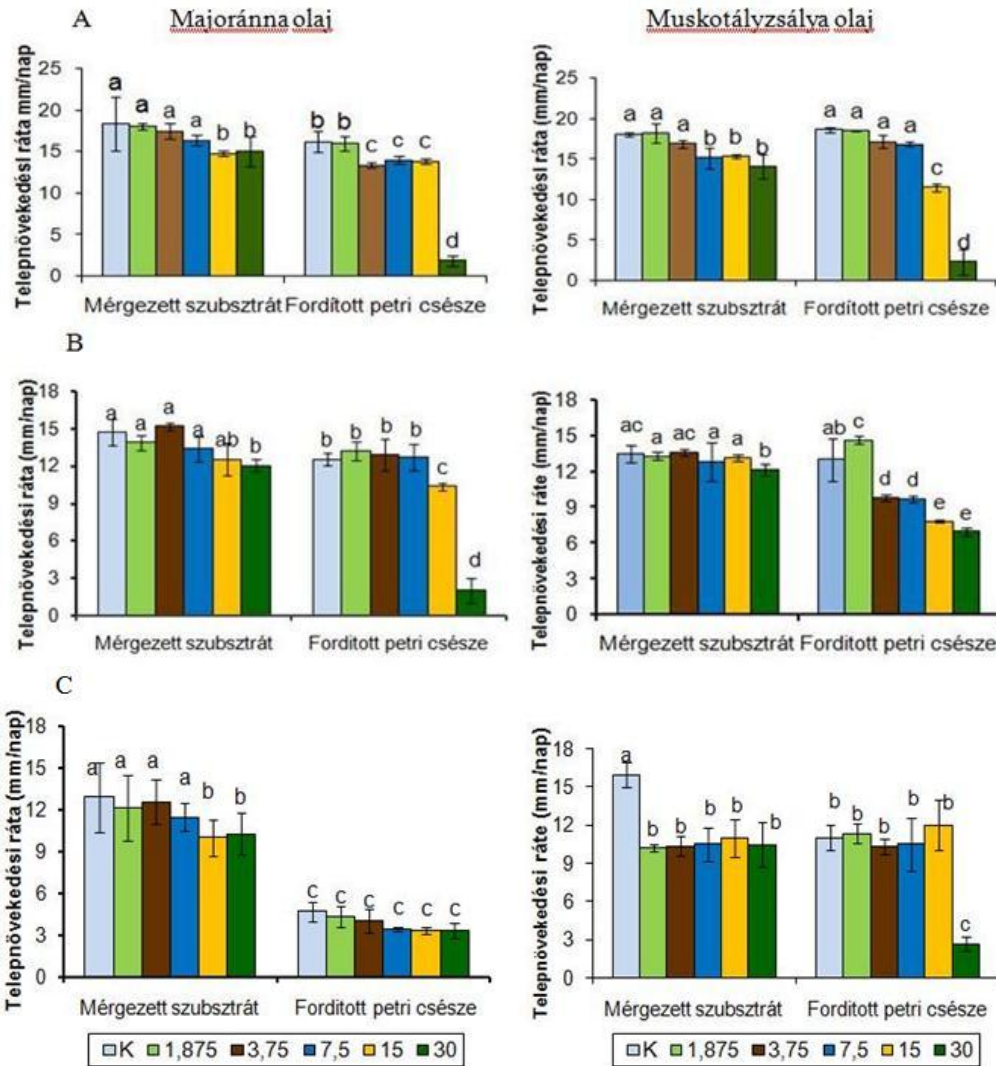
#### 4.7. Illóolajok hatása a fonalas gombák telepnövekedésére

A fonalas (penész-) gombák az élesztőkhöz hasonlóan megjelenhetnek magas cukortartalmú élelmiszereken. A befőttek, lekvárok jellegzetes romlást okozó szervezetei a *Penicillium* és *Aspergillus* fajok. Mivel képesek szaporodni 0,9  $a_w$  (vízaktivitás) értéken is, ezért megjelenhetnek szárított gyümölcsökön, kenyéren, szárazkolbászon, sajtokon, és a legkülönbözőbb egyéb élelmiszereken (Jakucs és Vajna, 2003).

A penészgombák jelentős része mikotoxinokat termel, melyek gyakran nem akut, hanem krónikus mérgezést okoznak, és az immunrendszer gyengüléséhez, a hormonegyensúly felborulásához és különböző emésztőszerv-rendszeri rákok kialakulásához vezethetnek.

A gombaspórák és konídiumok a környezetben mindenhol megtalálhatók, a védekezés ellenük nem könnyű. Mint láttuk, a hagyományos tartósítási eljárások, mint a szárítás, hiperozmotikus közeg létrehozása cukrozással, de akár még a hőkezelés sem tudja mindig garantálni távoltartásukat az élelmiszerektől. Az illóolajok ebben az esetben is alternatívát jelenthetnek a szintetikus tartósítószerrel szemben ill. mellett.

Kísérleteinkben két különböző módszert alkalmaztunk: a „mérgezett szubsztrát” technikánál az illóolajokat a táptalajba kevertük, míg a fordított petri csésze módszernél a gombatelepek egy illóolaj-gőztérben növekednek.



**5. ábra:** Majoránna és muskotályzsálya olaj hatása fonalas gombák telepnövekedési sebességére. A- *F. sporotrichioides*; B -*A. niger*; C - *P. chrysogenum*. (Az ábramagyarázat az egy petri csészényi táptalajba kevert, illetve a papírkorongra felvitt illóolaj mennyiségeket jelenti μl-ben).

Az 5. ábrán a majoránna- és muskotályzsálya-olaj hatását láthatjuk a vizsgált fonalas gombák telepnövekedési sebességére. A táptalajba kevert illóolajok legfeljebb a legmagasabb koncentrációkban csökkentették a telepnövekedési rátát, és hasonló volt a helyzet a gőztérben növekvő gombáknál is. A 30 μl-es adag által létrehozott gőz koncentráció hatására rendkívül erőteljes csökkenés volt megfigyelhető mindkét illóolaj, és az ábrákon szereplő mindhárom



gomba esetében (kivéve a *P. chrysogenumot*, ahol a kontroll növekedése is lassú volt, de itt valószínűleg inokulum hiba okozta a kapott eredményt). A *R. stolonifer* azért nem szerepel az ábrán, mert gyakorlatilag minden koncentrációnál és mindkét módszernél azonos volt a telepnövekedési ráta. Boróka illóolajának gőzében 24 óráig, míg majoránna-olaj gőzterében 48 óráig nem alakultak ki *R. stolonifer* telepek, utána azonban minden esetben teljesen benőtték a petri csészét, függetlenül az illóolaj-koncentrációtól, vagy az alkalmazott módszertől.

Az illóolajok hatásáról differenciáltabb képet kapunk, ha a telepméretből számított relatív gátlások mértékét vetjük össze. Ehhez a százalékban megadott gátlás mértékét a következő képlet alapján számítottuk ki:  $G(\%) = (D_K - D_I) / D_K \times 100$

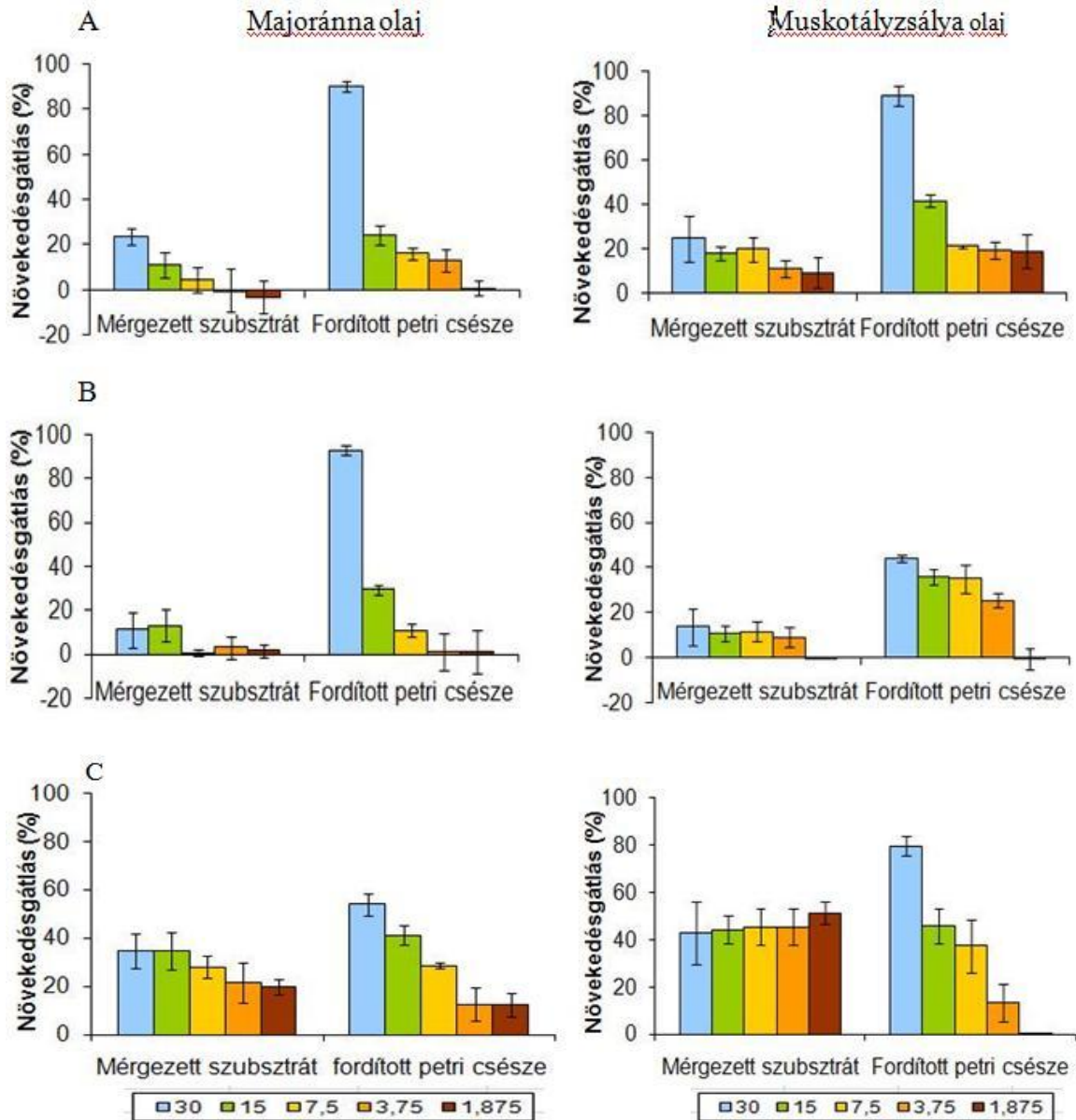
G - a gátlás százalékos értéke;

D<sub>K</sub> - a kontroll telepátmérő mm-ben;

D<sub>I</sub> - az illóolaj jelenlétében mért telepátmérő mm-ben.

A gátlást a 4. napon mért adatok összevetéséből számítottuk. A 6. ábrán látható, hogy a táptalajba kevert illóolajok gátló hatása alacsony volt, a legkisebb koncentrációknál időnként a kontrollnál nagyobb telepátmérőt (nulla alatti gátlási értéket) kaptunk.

A fordított petri csésze módszernél a 30 µl illóolaj hatása néhány esetben megközelítette a teljes gátlást, de minden esetben magasabb volt, mint a másik módszerrel meghatározott érték. Az alacsonyabb koncentrációknál azonban gyorsan csökkent a gátló hatás. Suhr és Nielsen (2003) szerint a nagyobb, fenolos jellegű komponenseket tartalmazó olajok a táptalajhoz keverve mutatják a legjobb hatást, míg a kisebb, nem aromatikusan komponenseket (limonén, citrál) tartalmazók gőzfázisban mutatnak jobb hatásfokot. Az általunk vizsgált olajok fenolos komponens nem tartalmaznak (ld. 15. táblázat), így a kapott eredmények összhangban vannak a fenti megállapítással.



**6. ábra:** Majoránna és muskotályzsálya illóolaj telepnövekedést gátló hatása penészgombákra. A - *Fusarium sporotrichioides*, B- *Aspergillus niger*, C - *Penicillium chrysogenum*. (Az ábramagyarázat az egy petri csészényi táptalajba kevert, illetve a papírkorongra felvitt illóolaj mennyiségeket jelenti µl-ben).

## 4.8. Az illóolajok kölcsönhatása

Az élelmiszeriparban az illóolajok természetes eredetű tartósítószerként való felhasználásának gátat szab, hogy nagyon erős aromájuk miatt már kis mennyiségben is megváltoztatják az élelmiszerek ízét és illatát. Az illóolajok kombinálása esetén fellépő additív vagy szinergista hatások révén a szükséges koncentráció csökkenthető, és így elkerülhető a nem kívánt mellékhatás. Az illóolaj kombinációk kölcsönhatására a frakcionált gátlási index (FICI) kiszámítását alkalmaztuk. Meghatároztuk a farkcionált gátlási koncentrációkat (FIC) az egyes illóolajokra számolt MIC értékekből, és a két FIC érték összege adta a kölcsönhatást kifejező FICI értéket (Lambert és Lambert, 2007).

### 4.8.1. Illóolaj kombinációk kölcsönhatása baktériumok növekedésének gátlására

A vizsgált baktériumok közül a *B. subtilis* esetében a borókaolajjal kombinált majoránnaolaj szinergista, míg a többi illóolaj additív hatást mutatott. *B. cereus* esetében a borókaolaj - majoránna-olaj párosításban az illóolajok kioltották egymás hatását, a többi esetben pedig nem volt kölcsönhatás. A citromolaj és a borókaolaj kiegészítette egymás *E. coli*-ra gyakorolt hatását, más kombinációkban azonban itt sem volt kölcsönhatás. A majoránna-olaj – muskotályzsálya-olaj kombináció minden esetben additív kölcsönhatáshoz vezetett (13. táblázat). A mi eredményeinkhez hasonlóan Gutierrez és munkatársai (2008) szintén eltérő kölcsönhatásokat kaptak ugyanazon illóolaj kombinációkra különböző baktériumoknál. Míg az oregánóolaj kombinálva bazsalikom-, kakukkfű-, majoránna-, citromfű-, rozmaring-, és zsályaolajjal minden esetben additív hatást eredményezett *B. cereus* ATCC 11778 törzs esetében, ugyanakkor a *Listeria monocytogenes* IL323 esetében egyik párosítás sem mutatott pozitív kölcsönhatást. A jelenség magyarázatához az egyes összetevők hatásmechanizmusának pontos tisztázására van szükség.

**13. táblázat:** Illóolaj kombinációk FIC indexei

Illóolaj kombinációk	MIC ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	FIC index <sup>a</sup>	Kölcsönhatás típusa
<b><i>E. coli</i></b>			
Boróka +			
Citrom	B(0,0625)+C(2)	0,53	Additív
Majoránna	B(2)+Ma(0,25)	1,5	Nincs hatás
Muskotályzsálya	B(0,0625)+Mu(2)	1,03	Nincs hatás
Majoránna +			
Muskotályzsálya	Ma(0,0625)+Mu(1)	0,625	Additív
<b><i>Bacillus cereus</i></b>			
Boróka +			
Citrom	B(0,0625)+C(1)	1,125	Nincs hatás
Majoránna	B(2)+Ma(0,0625)	4,25	Antagonista
Muskotályzsálya	B(0,125)+Mu(0,25)	1,25	Nincs hatás
Majoránna +			
Muskotályzsálya	Ma(0,0625)+Mu(0,125)	0,75	Additív
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>			
Boróka +			
Citrom	B(0,0625)+C(0,125)	0,625	Additív
Majoránna	B(0,0625)+Ma(0,0625)	0,375	Szinergista
Muskotályzsálya	B(0,25)+Mu(0,0625)	1,00	Additív
Majoránna +			
Muskotályzsálya	Ma(0,0625)+Mu(0,0625)	0,75	Additív

Eredmények alapján a kölcsönhatás szinergista ( $FICI < 0,5$ ), additív ( $0,5 \leq FICI \leq 1,0$ ), nincs hatása ( $1,1 < FICI \leq 4$ ) vagy antagonista ( $FICI > 4$ ),

#### 4.8.2. Illóolaj kombinációk kölcsönhatása élesztőgombák növekedésének gátlására

Élesztők esetében a legjobb, additív, kölcsönhatás a borókaolaj – muskotályzsálya-olaj kombinációnál adódott. Az összes többi esetben nem találtunk kölcsönhatást, az illóolajok közömbösen viselkedtek egymással szemben (14. táblázat).

**14. táblázat:** Illóolaj kombinációk FIC index értékei (átlag ± szórás) malátás tápoldatban

Illóolaj	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sch. pombe</i>	<i>G. candidum</i>	<i>P. anomala</i>
Boróka+Muskotályzsálya	0,625 (A) ± 0,07	1,5 (I) ± 0,00	0,75 (A) ± 0,09	0,75 (A) ± 0,00
Boróka + Citrom	1,5 (I) ± 0,00	2,0 (I) ± 0,35	2,25 (I) ± 0,40	1,25 (I) ± 0,041
Boróka + Majoránna	1,25 (I) ± 0,44	1,5 (I) ± 0,00	1,5 (I) ± 0,44	1,25 (I) ± 0,38

<sup>a</sup> Eredmények alapján a kölcsönhatás szinergista (FIC<0.5), additív (A, 0.5≤ FIC≤1.0), nincs hatás (I, 1.1<FIC≤4) vagy antagonistista (FIC>4).

#### 4.9. Illóolajok főkomponenseinek antimikrobiális hatása és kölcsönhatása

Az általunk vizsgált illóolajok összetételét az Aromax Kft. bocsátotta rendelkezésünkre (15. táblázat).

**15. táblázat:** Az általunk vizsgált illóolajok fő komponensei

Komponens (%)	Boróka	Citrom	Majoránna	Muskotályzsálya
α-pinén	31	-	-	-
β-pinén	30*	16	-	-
Limonén	3	59	-	-
Linalool	-	-	-	27
Linalil-acetát	-	-	-	51
Terpinén-4-ol	6	-	30	-
α-terpinén	-	-	9,6	6,6
γ-terpinén	-	12	16	-
α-terpineol	-	-	4,6	-
Cisz-szabinén-hidrát	-	-	19	-
β-mircén	6,7	-	-	-
Szabinén	-	-	8,1	-
Nerál	-	1,5	-	-
Geraniál	-	1,7	-	-
Germakrén	-	-	-	2,8

\* β-pinén és szabinén - a két csúcs nem választható el az alkalmazott eluenssel

A táblázatból látható, hogy a boróka és a citrom olaja elsősorban egyszerű monoterpéneket tartalmaz főkomponensként, míg a majoránna terpén-alkoholokat és monoterpéneket, a muskotályzsálya pedig egy terpén-alkoholt (linalool) és annak acetátos formáját tartalmazza. A különböző összetevők különböző tulajdonságokkal rendelkeznek, és más lehet a hatásuk is. Általánosan elfogadott tény, hogy a legerősebb antimikrobiális hatással a fenolos jellegű összetevők, mint a karvakrol és timol rendelkeznek (Dorman és Deans, 2000). A mi illóolajainkban nincsenek ilyen jellegű vegyületek. A majoránna rokonainak többsége, mint az oregáno (szurokfű) nagy mennyiségben tartalmaznak karvakrolt, de a majoránából ez a komponens hiányzik, vagy csak nagyon kis mennyiségben van jelen (Novák és mtsai, 2003). Fraternalé és munkatársai (2005) hasonló összetételt írtak le Olaszországból származó muskotályzsálya-olajra, fő összetevőként a linaloolt és linalil-acetátot említve. A terpén alkoholok fehérje-kicsapó vagy -dehidrááló ágensként viselkedhetnek (Dorman és Deans, 2000); de sokkal aktívabbak, ha a sejthártya átjárhatósága nő, ami azt sugallja, hogy fő támadáspontjuk a sejten belül van (Longbottom és mtsai, 2004). Bejutásukat a kismolekulájú hifrofób terpének segítik elő a sejtmembrán destabilizálásával (Cox és mtsai, 2000; Cristani és mtsai, 2007).

Kísérleteinkben  $\alpha$ -pinén, limonén, linalool és terpinén-4-ol és kombinációik antimikrobiális hatását vizsgáltuk a modellszervezetként választott *B. cereus* baktériumra és *S. cerevisiae* élesztőre. (Bár a linalil-acetát nagyobb mennyiségben van jelen a muskotályzsálya-olajban, mint a linalool, mégis az utóbbira esett a választásunk, hogy két-két azonos karakterű komponenst tudjunk összehasonlítani.)

#### **4.9.1. Illóolaj komponensek hatása *B. cereus*ra**

A kiválasztott illóolaj komponensek *B. cereus*-ra gyakorolt hatását a 16. táblázat mutatja. Az adatokból látható, hogy az egyes összetevők MIC értékei sokkal magasabbak, mint az eredeti illóolajok értékei. A mi méréseink is alátámasztják tehát azt a vélekedést, hogy a fő komponensek mellett a kisebb arányban jelenlévő egyéb komponenseknek is fontos szerepük van az illóolajok antimikrobiális hatásában (Burt, 2004).

**16. táblázat:** A vizsgált illóolajok fő komponenseinek MIC ( $\mu\text{l/ml}$ , átlag  $\pm$  szórás) és FIC index értékei *B. cereus* esetében

	$\alpha$ -Pinén	Linalool	Limonén	Terpinén-4-ol
MIC	$6.0 \pm 0.00$	$6.0 \pm 0.00$	$4.0 \pm 0.00$	$6.0 \pm 0.00$
FIC indexek				
$\alpha$ -pinén +	-	1 (I) <sub>P(3)+Li(3)</sub> 1,125 (I) <sub>P(0,75)+Li(6)</sub> 1,125 (I) <sub>P(6)+Li(0,75)</sub>	0,875 (A) <sub>P(3)+L(1,5)</sub> 0,875 (A) <sub>P(0,75)+L(3)</sub> 1,19 (I) <sub>P(6)+L(0,75)</sub>	0,75 (A) <sub>P(3)+T(1,5)</sub> 0,625 (A) <sub>P(0,75)+T(3)</sub> 1,125 (I) <sub>P(6)+T(0,75)</sub>
linalool +	n.a.	-	n.a.	1,125 (I) <sub>Li(6)+T(0,75)</sub> 0,625 (A) <sub>Li(0,75)+T(3)</sub>

n.a. = nincs adat

A- additív hatás; I – nincs kölcsönhatás; L- limonén; Li- linalool; p-  $\alpha$ -Pinén; T – terpinén-4-ol

Az  $\alpha$ -pinén - linalool kombináció nem mutatott kölcsönhatást, ugyanúgy, mint a megfelelő illóolajok (borókaolaj – muskotályzsálya-olaj). Az  $\alpha$ -pinén - limonén, illetve  $\alpha$ -pinén - terpinén-4-ol gyakran additív hatást eredményezett, ellentmondva az eredeti illóolajok indifferens illetve antagonisták kölcsönhatásának. A linalool - terpinén-4-ol (majoránnaolaj – muskotályzsálya-olaj) párosítás itt is additív hatású volt.

#### 4.9.2. Illóolaj komponensek hatása *S. cerevisiae*

Az egyes összetevők MIC értékei ebben az esetben is magasabbak voltak az eredeti illóolajok értékeinél. Az  $\alpha$ -pinén - limonén kombináció, meglepetésre, szinergizmust mutatott, ellentétben a borókaolaj - citromolaj párosítás indifferens hatásával. Valószínűleg a kisebb arányú összetevők nemcsak kiegészítik, de bizonyos esetekben talán ki is oltják a fő összetevők hatását. Ennek a feltételezésnek a bizonyítására további kísérletekre van szükség.

Dorman és Deans (2000) szerint az általunk is használt összetevők határfoka a következő irányban csökken: terpinén-4-ol; linalool; limonén,  $\alpha$ -pinén. Figyelembe véve a MIC értékeket (17. táblázat), mi a következő sorrendet kaptuk: limonén;  $\alpha$ -pinén; terpinén-4-ol; linalool. Azaz nálunk megfordult a sorrend a terpén-alkoholok és a monoterpének között. Meg kell jegyeznünk, hogy ez a sorrend elsősorban a *S. cerevisiae*-re vonatkozó

eredményekből származik, *B. cereus*-nál a limonénen kívül a többi komponensnek azonos volt a MIC értéke. Bagamboula és munkatársai (2004) szintén limitált antibakteriális aktivitást találtak linaloolra, és hasonló eredményeket kaptak Iten és munkatársai (2009) is *C. albicans* esetében. Az egymásnak ellentmondó eredményeket valószínűleg az egyes mikroorganizmusok eltérő érzékenysége magyarázza.

**17. táblázat:** Vizsgált illóolajok fő komponenseinek MIC ( $\mu\text{l/ml}$ , átlag  $\pm$  szórás) és FIC index értékei *S. cerevisiae* esetében

	$\alpha$ -Pinén	Linalool	Limonén	Terpinén-4-ol
MIC	1.33 $\pm$ 0.58	6 $\pm$ 0.00	0.67 $\pm$ 0.29	4.33 $\pm$ 1.51
FIC indexek				
$\alpha$ -pinén +	-	0,625(A) <sub>P(0,125)+Li(3)</sub>	0,313 (S) P(0,0625)+L(0,125)	1,125 (I) <sub>P(0,125)+T(3)</sub>
		1,125 (I) <sub>P(1)+Li(0,75)</sub>	0,375 (S) P(0,25)+L(0,0625)	1,25 (I) <sub>P(1)+T(0,75)</sub>
linalool +	n.a.	-	n.a.	1,125 (I) <sub>Li(0,75)+T(3)</sub> 0,75 (A) <sub>Li(1,5)+T(1,5)</sub> 0,75 (A) <sub>Li(3)+T(0,75)</sub>

n.a. = nincs adat

A- additív hatás; I – nincs kölcsönhatás; S- szinergizmus; L- limonén;  $L_i$  – linalool; P-  $\alpha$ -pinén; T – terpinén-4-ol

Összefoglalva az illóolaj komponensekkel kapott eredményeinket elmondhatjuk, hogy mind a baktérium, mind az élesztő esetében a MIC értékek többszöröse voltak az eredeti illóolajokkal kapott értékeknek, de a kölcsönhatások eltértek a teljes illóolajokkal kapott kölcsönhatásoktól.

Irodalmi adatok alapján a  $\beta$ -pinén (az  $\alpha$ -pinén izomerje) és a limonén gátolta intakt élesztősejtek és izolált mitokondriumok légzés-intenzitását (Uribe és mtsai, 1985). Ugyanezt a jelenséget írták le a terpinén-4-ol-t tartalmazó teafaolaj hatásmechanizmusaként is *E. coli*, *S. aureus* és *C. albicans* esetében (Cox és mtsai, 2000). Terpinén-4-ol,  $\alpha$ -terpinén, limonén, timol és karvakrol hatására a membrán károsodását és a 260 nm-en abszorbeáló anyagok kiáramlását írták le baktériumok és élesztőgombák esetében (Carson és mtsai, 2002, Adegoke



és mtsai, 2000, Bennis és mtsai, 2004). Élesztőgombákban a sejtmembrán egyik fő szterol típusú alkotórésze az ergoszterol, mely nagymértékben felelős a sejt integritásának fenntartásáért. Az ergoszterol szintézisében résztvevő gének működésének zavarát és csökkent ergoszterol szintézist írtak le élesztőkben és fonalas gombákban  $\alpha$ -terpinén (Parveen és mtsai, 2004) és kakukkfű-illóolaj hatására (Pinto és mtsai, 2006).

#### **4.10. Élelmiszer-összetevők kölcsönhatása az illóolajokkal**

Gyakori tapasztalat, hogy élelmiszerekben magasabb illóolaj koncentráció szükséges ugyanolyan hatás eléréséhez, mint *in vitro* körülmények között tápközegben (Burt, 2004, Devlieghere és mtsai, 2004). Az élelmiszerek bonyolult felépítésű és szerkezetű rendszerek, melyekben a különböző alkotórészek kölcsönhatásba léphetnek az illóolaj összetevőkkel és gyengíthetik, vagy éppen erősíthetik hatásukat (Pol és mtsai, 2001). Kísérleteinkben hidrolizált állati (húskivonat) és növényi (szójapepton) fehérjék, valamint szacharóz kölcsönhatását vizsgáltuk majoránna-olajjal. A hidrolizált fehérjék a nagymolekulájú komponensek mellett kisebb peptideket és szabad aminosavakat is tartalmaznak, ahol a hidrofób, illetve töltéssel rendelkező oldalláncok szabadon találhatóak, és kapcsolatba léphetnek az illóolaj komponensekkel. A szacharóz kismolekulájú, vízben jól oldódó vegyület, amelytől nem várható, hogy befolyásolja az illóolaj komponensek oldódását, illetve eloszlását a vizes közegű tápoldatban.

A 18. és 19. táblázat adataiból láthatjuk, hogy a húskivonat „megvédte” a baktériumokat a majoránna-olaj lag fázist növelő hatásától, míg a szójapeptonnak nem volt ilyen hatása. Úgy tűnik, hogy az állati fehérje hidrolizátum inkább megkötötte az illóolaj komponenseket, és nem engedte érvényesülni hatásukat, míg a növényi fehérje hidrolizátum inkább elősegítette az illóolaj egyenletes eloszlását a vizes közegben. A szacharóz koncentráció nem befolyásolta a gátló hatást, a lag fázisok minden esetben hosszabbak voltak majoránna jelenlétében. 1% szacharóz koncentráció mellett a *B. cereus* lag fázisa 24 óránál hosszabbra nyúlt, ami alapján feltételezzük, hogy ez a szénhidrát-mennyiség nem nyújtott elegendő energiát a növekedéshez.

**18. táblázat:** Élelmiszer-összetevők és majoránna illóolaj (0.125 µl/ml) hatása *Bacillus cereus* növekedési paramétereire

Élelmiszer alapanyagok (% w/v)	$\lambda$ (h) $\pm$ szórás		$\mu_m$ (1/h) $\pm$ szórás	
	Kontroll	Majoránna olaj	Kontroll	Majoránna olaj
<b>Húskivonat</b>				
0,4	9,81 $\pm$ 0,34 a	11,34 $\pm$ 1,90 ac	0,175 $\pm$ 0,013 A	0,030 $\pm$ 0,021 B
0,8	9,73 $\pm$ 0,59 a	10,90 $\pm$ 1,27 c	0,179 $\pm$ 0,034 A	0,070 $\pm$ 0,008 B
1,6	5,78 $\pm$ 0,22 b	7,61 $\pm$ 0,56 bd	0,175 $\pm$ 0,053 A	0,161 $\pm$ 0,084 A
3,2	6,50 $\pm$ 0,50 b	7,94 $\pm$ 0,08 d	0,171 $\pm$ 0,029 A	0,213 $\pm$ 0,024 A
<b>Szójapepton</b>				
0,4	5,44 $\pm$ 0,27 m	18,03 $\pm$ 0,03 n	0,290 $\pm$ 0,048 M	0,252 $\pm$ 0,01M
0,8	5,82 $\pm$ 0,63 m	>24-	0,363 $\pm$ 0,018 N	-
1,6	5,44 $\pm$ 0,49 m	>24-	0,303 $\pm$ 0,003 M	-
3,2	5,51 $\pm$ 0,49 m	>24-	0,320 $\pm$ 0,001 M	-
<b>Szacharóz</b>				
1	6,47 $\pm$ 0,80 x	>24-	0,265 $\pm$ 0,031 X	-
2	6,71 $\pm$ 0,64 x	11,16 $\pm$ 0,15 y	0,199 $\pm$ 0,021 Y	0,125 $\pm$ 0,005 Z
4	6,96 $\pm$ 1,11 x	12,00 $\pm$ 2,84 y	0,185 $\pm$ 0,000 Y	0,125 $\pm$ 0,005 Z
8	6,77 $\pm$ 1,09 x	16,28 $\pm$ 0,71 y	0,193 $\pm$ 0,025 Y	0,120 $\pm$ 0,020 Z

A különböző betűkkel jelölt értékek közti eltérés szignifikáns.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a nagy molekulájú fehérje hidrolizátumok minőségüktől és eredetüktől függően befolyásolták a majoránna-olaj hatását, míg a kismolekulájú, hidrofób tulajdonságokkal nem rendelkező szacharóz nem volt befolyással az illóolaj növekedést gátló tulajdonságaira. Eredményeink alátámasztják Gutierrez és mtsai (2009) megállapítását, mely szerint inkább egyszerű cukrokat tartalmazó élelmiszerek tartósítására érdemes az illóolajokat használni.

**19. táblázat:** Élelmiszer-összetevők és majoránna illóolaj (0.125 µl/ml) hatása *E. coli* növekedési paramétereire

Élelmiszer alapanyagok (% w/v)	λ (h) ± szórás		μ <sub>m</sub> (h) ± szórás	
	Kontroll	Majoránna olaj	Kontroll	Majoránna olaj
<b>Húskivonat</b>				
1	4,53 ± 0,67 a	8,21 ± 0,18 c	0,441 ± 0,079 A	0,415 ± 0,00 AB
2	5,54 ± 0,40 b	6,02 ± 0,03 b	0,376 ± 0,004 B	0,298 ± 0,007 E
4	3,93 ± 0,22 a	5,17 ± 1,03 ab	0,221 ± 0,023 C	0,232 ± 0,005 C
8	4,26 ± 0,23 a	5,06 ± 0,92 ab	0,164 ± 0,004 D	0,162 ± 0,004 D
<b>Szójapepton</b>				
1	4,24 ± 0,33 m	6,10 ± 0,29 o	0,514 ± 0,057M	0,321 ± 0,019 O
2	4,50 ± 0,63 m	6,69 ± 0,00 op	0,475±0,007MN	0,242 ± 0,000 P
4	4,33 ± 1,01 m	7,34 ± 0,11 p	0,452 ± 0,002 N	0,236 ± 0,007 P
8	9,09 ± 0,51 n	17,13 ± 0,49 r	0,444 ± 0,054 N	0,470±0,014MN
<b>Szacharóz</b>				
1	6,96 ± 0,23 x	19,00 ± 1,02 y	0,254 ± 0,027 X	0,326 ± 0,088 Z
2	6,51 ± 0,52 x	18,03 ± 1,86yz	0,229 ± 0,020 X	0,278 ± 0,068XZ
4	6,41 ± 0,32 x	16,58 ± 0,64 z	0,231 ± 0,026 X	0,204 ± 0,023 Y
8	6,92 ± 0,08 x	17,51 ± 0,43 z	0,162 ± 0,001 Y	0,261 ± 0,017 X

A különböző betűkkel jelölt értékek közti eltérés szignifikáns.

#### 4.11. Illóolajok hatása élelmiszerben

Tápközegben végzett kísérleteink alapján kiválasztottunk néhány élelmiszer - illóolaj kombinációt, hogy valós környezetben is megfigyelhessük az illóolajok hatását élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusokra.

##### 4.11.1. Illóolajok antimikrobiális hatása tejben

A vizsgálatokhoz friss teljes tejből hideg centrifugálással (4°C; 5000rpm) készítettünk fölözött tejet, így elsősorban csak a tejfehérjék befolyásolták az illóolaj hatását. A tejet beoltottuk 10<sup>5</sup>/ml 24 órás *G. candidum* szuszpenzióval, majd citromolajat adtunk hozzá, úgy hogy a végkoncentráció 0,25; 0,5 ill. 1 µl/ml legyen. Azért esett a választásunk a citromolajra,

mert egyrészt jó antimikrobiális hatást mutatott élesztők esetében, másrészt feltételeztük, hogy íze harmonizálhat a tej ízével.

A 20. táblázat mutatja a *G. candidum* szaporodási rátájának, illetve elért maximális sejtszámának változását. A citromolaj, koncentrációtól függetlenül, szignifikánsan csökkentette a szaporodási sebességet. A 24 órás inkubálás után az élősejtszám kb. fél nagyságrenddel csökkent. A tejben megállapított MIC érték 4 µl/ml volt, többszöröse a tápoldatban mért értéknek - ennek oka minden bizonnyal az, hogy a tejfehérjék hidrofób oldalláncai megkötik az illóolaj komponenseket, így azok nem tudnak reakcióba lépni a mikroorganizmus membránjával (Pol és mtsai., 2001; Juven és mtsai, 1994; Smith-Palmer és mtsai., 2001; Cava és mtsai., 2007).

**20. táblázat:** Citrom illóolaj hatása *Geotrichum candidum* növekedési paramétereire főlözött tejben

	Koncentráció (µl/ml)	Maximális sejtszám (lg cfu/ml) átlag ± szórás	Maximum specifikus szaporodási ráta (1/h) átlag ± szórás
Kontroll	0	7,50 ± 0,24 a	0,128 ± 0,023 a
Citromolaj	0,25	7,12 ± 0,03 b	0,081 ± 0,005 b
	0,5	7,26 ± 0,25 ab	0,096 ± 0,014 ab
	1	6,96 ± 0,11 b	0,095 ± 0,029 b

A különböző betűk szignifikáns eltéréseket jeleznek ( $p < 0.05$ )

Az érzékszervi vizsgálathoz 0,25 µl/ml citrom illóolajat tartalmazó sovány tejet használtunk. A bírálók szerint a tej íze kellemes, karakteres volt, eltérően az illóolaj nélküli minta jellegtelen ízétől. A citromolaj egyenletesen eloszlott a tejben, nem voltak szabad szemmel látható olajcseppecskék. Az ízesített tej felhasználható lenne turmix italok, tejes édességek készítéséhez, de önmagában is fogyasztható.

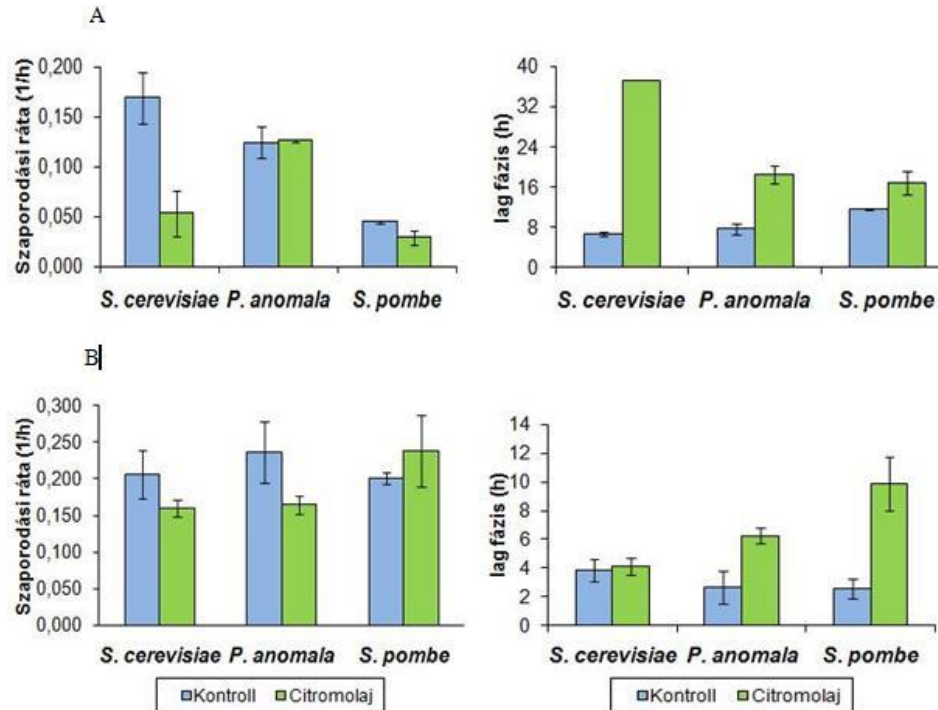
#### 4.11.2. Illóolajok antimikrobiális hatása almalében

Szűrt és natúr almalevet használtunk. Az almaleveket  $10^5$ /ml *S. cerevisiae* szuszpenzióval oltottuk be. Azért használtunk ilyen magas inokulum számot, mert ez az a sejtszám, ahol az élesztők tevékenysége a fogyasztó számára érzékelhetővé válik. Alacsonyabb sejtszám mellett nem lépnek fel érzékelhető minőségi változások (Stratford, 2006).

A 21. táblázat a két almalében mért 24 és 48 órás MIC értékeket mutatja. Az értékek 0,5 - 4  $\mu$ l/ml között változnak. Általában alacsonyabb értékeket kaptunk a szűrt almalében, ami azzal magyarázható, hogy az amúgy is kiülepedésre hajlamos élesztők hozzátapadtak a szűretlen lében található rostokhoz, így kisebb felületen fért hozzájuk az illóolaj. Négy  $\mu$ l/ml MIC-et csak a 48 órás periódus végén kaptunk, és csak néhány esetben. A legérzékenyebb élesztő a korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan a *S. pombe* volt, és a leghatásosabb illóolaj a citrom és majoránna. A szaporodási paraméterek vizsgálatához már csak citromolajat használtunk (7. ábra). Szűrt lében *S. cerevisiae* és *S. pombe* szaporodási rátái szignifikánsan csökkentek az illóolaj hatására, míg a natúr almalében a változás nem volt szignifikáns.

**21. táblázat:** Illóolajok MIC ( $\mu$ l/ml) értéke a szűrt (I) és a szűretlen (II) almalében

Faj		<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. pombe</i>		<i>P. anomala</i>	
Illóolaj	Típus	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Boróka	I	2,0	4,0	1,0	1,0	1,0	2,0
	II	2,0	4,0	0,5	1,0	2,0	2,0
Majoránna	I	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0
	II	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
Muskotályzsálya	I	2,0	4,0	0,5	1,0	1,0	1,0
	II	2,0	4,0	1,0	1,0	1,0	4,0
Citrom	I	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0	2,0
	II	1,0	2,0	0,5	1,0	1,0	2,0



**7. ábra:** Citromolaj (0,25 µl/ml) hatása élesztők szaporodási paramétereire szűrt (A) és natúr almalében (B).

*S. cerevisiae* és *P. anomala* lag fázisai meghosszabbodtak szűrt almalében citromolaj hatására, míg a natúr almalében péklesztő nyugalmi szakaszának hossza nem változott. Említésre méltó, hogy a lag fázisok mindegyik élesztőnél hosszabbak voltak a szűrt almalében, illóolaj nélkül is.

A harmonizáló ízhatások miatt az érzékszervi vizsgálatához a citromolajat választottuk. Az érzékszervi bírálók mindegyike meglepően harmonikus, üdítő ízként írta le a 0,25 µl/ml citromolajat tartalmazó szűrt almalé ízét, ugyanakkor a citrom illat teljesen elnyomta az eredeti alma illatot. Az ital felszíne kissé fátyolos volt a kellően nem emulgeált olajcseppecskék miatt. A natúr almalé ízét szintén kedvezően ítélték meg a bírálók, és itt kevésbé volt zavaró a citrom illat. Az illóolajat dobozos almalevekhez adtuk felbontás után. Megfigyeléseink szerint, hűtötten tárolva a gyümölcsleveket, még a 7. napon sem volt semmilyen jele a romlásnak. (Elméletileg 3 nap a fogyaszthatósági idő felbontás után, ha hűtve tárolják a bontott dobozt). A citromolajjal kiegészített almalé termékfejlesztésre alkalmas ötlet, ahol azonban meg kell oldani az illóolaj egyenletes eloszlását.

Citrusfélékből származó illóolajokat kísérleti szinten már többen is sikeresen alkalmaztak gyümölcsalapú készítmények eltarthatóságának növelésére (Caccioni és mtsai., 1998; Viuda-Martos és mtsai., 2003; Belletti és mtsai., 2007), de nincs tudomásunk róla, hogy bármelyik is eljutott volna a termékfejlesztési szakaszba.

#### **4.11.3. Illóolajok antimikrobiális hatása darált sertéshúsban**

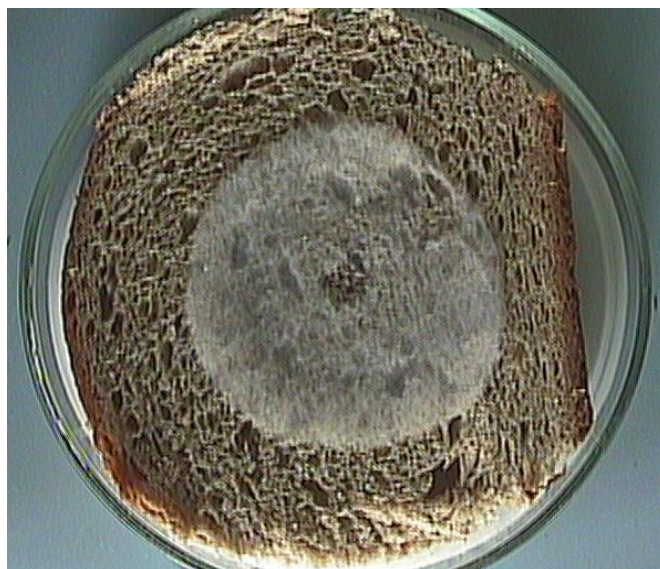
*E. coli*-val mesterségesen befertőzött darált hús csíraszámának alakulását figyeltük 24 óras hűtve tárolás során majoránna-olaj hatására. A kiindulási csíraszám  $2 \times 10^5$ /g volt. A 22. táblázatból leolvasható, hogy 1% majoránna-olaj mellett egy nagyságrendnyi csíraszám-csökkenés következett be. Hasonló eredményt kaptak Busatta és munkatársai (2008), akik frissen készített kolbászt fertőztek *E. coli*-val. A kolbászhoz majoránna-olajat adtak, a tápközegben mért MIC 0,5 x; 1x, és 2,5x-es koncentrációjában. Huszonöt napos tárolás után a 2,5 MIC majoránna olajat tartalmazó mintában a *Coli*-szám kb. egy nagyságrenddel csökkent a kontrollhoz képest. Ez az illóolaj koncentráció az érzékszervi bírálat szerint azonban rontotta a kolbász ízét. Mi nem végeztünk kóstolási próbát, de az 1% illóolaj hatására kellemetlenül dominánssá vált a majoránna illat, elnyomva a hús természetes szagát.

**22. táblázat:** *E. coli*-val fertőzött darált sertéshús csíraszama 24órás hűtött ( $4^{\circ}C$ ) tárolás után

Illóolaj koncentráció (%)	Csíraszám (CFU/g)
0	$4,1 \times 10^5$
0,25	$6,5 \times 10^5$
0,5	$3 \times 10^5$
1	$7,5 \times 10^4$

#### 4.11.4. Illóolaj gőztér hatása kenyérlenészesedést okozó penészgombákra

A kísérletben fehér (100% búzaliszt), félbarna (85 % búza- és 15% rozsliszt) és rozskenyeret (80% sötét rozsliszt mellett kömény, édeskömény, koriander és ánizs) oltottunk be *P. chrysogenum*, *A. niger* és *R. stolonifer* penészgombákkal. A *Rhizopus* törzset kenyérről izoláltuk korábban. A kenyerek gyártó által megadott eltarthatósági ideje 8 nap, mi a gyártás utáni 4. napon végeztük a befertőzést. A kenyérszeleteket 30 µl majoránna, illetve muskotályzsálya illóolaj gőztérébe helyeztük, és figyeltük a látható gombatelepek megjelenésének idejét, majd ezután naponta mértük a telepek átmérőjét (8. ábra).



8. ábra: *A. niger* telep rozskenyéren

23. táblázat: A látható gombatelepek megjelenéséig eltelt napok száma

Kenyér	Fehér kenyér		Félbarna kenyér		Rozskenyér	
	Ma	Mu	Ma	Mu	Ma	Mu
<i>A. niger</i>	9	nn	10	10	9	6
<i>P. chrys.</i>	9	4	10	4	nn	nn
<i>Rhizopus spp.</i>	8	10	8	8	nn	nn

nn -nincs növekedés, Ma -majoránna, Mu -muskotályzsálya



A 23. táblázat alapján a majoránna és muskotályzsálya gőztér minden esetben késleltette a telepek megjelenését. A 14 napos vizsgálati idő alatt a rozskenyéren nem jelentek meg *Penicillium* és *Rhizopus* telepek. Meg kell jegyeznünk, hogy míg a fehér és félbarna kontroll kenyerek mindegyikén már a 2. napon szemmel látható penésztelepek jelentek meg, addig a rozskenyéren csak a 4-5. napon lehetett a telepképződést észrevenni. A kenyerek közül a rozskenyérnek volt a legmagasabb víztartalma (28%), ezért valószínűleg a rozsliszt, illetve a fűszerek antimikrobiális hatásának tudható be ez a növekedésgátlás, nem a vízakktivitás csökkenésének. Az illóolajok gőztere minden esetben legalább duplájára nyújtotta az eltarthatósági időt. Az érzékszervi vizsgálatok szerint azonban nem csak a kenyerek illatát, hanem ízét is nagymértékben befolyásolták az illóolajok. Megoldás lehet az illóolaj mennyiség csökkentése, vagy a gőztér térfogatának növelése. Az illóolaj gőztér létrehozása az ún. aktív csomagolásokban a szakirodalom szerint hozzájárulhat kenyerek és egyéb élelmiszerek eltarthatóságának növeléséhez, mesterséges tartósítószer használata nélkül (Aaron és mtsai, 2008; Suhr és Nielsen, 2000; 2003; 2005).

### Konklúzió

Eredményeink alapján az illóolajok, mint természetes eredetű szerek felhasználása élelmiszerek tartósítására gyakorlati szempontból is ígéretes terület. A kísérletek jelentős mértékben bővítették az illóolajok Gram pozitív és Gram negatív baktériumokra, élesztőkre és fonalas gombákra tett antimikrobiális hatásával kapcsolatos ismereteinket. Kiderült, hogy a terpén- és terpén-alkohol fő komponensű illóolajok, eltérő hatásmechanizmusuk ellenére, egyformán hatásos antimikrobiális szerek.

A szaporodási paraméterek közül az illóolajok elsősorban a nyugalmi szakaszok koncentráció-függő meghosszabbodását okozták, míg a szaporodási sebességeket nem vagy csak ritkán befolyásolták. A Gram pozitív baktériumok érzékenyebbek voltak, mint a Gram negatívak, ami az eltérő sejtfal-szerkezettel magyarázható. A penészgombák esetében az illóolaj gőztér hatékonyabban gátolta a telepnövekedést, mint a táptalajba kevert illóolaj. Az illóolaj kombinációk a vizsgált mikroorganizmustól függően mutattak kölcsönhatást. Az egyes fő komponensek vizsgálatánál többször másféle kölcsönhatás mutatkozott, mint a teljes olajok esetén, ami a minor komponensek hatás-befolyásoló szerepére utal.

Gyakorlati szempontból is fontos ismereteket szereztünk az élelmiszerek és az illóolajok kölcsönhatásáról, mely ismeretek később hasznosíthatóak lesznek az illóolajok tartósítószerként történő esetleges felhasználása során. Az állati eredetű hidrolizált fehérjék nagy koncentrációban védelmet jelentettek az illóolajok növekedést gátló hatásával szemben, míg a növényi eredetű szójapeptonnak nem volt ilyen hatása.

Valós élelmiszerekben kipróbálva az illóolajokat, a legjobb hatást a magas cukor-, alacsony fehérje- és zsírtartalmú, savas pH-jú gyümölcslevekben kaptuk. Az érzékszervi vizsgálatok alapján is a gyümölcslevek lehetnek az illóolaj hozzáadásával készülő élelmiszerek termékfejlesztésének kiindulási pontjai.

A kísérletek folytatásában pontosítani kívánjuk az illóolajok és az egyes illóolaj komponensek hatását a sejtmembránra. Megvizsgáljuk, hogy van-e hatása az általunk használt illóolajoknak a sejt-sejt közötti kommunikációra, és hogy rendelkeznek-e prooxidáns tulajdonsággal? Továbbá megvizsgáljuk az illóolaj gőztér kifejlesztésének lehetőségét aktív csomagolási technikákban. Javaslatot teszünk gyümölcslé és tej alapú, illóolajok felhasználásával készült új termékek kifejlesztésére.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban az élelmiszer tömegcikké vált, az élelmiszergyártás meghatározó iparág. A jó minőségű, elegendő és biztonságos élelmiszer előállításához technológiai fegyelemre és az élelmiszerbiztonsági előírások messzemenő figyelembevételére van szükség. A gyártók és forgalmazók folyamatos harcot vívnak az élelmiszerromlást okozó mikroorganizmusok ellen, ahol a régi és jól bevált módszerek mellett szükség van mindig újabb technológiák és tartósítóanyagok bevezetésére.

A fogyasztók egy jelentős része nem szereti a túl sok „E-számot” (adalékanyagot) tartalmazó élelmiszereket, és tudatosan kerüli a mesterséges tartósítószereket. A régóta használt tartósítószernek némelyikéről kiderült, hogy az élelmiszerben átalakulhat veszélyes vagy kellemetlen mellékízt, illatot produkáló vegyületté. A kutatók és gyártók figyelmébe is a természetes eredetű antimikrobiális anyagok felé fordult, hogy legalább részben, kiváltsák a mesterséges tartósítószereket.

Az illóolajok növényekből vízgőzdesztillációval nyerhető tömény hidrofób folyadékok, melyek a fűszer- és illatnövények aromájáért, illatáért felelősek. Sokuknak van antimikrobiális hatása és rendelkeznek a GRAS (általánosan biztonságosnak elfogadott) és FA (élelmiszer adalék) besorolással, és a fogyasztók nagy része is elfogadja használatukat az élelmiszerekben.

A dolgozat célja volt megvizsgálni néhány, előkísérletekben kiválasztott illóolaj antimikrobiális hatását élelmiszerromlást okozó baktériumok, élesztő- és fonalasgombák ellen. Mivel az illóolajok élelmiszerekben való felhasználásának gátat szab erős aromájuk, amely megváltoztatja az ételek ízét, vizsgáltuk az illóolaj kombinációk hatását is. A kombinációkban az egyes illóolajok hatása összeadódik, vagy éppen felerősödik, így kisebb koncentrációban is hatásosak. Mivel az illóolajok nagyon sok összetevőből állnak, lényeges, hogy ismerjük az egyes komponensek hatásmechanizmusát, ezért kísérleteinkben megvizsgáltuk a kiválasztott illóolajok (boróka, citrom, majoránna, muskotályzsálya) fő komponenseinek ( $\alpha$ -pinén, limonén, linalool, terpinén-4-ol) és azok kombinációinak hatását is. Az élelmiszerek bonyolult összetételű és szerkezetű rendszerek, melyeknek anyagai kölcsönhatásba léphetnek az illóolaj összetevőkkel befolyásolva azok hatását. Kísérleteinkben vizsgáltuk állati és növényi eredetű fehérje hidrolizátumok és szacharóz hatását az illóolajok

antimikrobiális tulajdonságaira. Végül nem csak tápközegben, hanem valós élelmiszerekben is kipróbáltuk illóolajainkat.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a baktériumok, élesztőgombák szaporodási paramétereit közül az illóolajok elsősorban a lag fázis (nyugalmi szakasz) hosszára vannak hatással. Legtöbbször a koncentráció növekedésével arányosan hosszabbodtak ezek az időszakok, néhány esetben a vizsgált időtartam alatt (48 óra) nem indult meg a szaporodás. A szaporodási sebességeket gyakran nem befolyásolta az illóolaj jelenléte, vagy csak a nagyobb koncentrációk csökkentették. A Gram pozitív baktériumok érzékenyebbek voltak, mint a Gram negatívak. A penészgombák telepképzési sebességét - a telepmérettel ellentétben - szintén kevésbé befolyásolták az illóolajok. Penészgombák esetében az illóolaj gőztér hatékonyabban gátolta a telepnövekedést, mint a táptalajba kevert illóolaj.

A minimális gátló koncentráció (MIC) értékek a 0,25 - 2 µl/ml tartományba estek baktériumok és élesztők esetében. A mikroorganizmusok egyéni érzékenysége alapján egyik illóolaj sem emelkedik ki a többi közül. Nagy általánosságban azt mondhatjuk, hogy míg a majoránna- és muskotályzsálya-olaj a baktériumok, addig a boróka- és a citromolaj az élesztő- és fonalas gombák esetében mutatott erőteljesebb gátló hatást.

Az illóolaj kombinációk additív vagy semmilyen kölcsönhatást sem mutattak. Az egyes komponensek vizsgálatánál a monoterpének ( $\alpha$ -pinén és limonén) hatásosabbnak bizonyultak a terpén-alkoholoknál (linalool és terpinén-4-ol). Illóolajaink egyike sem tartalmazott fenolos típusú összetevőt, melyek a szakirodalom szerint a leghatékonyabb antimikrobiális anyagok közé tartoznak. A fenolos típusú összetevők képesek megnövelni a Gram negatív baktériumok külső membránjának átjárhatóságát a hidrofób molekulák számára. Mivel a mi illóolajainkban nem voltak ilyen komponensek, érthető, hogy a Gram negatív baktériumok kevésbé voltak érzékenyek. A kismolekulájú, hidrofób monoterpének fő támadáspontja sejtmembrán: megnövelik átjárhatóságát, aminek következtében a sejt anyagának egy része kiáramlik, és felborul a sejt belső környezetének egyensúlya. A terpén-alkoholok elsősorban a sejten belüli fehérjék koagulációját okozzák. A terpének és terpén-alkoholok ezen kívül gátolják bizonyos enzimek működését és beavatkoznak a gombamembrán egyik fontos alkotórészének, az ergoszterin szintézisébe.

Az állati eredetű hidrolizált fehérjék nagy koncentrációban védelmet jelentettek az illóolajok növekedést gátló hatásával szemben, míg a növényi eredetű szójapeptonnak nem

volt ilyen hatása. Tudomásunk szerint mi vagyunk az elsők, akik állati és növényi eredetű fehérje hidrolizátumok illóolajokkal való kölcsönhatása közti különbséget leírták. Az állati eredetű fehérjék hidrofób oldalláncai megkötötték az illóolaj alkotókat, és nem juthattak el a vizes fázisban található baktériumokhoz, míg, úgy tűnik a növényi eredetű pepton inkább elősegítette az illóolaj egyenletes szétoszlását a rendszerben. A szacharóz nem befolyásolta lényegesen az illóolajok antimikrobiális hatását.

Valós élelmiszerekben kipróbálva az illóolajokat, a legjobb hatást a magas cukor, alacsony fehérje és zsírtartalmú, savas pH-jú gyümölcslevekben kaptuk. Az érzékszervi vizsgálatok alapján is gyümölcslevek lehetnek az illóolaj hozzáadásával készülő élelmiszerek termékfejlesztésének kiindulási pontjai.

Csomagolt kenyereknél az illóolajat is tartalmazó aktív csomagolás jelenthet jelentős technológiai és élelmiszerbiztonsági előrelépést.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az általunk használt illóolajok mindegyike jelentős antimikrobiális hatást mutatott, és nem egy esetben megtettük az indító lépést élelmiszertechnológiai újítások irányába.

## 6. SUMMARY

Today, food is a mass industrial product, and food production is a major branch within the industry. The production of safe and good quality food in sufficient quantities requires discipline in manufacturing and full adherence to food safety regulations. Food producers and distributors are in an ongoing struggle with microorganisms causing food deterioration. Beside the old established methods, this needs the introduction of newer and newer technologies and preservatives.

A considerable part of the consumers do not like too many E numbers (that is, additives) in their food and is conscious about avoiding artificial preservatives. And it turned out that some of the traditional preservatives can be converted in the food to compounds that are dangerous or cause off-taste or -odour. So the attention of both researchers and manufacturers was attracted to antimicrobial agents of natural origin, so that the artificial preservatives could be replaced, at least in part.

Essential oils (EOs) are concentrated hydrophobic liquids, responsible for the odour and aroma of herbs, which can be extracted by steam distillation. Several of them show antimicrobial action and have the GRAS (generally regarded as safe) and/or FA (food additive) status, moreover, their use in foods is accepted by the majority of the consumers.

The aim of this work was to examine the effect of certain essential oils, selected in preliminary experiments, on some bacteria, yeasts and filamentous fungi causing food deterioration. The use of essential oils is limited by their strong aroma, altering the taste of the food, therefore, combinations of oils were also tested. Additive or synergistic effect were observed among several essential oils applied in combinations. In these cases lower concentrations of the oils are sufficient to reach the same effect in combination than alone. Essential oils consist of numerous components. The mode of action of these is thus also of interest, so the effect of the main components of the selected essential oils (such as  $\alpha$ -pinene of juniper oil, limonene of lemon oil, linalool of marjoram oil and terpinen-4-ol of clary sage), as well as the combinations of these, were also investigated.

Foods often have complicated composition and structure, where the substances may interact with the components of the essential oils, influencing their effect. Therefore, we also tested the influence of animal and plant protein hydrolysates and sucrose on the antimicrobial

effect of selected essential oils. Finally, the essential oils under investigation were tested also in real foods.

In the experiments, it was found that the length of the lag phase is the growth parameter most affected by the essential oils in case of bacteria and yeasts. The lengthening was typically proportional to the concentration, and in some cases no growth was observed in the 48 hours observation period. Growth rate was often not influenced by the presence of the essential oil, or was lowered only by the higher doses. Gram positive bacteria were more sensitive than Gram negative ones. In case of moulds, the EOs influenced more the size of the colony and less the colony forming rate. Also, the growth of the moulds was more influenced by EO vapour space than by EOs mixed to the medium.

Minimal inhibitory concentrations (MIC) were between 0.25 - 2  $\mu$ l/ml for bacteria and yeasts. None of the EOs proved to be especially efficient on the basis of the microbes' individual sensitivity. Generally it can be stated that the EO of marjoram and clary sage exerted stronger inhibitory effect on bacteria, and juniper and lemon EO, on yeasts and moulds.

Combination of EOs showed additive interaction or none at all. In testing the components, monoterpenes ( $\alpha$ - pinene and limonene) were more efficient than terpene alcohols (linalool and terpinene-4-ol). Phenolic components, described as the most efficient antimicrobial substances in the literature, were not present in the EOs investigated. Phenolic components can increase the permeability of the outer membrane of Gram negative bacteria for hydrophobic molecules. The lack of phenolics in our EOs may explain their moderate effect on Gram negatives. The site of action of small, hydrophobic monoterpene molecules is the cell membrane: permeability is increased, resulting in loss of the cell's substances and loss of balance of the intracellular environment. Terpene alcohols cause primarily the coagulation of intracellular proteins. Terpenes and terpene alcohols also inhibit the action of certain enzymes, and interfere with the synthesis of ergosterine, a main component in the membrane of fungi.

High concentrations of animal protein hydrolysates exerted protection against the growth inhibitory effect of EOs but similar effect was not observed in the case of soy peptone. Apparently we are the first to describe the difference between animal and vegetable proteins in the interaction with EOs. The hydrophobic side chain of the animal proteins probably

bound the components of the EOs so these could not reach the bacteria in the aqueous phase. The peptone of plant origin, instead, promoted the even distribution of the EO in the medium. Sucrose had no effect on the antimicrobial effect of the EOs.

On testing the EOs in real foods, the best effects were achieved in fruit juices of low pH, high sugar, but low protein and fat content. Organoleptic test also indicated that fruit juices can provide the starting point for product development of foodstuffs with added EOs. For packaged bread, EO-containing active packaging may be a significant advance in technology and food safety.

To sum up the outcomes of the work, it can be stated that substantial antimicrobial effect could be verified for each of the EOs investigated, and in several cases the initial steps towards a food technology innovation were also done.



## Irodalomjegyzék

- Aaron, L., Betty, B., Han, J. H., Sand, C. K., and Mchugh, T. H. (2008) Innovative food packaging solutions. *J. Food. Sci.* 73: 107-116.
- Adegoke, G. O., Iwahashi, H., Komatsu, Y., Obuchi, K. and Iwahashi, Y., 2000. Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice *Aframomum danielii*. *Flavour and Fragrance Journal* 15, 147-150.
- Annous, B.A., Fratamico, P.M., Smith, J.L. (2009)— Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. *J. Food Sci.* 74: 24-36.
- Arslan, N., Gurbuz, B., Sarihan, E.O., Bayrak, A. and Gumuscu, A. (2004) Variation in essential oil content and composition in turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations. *Turk. J. Agric. For.* 28: 173-177.
- Atanda, O.O., Akpan, I. and Oluwafemi, F. (2007) The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control* 18: 601-607.
- Atrea, I., Papavergou, A., Amvrosiadis, I. and Savvaidis, I.N. (2009) Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4<sup>0</sup>C. *J. Food Microbiol.* 26: 166–172.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *J. Food Microbiol.* 21: 33–42.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 4: 446–475.
- Belletti, N., Kamdem, S.S., Tabanelli, G., Lanciotti, R. and Gardini, F. (2010) Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *Int. J. Food. Microbiol.* 136: 283–289.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T. and Remmal, A. (2004) Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Appl. Microbiol.* 38: 454–458.

- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 223– 253.
- Busattaa, C., Vidala, R.S., Popiolskia, A.S., Mossia, A.J., Darivab, C., Rodriguesc, M.R.A., Corazzaa, F.C., Corazzaa, M.L., Oliveiraa, J.V. and Cansiana, R.L. (2008) Application of *Origanum majorana L.* essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *J. Food. Microbiol.* 25: 207–211.
- Caccioni, D.R., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A. and Rubertob, G. (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food. Microbiol.* 43: 73–79.
- Carson, C.F., Mee, B.J. and Riley, T.V. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 1914–1920.
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A. and Marin-Iniesta, F. (2007) Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J. Food. Prot.* 70 (12): 2757-2763.
- Cerrutti, P. and Alzamora, S.M. (1996) Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. *J. Food. Microbiol.* 29: 379-386.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88: 170–175.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A. and Trombetta, D. (2007) Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food. Chem.* 55 (15): 6300–6308.
- Dabbah, R., Edwards, V. M. and Moats, W. A. (1970) Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl. Microbiol.* 19: 27-31.
- Daifas, D.P., Smitha, J.P., Blanchfieldb, B., Sandersb, G., Austinb, J.W. and Koukoutisisc, J. (2004) Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 313– 322.

- Deák, T. (szerk) Élesztőgombák. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest. 1998.
- Deák, T., 2007. Yeasts. In: Deák, T. (Ed.), Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Boca Raton, pp. 369-370.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Cannarsi, M. and Sinigaglia, M. (2009) Strategies for prolonging the shelf life of minced beef patties. *J. Food. Safe.* 29: 14–25.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J. (2004) Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *J. Food Microbiol.* 21: 703–714.
- Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F. and Sahin, F. (2008) Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *Int. J. Food. Microbiol.* 124: 179–182.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308–316.
- Frank Zsófia-Kürti Gábor: Gyógyítás illóolajokkal, Püedlo Kiadó, 2003,
- Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A. and Ricci, D. (2005) Composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* from Italy. *Chem. Nat. Compounds.* 41: 604-606.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P. and Holley, R.A. (2002) Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food. Microbiol.* 73: 83– 92.
- Gulfraz, M., Mehmood, S., Minhas, N., Jabeen, N., Kausar, R., Jabeen, K. and Arshad, G. (2008) Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *Afr. J. Biotechnol.* 7: (24). 4364-4368.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. (2009) Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food. Microbiol.* 26: 142–150.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2008) The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food. Microbiol.* 124: 91–97.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86: 985–990.

- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (2004) Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. 53: 1081–1085.
- Hayley, A.L. and Palombo, E.A. (2009) Activity of essential oils against *Bacillus subtilis* spores. J. Microbiol. Biotechnol, 19: (12). 1590–1595.
- Hudecova, A., Valik, L. and Liptakova, D. (2009) Influence of temperature on the surface growth of *Geotrichum candidum*. Acta Chimica Slovaca 2: 75-87.
- Iten, F., Saller, R., Abel, G. and Reichling, J. (2009) Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype carvacrol. Planta. Med. 75: 1231-1236.
- Jakucs, E., Vajna, L. (szerk) Mikológia. Agroinform Kiadó, Budapest. 2003.
- Jia, H.L., Ji, Q.L., Xing, S.L., Zhang, P.H., Zhu, G.L. and Wang, X.H. (2010) Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. J. Food .Sci. 75: 59-65.
- Joshi, SS., Kuszynski, C.A., Bagchi, D. (2001) The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. Curr Pharm Biotechnol. 2: 187–200.
- Juven, B., Kanner, J., Schved, F. Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Microbiology, 6, 626-631.
- Kamel, B.S. Dawson, H., Kakuda, Y. (1985) Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. J. Am. Oil Chem. Soc. 62: 881–883
- Kaminskas, A., Breides, V., Budrioniene, R., Hendrixson, V., Petraitis, R. and Kucinskiene, Z. (2006) Fatty acid composition of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) of pulp oil Lithuanian origin stored in different temperatures. Biologia 2: 39-41.
- Kosalec, I., Peljnjak, S. and Kutrak, D (2005) Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*). Acta Pharm. 55:377–385.
- Lambert, R. J. W. and Lambert, R., 2007. A model for the efficacy of combined inhibitors. Journal of Applied Microbiology, 95, 734-743.

- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E. and Gardini, F. (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Food. Sci. Technol.* 15: 201–208.
- Le, D. H. and Kyung, K.H. (2006) Inhibition of yeast film formation in fermented vegetables by materials derived from garlic using cucumber pickle fermentation as a model system. *Food. Sci. Biotechnol.* 15: (3). 469-473.
- Liang, Z., Cheng, Z. and Mittal, G.S. (2003) Inactivation of microorganisms in apple cider using spice powders, extracts and oils as antimicrobials with and without low-energy pulsed electric field. *Food. Agric. Environ.* 1: 28-33.
- Longbottom, C.J., Carson, C.F., Hammer, K.A., Mee, B.J. and Riley, T.V. (2004) Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 386–392.
- Lopez, V., Akerreta, S., Casanova, E., Garcia-Mina, J.M., Cavero, R.Y. and Calvo, M.I.(2007) In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts. *Plant Foods. Hum. Nutr.* 62: 151-155.
- Matan, N.and Matan,N. (2008) Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Int. J. Biodet. Biodegr.* 62: 75–78.
- Mejlhalm, O. and Dalgaard, P. (2002) Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and ®sh products. *J. Appl. Microbiol.* 34: 27-31.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D. and Zlatković, B. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Cent. Eur. J. Biol.* 4: 411–416.
- Min, B.J and Oh, J.H. (2009) Antimicrobial activity of Catfish gelatin coating containing *Origanum (Thymus capitatus)* oil against gram-negative pathogenic bacteria. *J. Food. Sci.* 74: 143-148.
- Morena, A.B., Pozo, A.M., Borja, M. and Segundo, B.S. (2003) Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* 11: 1344-1353.

- Nevas, M., Korhonen, A., Lindstrom, M., Turkki, P. and Korkeala, H. (2004) Antibacterial efficiency of finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food. Protec.* 67: 199-202.
- Nguefack, J., Letha, V., Zollob, P.H. A. and Mathura, S.B. (2004) Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 329– 334.
- Nguefack, J., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., Guemdjom, E.F.N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Zollo, P.H.A. and Nkengfack, A.E. (2009) Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *Int. J. Food. Microbiol.* 131: 151-156.
- Nielsen, P.V. and Rios, R. (2000) Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food. Microbiol.* 60: 219-229.
- Novák, I., Zámboři-Németh, É., Horváth, H., Seregély, Zs., Kaffka, K. (2003) Study of essential oil components in different origanum species by GC and sensory analysis. *Acta Aliment.* 32: 141-150.
- Oomah, B.D., Liang, J., Godfrey, D., Mazza, G. (1998) Microwave heating of grapeseed: effect on oil quality. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4017–4021.
- Ozcan, M.M. and Chalchat, J.C. (2006) Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum L.*) fruit oil at ripening stage. *Annal. Microbiol.* 56: (4). 353-358.
- Ozcan, M.M., Chalcha, J.C., Arslan, D., Ates, A. and Unver, A. (2006) Comparative essential oil composition and antifungal effect of bitter fennel (*Foeniculum vulgare ssp. piperitum*) fruit oils obtained during different vegetation. *J. Med. Food.* 9: (4). 552–561.
- Parveen, M., Hasan, K., Tkahashi, J., Murata, Y., Kitagawa, E., Kodama, O. and Iwahashi, H., (2004) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 46-55.

- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kaloera, Z. and Blazevic, N. (2005) Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., *Cupressaceae*). *Acta Pharm.* 55: 417–422.
- Pesti M. (szerk) *Általános mikrobiológia*. Dialóg Campus, Budapest-Pécs. 2001.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonc, alves, M., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. and Martinez-de-Oliveira, J. (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* 49: 1367–1373.
- Pol, I .E., Mastwijk, H. C., Slump, R. A., Popa, M. E. and Smid, E. J., 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *Journal of Food Protection* 64, 1012-1018.
- Rasooli, I., Moosavi, M.L., Rezaee, M.B. and Jaimand, K. (2002) Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *J. Agric. Sci. Technol.* 4: 127-133.
- Rehman, S., Hussain, S., Nawaz, H., Ahmad, M.M., Murtaza, M.A. and Rizvi, A.J. (2007) Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistan. J. Nutr.* 6: (6). 558-561.
- Rodler Imre (szerk.) *Élelmezés- és táplálkozás egészségtan*. Medicina, Budapest, 2005.
- Rodriguez, A., Batlle, R. and Nerin, C. (2007) The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. *Prog. Org. Coat.* 60: 33–38.
- Rodriguez, G. O., Morales, G.V., Gonzalez, C.N., Cabrera, S.L., Sulbaran, B.F., Morales, G.V., and Sulbaran, F.B. (1998) Composition of Venezuelan lemon essential oil *C. limon*. (L.) *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 15: 343-349
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L. and Mallamaci, R. (2008) The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomed.* 15: 635–638.
- Sacchetti, G., Silvia, M., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food. Chem.* 91: 621–632.
- Schelz, Z., Molnar, J. and Hohmann, J. (2006) Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* 77: 279–285.

- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M.P. and Catalan, C.A.N. (2008) Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food. Chem. Toxicol. 46: 3295–3302.
- Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M.P. and Catalan, C. (2006) Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. Food. Cont. 17: 745–752.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. J. Food. Microbiol. 18: 463-470.
- Stratford M., 2006. Food and beverage spoilage yeasts. In: Quarol A. and Fleet G.H. (eds.) Yeasts in food and beverages. The yeast handbook. Springer, Berlin, pp. 335-379.
- Suhr, K.I. and Nielsen, P.V. (2003) Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. J. Appl. Microbiol. 94: 665-674.
- Suhr, K.I. and Nielsen, P.V. (2005) Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. J.Food.Sci. 70: (1). 37-44.
- Szabó, M.Á., Varga, G.Z., Hohmann, J., Schelz, Zs., Szegedi, E., Amaral, L., Molnár, J. (2010) Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. Phytother. Res. 24: 782-786.
- Uribe, S., Ramirez, J. and Pena, A. (1985) Effects of  $\beta$ -pinene on yeast membrane function. Journal of Bacteriology 161, 1195-1200.
- Vekiari, S.A, Papadopoulou, E.E.P., Panou, C. and Vamvakias, M. (2002) Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peels of certain lemon varieties. J. Agri.Food Chem., 2: 147-153.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez. (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food. Cont. 19: 1130–1138.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., Ghaouth, A.E. and Wisniewski, M. E. (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81:204-210.



Zeb, A. (2004) Important therapeutic uses of sea buckthorn (*Hippophae*): a review. Journal of Biological Sciences, 4(5), 687-693p.

## A szerző publikációs tevékenysége

### Folyóiratcikkek:

1. **Tserennadmid, R.**, Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Vágvolgyi, Cs., Gerő, L., Krisch, J.(2010) Antimicrobial effects of essential oils and interaction with food components. *Cent. Eur. J. Biol.* 5(5): 641-648.(If:0,918)
2. **Tserennadmid, R.**, Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Miklos, P., Vágvolgyi, Cs., Almássy, K., Krisch, J. (2010) Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology* (In press) (If: 3,011)
3. Krisch, J., Pardi, Zs., **Tserennadmid, R.**, Papp, T., Vágvolgyi, Cs. (2010) Antimicrobial Effects of Commercial Herbs, Spices and Essential Oils in Minced Pork. *Acta Biologica Szegediensis*. (In press)
4. Krisch, J., Pardi, Zs., Kovacs, K., Tako, M., Papp, T., Vágvolgyi, Cs., **Tserennadmid, R.** (2010) Effect of essential oils in food systems. *Analecta Technica Szegediensis*. 2-3: 128-132.

### Referált folyóiratban megjelent összefoglalók:

1. **Tserennadmid, R.**, Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Vágvolgyi, Cs., Krisch, J. (2009) Essential oils against food spoilage bacteria and yeasts. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56, 233.

### Egyéb konferencia-kiadványban megjelent összefoglalók:

1. Krisch, J., Pardi, Zs., Kovacs, K., Tako, M., Papp, T., Vágvolgyi, Cs., **Tserennadmid, R.** (2010) Effect of essential oils in food systems. *ICoSTAF2010, Abstracts* 39.
2. **Tserennadmid, R.**, Krisch, J., Takó, M., Galgóczy, L., Vágvolgyi, Cs. (2009) Antimicrobial effects of essential oils and their combinations. 11<sup>th</sup> DKMT Regional Conference on Environment and Health. *Abstracts*, pp102.

3. Krisch, J., Horváth, G., Vágvölgyi, Cs., **Tserennadmid, R.**, Dugarsuren, Ts. (2010) Antimicrobial action of essential oils against food-related moulds. ISIRR, Abstracts: pp. 96. (CD- ISBN. 978-963-508-600-9)

**Konferenciaszereplések:**

1. **Tserennadmid, R.**, Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Krisch, J. (2009) Essential oils against food spoilage bacteria and yeasts. 2nd Central European Forum for Microbiology (CEFORM), Okt. 7-9. Keszthely, Hungary.
2. **Tserennadmid, R.**, Krisch, J., Takó, M., Galgóczy, L., Vágvölgyi, Cs. (2009) Antimicrobial effects of essential oils and their combinations. 11<sup>th</sup> DKMT Regional Conference on Environment and Health, DKMT 15/16 May 2009, Szeged, Hungary.
3. Krisch, J., Pardi, Zs., Kovacs, K., Tako, M., Papp, T., Vágvölgyi, Cs., **Tserennadmid, R.** (2010) Effect of essential oils in food systems. International Conference On Science And Technique In The Agri-Food Business, ICoSTAF, 3-5 Nov. 2010. Szeged, Hungary
4. Krisch, J., Horváth, G., Vágvölgyi, Cs., **Tserennadmid, R.**, Dugarsuren, Ts. (2010) Antimicrobial action of essential oils against food-related moulds. 11<sup>th</sup> International Symposium Interdisciplinary Regional Research, ISIRR, 13-15. Okt. 2010, Szeged, Hungary.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Vágvolgyi Csaba tanszékvezetőnek és témavezetőmnek, aki bizalmat szavazott nekem, amikor MÖB ösztöndíjasként a tanszéken fogadott és iránymutató szakmai tanácsaival segítette előrehaladásomat, és lehetővé tette munkámat a Szegedi Tudományegyetem TTIK Mikrobiológiai Tanszékén.

Hálával és köszönettel tartozom Dr. Krisch Judit témavezetőmnek, munkám során mind szakmailag, mind emberileg nyújtott sokrétű, lelkiismeretes és önzetlen segítségéért. Köszönöm a publikáció területén és disszertáció elkészítésében nyújtott segítségét, türelmét, hasznos tanácsait.

Köszönettel tartozom Mongol Tudományos Akadémia, Biológiai Kutató Intézet igazgatójának prof. Tsesrenjav Janchiv akadémikus úrnak, valamint Dr. Dugarsuren Tserendulam laborvezetőmnek a dolgozatom elkészüléséhez nyújtott támogatásukért.

Köszönetemet fejezem ki Takó Miklósnak és Dr. Galgóczy Lászlónak a labormunka végzéséhez nyújtott hasznos szakmai tanácsaiért és segítségükért.

Köszönettel tartozom a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék összes dolgozójának, akik munkájukkal, tanácsaikkal segítettek és baráti légkör kialakításával nagyban hozzájárultak munkám végzéséhez.

Külön köszönettel tartozom anyukámnak, családomnak, testvéreimnek és családjuknak, unokahúgomnak, akik mindvégig támogattak, mellettem álltak és türelmes, nyugodt, biztos hátteret biztosítottak munkám elvégzéséhez.

Хайрт аав Монгол Улсын Гавъяат Механикжуулагч  
Санжийн Цэрэннадмид таныхаа  
гэгээн дурсгалд зориулав.