

POLIMERY

MIESIĘCZNIK POŚWIĘCONY CHEMII, TECHNOLOGII I PRZETWÓRSTWU POLIMERÓW

EDYTA MALINOWSKA-PAŃCZYK, KATARZYNA SZTUKA, ILONA KOŁODZIEJSKA^{*)}

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

Substancje o działaniu przeciwdrobnoustrojowym jako składniki biodegradowalnych folii z polimerów naturalnych

Streszczenie — Artykuł stanowi przegląd literaturowy dotyczący substancji dodawanych do folii wytworzonych z biodegradowalnych polimerów naturalnych, przeznaczonych do pakowania żywności, w celu nadania im właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Omówiono czynniki przeciwdrobnoustrojowe będące składnikami folii z naturalnych polimerów, takie jak: kwasy organiczne, enzymy i bakteriobiocyny a także, dodawane do opakowań otrzymywanych z polimerów syntetycznych, biobójcze srebro w postaci nanocząstek lub koloidu. Scharakteryzowano też, wykazujący działanie przeciwdrobnoustrojowe, naturalny polisacharyd chitozan wykorzystywany do produkcji opakowań żywności.

Słowa kluczowe: kwasy organiczne, enzymy, srebro, chitozan, właściwości przeciwdrobnoustrojowe, folie biodegradowalne.

ACTIVE ANTIMICROBIAL AGENTS AS COMPONENTS FOR NATURALLY OCCURRING BIODEGRADABLE POLYMERS

Summary — This paper constitutes a review of the literature on compounds added to the films made from naturally occurring biodegradable polymers in order to obtain antimicrobial properties in applications as food packaging materials. The activity in packaging materials of antimicrobial agents such as organic acids, enzymes and bacteriocins as components of films from naturally occurring polymers as well as of antimicrobial silver added to synthetic polymers in the form of nanoparticles and colloids has been discussed. Characteristic of the activity of the natural polysaccharide chitosan used in the packaging of foodstuff was also presented.

Key words: organic acids, enzymes, silver, chitosan, antimicrobial properties, biodegradable films.

Opakowania żywności nie tylko stanowią fizyczną barierę chroniącą produkt przed negatywnymi czynnikami środowiska, ale mogą także spełniać szereg dodatkowych funkcji. Opakowania takie, zwane opakowaniami aktywnymi, oddziałują na zapakowany produkt lub zmieniają

warunki wewnątrz opakowania przedłużając tym samym trwałość produktu i zapewniając utrzymanie jego dobrej jakości podczas przechowywania [1–6]. Materiały opakowaniowe będąc nośnikami substancji przeciwdrobnoustrojowych, zapachowych, barwników, witamin lub przeciwutleniaczy polepszają właściwości sensoryczne oraz uzupełniają wartość żywieniową opakowanego produktu.

^{*)} Autor do korespondencji; e-mail: ilona.kolodziejska@pg.gda.pl

Jednym z największych zagrożeń zdrowotnych i trwałości pakowanej żywności są drobnoustroje. Dlatego też wciąż prowadzi się badania skupione na poszukiwaniu nowych substancji ograniczających rozwój mikroorganizmów. Przeciwdrobnoustrojowe czynniki powinny się zaliczać do substancji uznanych za bezpieczne (*Generally Recognised As Safe* — GRAS). Mogą być one zarówno naturalne, jak i syntetyczne. W przypadku biodegradowalnych opakowań substancje do nich wprowadzane w celu nadania im właściwości przeciwdrobnoustrojowych nie mogą zmniejszać podatności na degradację zachodzącą pod wpływem czynników biologicznych [7–16].

Opakowania o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych uzyskuje się w wyniku wprowadzenia do matrycy polimerowej substancji o biologicznej aktywności, na drodze ich adsorpcji lub immobilizacji za pomocą wiązań kowalencyjnych lub jonowych. Jednocześnie realizuje się badania nad opracowaniem technologii produkcji biodegradowalnych opakowań opartych na wykazujących właściwości przeciwdrobnoustrojowe polimerach, takich jak np. chitozan [13, 15, 17]. Poniższy przegląd literatury przedstawia aktualny stan wiedzy na temat skuteczności oraz mechanizmu działania przeciwdrobnoustrojowych substancji, które mogą być wykorzystane do otrzymywania aktywnych opakowań z polimerów naturalnych.

KWASY ORGANICZNE

Kwasy organiczne od wielu już lat stosuje się do konserwowania żywności. Niektóre z nich mogą być wprowadzane do produktów żywnościowych celowo, np.: kwas octowy, sorbowy, *p*-aminobenzoowy, lub też mogą tworzyć się w produkcie w wyniku fermentacji pod wpływem mikroorganizmów, np. kwas mlekowy, propionowy bądź cytrynowy. WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) uznała te substancje za bezpieczne, można je też wykorzystać jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy w materiałach opakowaniowych. Sirugusa i Dickson [18] wykazali, że folie z alginianu wapnia zawierające kwas octowy i mlekowy zmniejszyły liczbę bakterii *Listeria monocytogenes* lub *E. coli* O157:H7 inokulowanych na powierzchni mięsa bydlęcego o ok. 2 rzędy wielkości. Kwasy sorbowy i *p*-aminobenzoowy obecne w jadalnych foliach z kazeiny również skutecznie hamowały wzrost na podłożu agarowym 4 szczepów *L. monocytogenes*, 3 szczepów *E. coli* O157:H7 oraz 5 szczepów *S. Typhimurium*.

Mechanizm działania kwasów organicznych polega na ich zdolności do penetracji błon komórkowych bakterii. Niezdysocjowane cząsteczki kwasu dysocjują wewnątrz komórki obniżając w ten sposób pH cytoplazmy do poziomu niższego niż granica tolerancji. Proces usuwania protonów z wnętrza komórki wymagający dużych nakładów energii powoduje zaburzenie metabolizmu i w konsekwencji śmierć komórki [19]. Aktywność bakte-

riobójcza kwasów rośnie wraz ze zmniejszającym się stopniem dysocjacji [20].

Kwasy organiczne wprowadzone do folii z naturalnych polimerów powoli przenikają ze struktury folii do produktu, a efektywność ich bakteriobójczego/bakteriostatycznego działania zależy od pH i aktywności wody zawartej w żywności, gdyż parametry te wpływają na stopień dysocjacji. Omawiana efektywność zależy również od temperatury. Ouattara i in. [21] wykazali, że obniżenie temperatury znacznie zmniejsza migrację kwasów octowego i propionowego z folii chitozanowych do środowiska. Przeciwdrobnoustrojowe folie z białek soi z dodatkiem kwasu jabłkowego są przedmiotem patentu [22].

ENZYMY I BAKTERIOCYN

Do wytwarzania opakowań aktywnych można także wykorzystać inne substancje o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, np. enzymy: lizozym, oksydazę glukozową lub peroksydazę [8, 10, 23, 24]. Immobilizację enzymów w wyniku tworzenia się wiązań jonowych lub kowalencyjnych warunkuje obecność odpowiednich grup funkcyjnych na powierzchni polimeru. Spośród wymienionych enzymów najszerzej stosowany jest lizozym. W przemyśle spożywczym używa się go m.in. w technologii produkcji serów dojrzewających jako czynnik hamujący wzrost bakterii fermentacji kwasu masłowego, natomiast w przemyśle farmaceutycznym i w medycynie stanowi on składnik aktywny preparatów wykorzystywanych w terapii i profilaktyce zakażeń bakteryjnych.

Lizozym

Według Duringa i in. [25] dwojakié działanie lizozymu na komórki mikroorganizmów zależy od postaci w jakiej się znajduje: natywnej lub zdenaturowanej. Niezdenaturowany lizozym przejawia aktywność enzymatyczną polegającą na oddziaływaniu z peptydoglikanem, które prowadzi do lizy ściany komórkowej lub, w przypadku komórek w fazie podziału, do hamowania jej biosyntezy. Bakterie gramujemne z reguły są odporne na działanie tego enzymu, ponieważ warstwa peptydoglikanu, będącego substratem dla lizozymu, jest w nich osłonięta zewnętrzną błoną zbudowaną z białek, lipopolisacharydów (LPS) i hydrofobowych peptydów. Zniszczenie bądź rozluźnienie tej zewnętrznej warstwy, np. przez kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) lub przez proteiny, zazwyczaj czyni bakterie gramujemne wrażliwe na działanie lizozymu. Przeciwdrobnoustrojowa, nieenzymatyczna aktywność lizozymu ujawnia się natomiast po jego denaturacji. Zmiany strukturalne enzymu zachodzące podczas cieplnej denaturacji wpływają nawet na zwiększenie jego bakteriobójczego działania [25, 26]. Przeciwdrobnoustrojowa aktywność zdenaturowanego lizozymu wiąże się z amfipatycznym charakterem jednego z czterech peptydów ($\alpha 4$), znajdujących się w C-końcu jego cząsteczki. Dzięki zmianom konforma-

cyjnym fragment ten wnika do wnętrza błon, gdzie dodatnio naładowane reszty jego aminokwasów oddziałują z ujemnie naładowanymi składnikami błon. W konsekwencji przebiegające reakcje prowadzą do uszkodzenia błon biologicznych i śmierci komórki.

Lizozym immobilizowany w foliach zarówno z octanu celulozy, jak i z polimerów naturalnych (np. zein z kukurydzy) umieszczonych w wodnej zawieszynie komórek *Micrococcus lysodeikticus* powodował ich całkowitą inaktywację [8, 27, 28]. Obecność lizozymu w ilości 10–133 mg/g folii z białek (zein) kukurydzy i białek sojowych, hamowała wzrost bakterii *Lactobacillus plantarum*, bez wpływu na inne właściwości funkcjonalne tych folii. Badane folie nie wykazywały podobnego działania wobec gramujemnych bakterii *Escherichia coli*, w przypadku których były aktywne dopiero po włączeniu w ich strukturę EDTA [10].

Z przedstawionych danych wynika, iż lizozym immobilizowany w foliach z polimerów naturalnych może skutecznie hamować wzrost bakterii, efekt zaś zależy od sposobu otrzymywania materiałów opakowaniowych [29]. Ze względu jednak na różną wrażliwość mikroorganizmów na działanie lizozymu badaniami powinno się objąć szerszą grupę mikroorganizmów, zwłaszcza patogenów i drobnoustrojów powodujących psucie produktów żywnościowych. Na aktywność enzymu dodatkowo mogą wpływać składniki żywności, pH, siła jonowa i temperatura przechowywania, zatem przed wprowadzeniem omawianych opakowań do żywności należy sprawdzić skuteczność przeciwdrobnoustrojowego działania folii w układach modelowych. Niestety w dostępnej literaturze doniesienia o tego typu badaniach są nieliczne i niepełne.

Laktoperoksydaza

Innym przeciwdrobnoustrojowym enzymem, o potencjalnym zastosowaniu w charakterze składnika aktywnych folii opakowaniowych z polimerów naturalnych jest laktoperoksydaza (LP). Stanowi ona jeden z naturalnych enzymów mleka i charakteryzuje się szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowej aktywności. Sposób oddziaływania LP na komórki mikroorganizmów jest całkowicie odmienny niż bakteriocyn bądź lizozymu. Laktoperoksydaza katalizuje reakcję utleniania tiocyjanianów (SCN^-) nadtlenkami prowadzącą do nietrwałych, reaktywnych związków (np. OSCN^-), które utleniają następnie wiele aktywnych biologicznie cząsteczek. Inaktywacja mikroorganizmów za pomocą laktoperoksydazy jest prawdopodobnie spowodowana utlenianiem enzymów i innych białek zawierających grupy tiolowe, w tym także znajdujących się w błonach komórkowych. W wyniku strukturalnych zmian zachodzących w błonie cytoplazmatycznej następuje wyciek z komórki, np. jonów K^+ , ATP oraz zahamowanie transportu składników odżywczych, takich jak glukoza i aminokwasy. Ze względu na to, iż do aktywacji laktoperoksydazy jest niezbędna obecność nadtlenu wodoru i tiocyjanianów

występujących w mleku, a niewystępujących w innych produktach, zastosowanie opakowań z tym enzymem może być ograniczone. Konieczność użycia tych niezbędnych do aktywacji enzymu związków w opakowaniach zawierających laktoperoksydazę zwiększa bowiem ryzyko przekroczenia ich dopuszczalnego stężenia w produkcji [30].

Bakteriocyny

Duże zainteresowanie ze względu na swoją przeciwdrobnoustrojową aktywność wzbudzają bakteriocyny – związki białkowe o masie molowej od kilku do kilkudziesięciu moli/g, wytwarzane przez wiele gatunków bakterii. Większość bakteriocyn działa jedynie na bakterie blisko spokrewnione z organizmami wytwarzającymi daną bakteriocynę, niemniej jednak, niektóre z nich wykazują także oddziaływanie antagonistyczne wobec bakterii niespokrewnionych z organizmami, które je wytwarzają [31].

Najlepiej poznaną bakteriocyną jest nizyna, wytwarzana przez szczep *Lactococcus lactis subsp. lactis.*, skutecznie niszcząca wiele gatunków bakterii gramododatnich i działająca jak kationowe związki powierzchniowo czynne. Uszkodzając błonę komórkową mikroorganizmów prowadzi bowiem do utraty przez nie, m.in. znacznych ilości jonów potasu oraz ATP. Dodatek nizyny do folii z polimerów naturalnych (z zein kukurydzy lub białek soi) oraz syntetycznych (np. z polietylenu) powodował zahamowanie wzrostu bakterii *L. plantarum*, *E. coli*, *L. monocytogenes* i *Salmonella Enteritidis* [10, 32–34].

W inaktywacji mikroorganizmów efektywna jest również pediocyna. Ming i in. [35] wykazali, że folie celulozowe z dodatkiem tej bakteriocyny były efektywniejsze w działaniu przeciwdrobnoustrojowym, np. wobec bakterii *L. monocytogenes* niż folie z nizyną. Obecność pediocyny w opakowaniu skutecznie hamowała wzrost tego szczepu inokulowanego na powierzchni mięsa indyczego, świńskiego lub bydłęcego, w ciągu 12 dób ich przechowywania w temp. 4 °C.

WYCIĄGI Z ROŚLIN

Wyciągi z roślin o przeciwdrobnoustrojowym działaniu już od wieków wykorzystywano w medycynie naturalnej jako substancje dezynfekujące. Aktywne związki znajdujące się w ekstraktach roślinnych to polifenole – drugorzędowe metabolity roślin z grupy fenoli zawierające grupy hydroksylowe przyłączone do pierścienia aromatycznego. Polifenole dzielą się na: kwasy fenolowe, ligniny, stilbeny, flawonoidy i pozostałe. Najlepiej poznaną grupę stanowią flawonoidy, do których zaliczamy: flawonole (np. quercetin i kaempferol), flawony, izoflawony, flawanony, antocyjanidyny (pigmenty odpowiedzialne za kolor większości owoców) oraz flawanole (np. katechiny). W roślinach pełnią one różnorodne funkcje, m.in. nadają barwę kwiatom, owocom i pestkom, chronią rośliny



nę przed niekorzystnym działaniem promieniowania UV, a także przed inwazją mikroorganizmów. Podczas ataku mikroorganizmów zwiększa się ilość tych związków w roślinach. Sposób przeciwdrobnoustrojowego działania polifenoli zależy od ich stężenia w środowisku. W przypadku niewielkich stężeń polifenole wchodzą w reakcje z białkami w błonie komórkowej oraz z lipidami, w wyniku czego błona traci swój półprzepuszczalny charakter. Następuje wyciek jonów i innych składników z komórki. Mikroorganizmy mające krótkotrwały kontakt z tymi związkami uruchamiają mechanizmy, dzięki którym nabywają na nie odporność. Długotrwałe działanie polifenoli lub oddziaływanie ich roztworów o większym stężeniu powoduje natomiast denaturację białek, w tym także enzymatycznych, i zaburzenia metabolizmu w komórkach bakterii prowadzące do ich śmierci [36].

Obecnie coraz szerzej prowadzone badania skupiają się na określeniu skuteczności polifenoli jako naturalnych substancji ograniczających rozwój mikroorganizmów w żywności [37, 38] oraz ich wykorzystaniu do otrzymywania materiałów opakowaniowych z naturalnych polimerów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Pewnym ograniczeniem jednak w zastosowaniu takich związków do żywności oraz opakowań może być ich zdolność do zmiany właściwości sensorycznych produktu żywnościowego.

Do folii z naturalnych polimerów dodaje się także ekstrakt z grejpfruta zawierający dużą ilość proantocyjanidyn (polimerów zbudowanych z cząsteczek katechin) oraz flawony i flawanony. Wykazują one działanie bakteriobójcze, przeciwwirusowe i przeciwpasożytnicze [16, 17, 39]. Na przykład folie z alginianu lub karagenu z dodatkiem ekstraktu z grejpfruta były aktywne wobec: *M. luteus*, *Listeria innocua*, *E. coli*, *S. aureus* [17]. Ku i in. [40] wykazali, że włączenie samych tylko katechin w strukturę folii otrzymanych z agarozy z czerwonych glonów powodowało zmniejszenie liczby komórek *E. coli* i *L. monocytogenes* inokulowanych na powierzchni wędlin odpowiednio o ok. 1,8 i 1,4 rzędu wielkości podczas przechowywania ich w ciągu 5 dób w temp. 4 °C. Większą aktywność przeciwdrobnoustrojową miały folie uzyskane z mieszaniny agarozy z glonów i żelatyny z dodatkiem 0,1 % ekstraktu z pestek grejpfruta (zawierającego głównie flawony i flawanony), gdyż zmniejszenie liczby komórek *E. coli* O157:H7 i *L. monocytogenes* odpowiednio o 2,1 i 3,3 rzędu wielkości następowało już po 1 h inkubacji w 37 °C.

Silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazuje, także będący wyciągiem roślinnym, olejek czosnkowy [13, 14]. Substancją aktywną tego olejku jest allicyna – naturalny antybiotyk. Stwierdzono, że folie z chitozanu lub białek serwatki z dodatkiem olejku czosnkowego działają bakteriobójczo na szczepy: *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *L. plantarum* oraz *Salmonella Enteritidis*. Nie zaobserwowano natomiast takiego efektu w przypadku folii z dodatkiem olejku rozmarynowego [14].

CHITOZAN

Chitozan to naturalny, nietoksyczny, polikationowy biopolimer. Jest kopolimerem zbudowanym z reszt *N*-acetylo-*D*-glukozaminy oraz *D*-glukozaminy, połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Chitozan stanowi główny składnik ściany komórkowej grzybów z klasy *Zygomycetes*, np. *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, jest również obecny w strukturach szkieletu zewnętrznego licznych bezkręgowców, w tym skorupiaków i owadów. Przemysłowo otrzymuje się go na drodze chemicznej *N*-deacetylacji chityny.

Ze względu na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe chitozan może być stosowany w postaci dodatku do produktu żywnościowego przedłużającego jego trwałość oraz jako składnik folii opakowaniowych [41–46]. Chitozan i jego pochodne wykazują silne działanie biobójcze wobec różnych grup mikroorganizmów – bakterii, grzybów i wirusów. W odróżnieniu od innych substancji przeciwdrobnoustrojowych, polimer ten jest aktywny wobec bakterii zarówno gramdodatnich, jak i gramujemnych. Właściwości chitozanu zależą od jego ciężaru cząsteczkowego, stopnia deacetylacji, stężenia, pH i składu środowiska, w którym się znajduje [47]. Istnieje kilka teorii dotyczących mechanizmu przeciwbakteryjnego działania tego polimeru. Jedną z nich opiera się na założeniu, że dodatkowo naładowane cząsteczki chitozanu łączą się ze ścianą komórkową mikroorganizmów poprzez kwasy teichojowe bakterii gramdodatnich lub fosfolipidy zewnętrznej osłony bakterii gramujemnych, zwiększając jej przepuszczalność, co prowadzi do wycieku składników wewnątrzkomórkowych. Chitozan ponadto wiąże wodę i metale niezbędne do życia komórki oraz hamuje aktywność niektórych enzymów [48]. Według Zheng i Zhu [49], polimery o dużym ciężarze cząsteczkowym (większym niż 48 500) tworzą na powierzchni komórek bakteryjnych błonę, przez którą składniki pokarmowe nie mogą przedostać się do komórki. Autorzy ci sugerują również, że chitozany o małym ciężarze cząsteczkowym (mniejszym niż 5 000) mogą przenikać do wnętrza komórki i oddziaływać z substancjami o ujemnym ładunku, przez co zaburzają metabolizm. Taki mechanizm, nieuwzględniający jednoczesnego uszkodzenia błony cytoplazmatycznej jest jednak mało prawdopodobny ze względu na polarny charakter cząsteczki chitozanu. Przy pH 7 chitozan traci swoje przeciwdrobnoustrojowe właściwości, w takich warunkach nie przebiega bowiem protonowanie jego grup aminowych, maleje także rozpuszczalność [41].

Coma i in. [50] wykazali, że folie z chitozanu o stopniu deacetylacji 98 % całkowicie hamowały wzrost bakterii *L. monocytogenes* i *S. aureus*, na podłożu agarowym podczas inkubacji przez 10 dób w temp. 37 °C, natomiast liczba kolonii *Pseudomonas aeruginosa* zmniejszyła się o ok. 75 %. Folie z chitozanu o stopniu deacetylacji 75 % sku-

tecnie hamowały wzrost na podłożu agarowym pleśni *Penicillium notatum* (ATCC 11625) i *Rhodotorula rubra* (CBS7014) [50].

Folie chitozanowe były również aktywne wobec bakterii *P. aeruginosa* inokulowanych na powierzchni sera ementaler. Po 12 h przechowywania w 37 °C liczba komórek tego szczepu zmniejszyła się o ok. 2,5 rzędu wielkości. W trakcie dalszego przechowywania, w ciągu 6 dni miał miejsce wzrost liczby tych bakterii, lecz ich liczba była ok. 2 rzędy wielkości mniejsza niż w próbach bez chitozanu [50].

SREBRO

Przeciwdrobnoustrojowe właściwości srebra wykorzystywano, m.in. do celów leczniczych już w starożytnej Grecji [51]. W dzisiejszych czasach, w wyniku dynamicznego rozwoju nanotechnologii stało się możliwe uzyskanie nanocząstek srebra o wymiarach rzędu kilku atomów. Optymalna wielkość cząstek nanosrebra ze względu na aktywność bakteriobójczą wynosi od 1,5 do 10 nm [52–54].

Srebro jest jednym z bardziej skutecznych, przeciwdrobnoustrojowych składników folii wytwarzanych z syntetycznych polimerów. Używa się je w postaci nanocząstek bądź w postaci koloidalnej. Warstwą nanosrebra pokrywa się, np. wnętrza lodówek i kartonowych opakowań soków, natomiast srebro koloidalne stosuje się jako dodatek bakteriobójczy do papieru przeznaczonego do pakowania produktów spożywczych, wytwarzanego przez Amerykańską firmę MicrobeGuard. Metoda produkcji polega na pokrywaniu powierzchni zwilżonego papieru jonami Ag^+ . Obecność srebra ma na celu zahamowanie rozwoju drobnoustrojów w powierzchniowych warstwach pakowanego produktu żywnościowego, co przedłuża jego trwałość [55].

Brakuje natomiast doniesień na temat bakteriobójczych właściwości srebra będącego składnikiem folii biodegradowalnych z naturalnych polimerów. Z naszych nieopublikowanych jeszcze danych wynika, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa srebra była znacznie mniejsza w inaktywacji bakterii w foliach z żelatyny rybnej niż w roztworach buforów.

Nanosrebro skutecznie hamuje wzrost i rozwój bakterii, jednak efektywność działania zależy od jego stężenia w roztworze oraz od rodzaju bakterii i budowy ich ściany komórkowej [56–58]. Bakterie gramdodatnie są bardziej odporne na działanie srebra niż bakterie gramujemne, a wynika to z różnicy w budowie ich ściany komórkowej [57]. Częściowe zahamowanie wzrostu bakterii *S. aureus* ATCC 25923 miało miejsce dopiero wówczas, gdy stężenie srebra wyniosło 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. W przypadku gramujemnych szczepów *E. coli* i *Salmonella* Typhi taki sam efekt występował już przy stężeniu 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Wpływ nanosrebra zależy również od kształtu jego cząstek występujących w roztworze [57]. W przypadku stosowania cząstek o trójkątnym kształcie (ściętym)

w stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wzrost populacji *E. coli* ATCC10536 został całkowicie zahamowany. Użycie nanocząstek sferycznych pozwoliło na uzyskanie takiego efektu dopiero, gdy stężenie srebra wynosiło 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, natomiast cząstki srebra w kształcie pałeczek oraz jony srebra (AgNO_3), nawet w stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, nie wywierały istotnego wpływu na te drobnoustroje.

Inną bakteriobójczą postacią srebra jest srebro koloidalne. Typowy produkt handlowy składa się w 90 % ze srebra jonowego i w 10 % z nanocząstek zawieszonych w dejonizowanej wodzie. Istnieją rozbieżności dotyczące efektywności działania srebra koloidalnego na mikroorganizmy. Różnice w uzyskanych przez różnych autorów danych, podobnie jak w przypadku nanosrebra, wynikają prawdopodobnie z różnej wrażliwości mikroorganizmów lub z rodzaju stosowanego preparatu srebra koloidalnego, a także z odmiennych warunków prowadzenia doświadczeń. Dodatkowo składniki pożywki mogą działać ochronnie na komórki drobnoustrojów, dzięki czemu srebro działa mniej efektywnie, a ponadto dostępne składniki odżywcze umożliwiają uruchomienie ewentualnych procesów naprawczych.

Mechanizm działania srebra na mikroorganizmy nie jest jeszcze dokładnie poznany [53, 56–58]. Lok i in. [59] wykazali, że zarówno cząstki nanosrebra, jak i jony srebra w podobny sposób oddziałują na komórki mikroorganizmów, jednak porównywalny efekt letalny uzyskuje się w przypadku cząstek nanosrebra o stężeniu na poziomie n-molowym a srebra jonowego na poziomie μ -molowym. W komórkach *E. coli* traktowanych srebrem jonowym (12 μM) oraz nanosrebrem (0,8 nM) następuje zmiana ekspresji białek. Wytwarzane są białka błonowe OmpA, OmpC, OmpF, OppA, MetQ oraz białka szoku termicznego (Hsp): IbpA, IbpB. Te dwa mechanizmy obronne uruchamiane w komórkach mających kontakt ze srebrem świadczą o tym, że oddziałuje ono na komórki na dwa, przebiegające jednocześnie sposoby [51].

Ekspresja białek błonowych w komórkach traktowanych srebrem dowodzi, że w tych warunkach zachodzą zmiany w błonach komórkowych. Prawdopodobnie w przypadku bakterii gramdodatnich jony srebra wiążą się z grupami fosfodiestrowymi kwasów tejchojowych oraz grupami karboksylowymi kwasu glutaminowego [60]. W komórkach bakterii gramujemnych, których ściana komórkowa nie zawiera kwasów tejchojowych [61], jony metali reagują z ujemnie naładowanymi grupami lipopolisacharydów oraz grupami karboksylowymi łańcuchów polipeptydowych zewnętrznej błony [62]. Poza tym kationy srebra Ag^+ reagują z grupami tiolowymi (-SH) białek powierzchniowych. Związanie jonów srebra ze ścianą komórkową lub błonami prowadzi do naruszenia tych struktur, utrudniając wymianę jonową z otoczeniem oraz powodując wpływ z wnętrza komórki, istotnych w prawidłowym jej funkcjonowaniu, metabolitów [56, 63].

Białka szoku termicznego powstają w komórkach mikroorganizmów poddawanych stresowi termicznemu

lub wówczas, gdy w komórce następuje nadekspresja białek heterologicznych. Lok i in. [59] sugerują, że być może komórka identyfikuje cząstki nanosrebra jako ciała wtrętowe i uruchamia analogiczny mechanizm obronny. Poparciem tej tezy są wyniki badań uzyskane przez Sondi i Salopek-Sondi [55], którzy za pomocą mikroskopii elektronowej stwierdzili, że nanosrebro „wchodzi” do komórek *E. coli*. Natomiast jony srebra transportowane są do wnętrza komórki i tam silnie wiążą się jako miękki kwas, z grupami zaliczanymi do miękkih zasad [57, 64]. W efekcie następuje utrata zdolności replikacyjnej DNA, zmiana konformacji komórkowych białek strukturalnych oraz inaktywacja enzymów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie wielu szlaków metabolicznych, m.in.: oksydazy cytochromowej oraz NADH-dehydrogenazy bursztynianowej, odpowiedzialnych za proces oddychania [56; 57; 65–67]. Takie naruszenie funkcji i struktury komórki prowadzi do jej śmierci.

Z powodu braku, w ścianach komórek zwierzęcych, białek o dużej zawartości reszt cysteiny oraz kwasów techojowych, kationy srebra nie mają możliwości transportu do wnętrza komórki. Fakt ten wyjaśnia wykazywanie właściwości toksycznych jonów Ag^+ tylko wobec komórek bakteryjnych lub wirusów. Dlatego też, według Hurst [54], jony srebra, działając według obu opisanych mechanizmów są mniej szkodliwe dla ludzi oraz zwierząt niż dla mikroorganizmów.

Oprócz pozytywnego i pożądanego wpływu wynikającego z obecności srebra, znane są również negatywne oddziaływania tego metalu na organizm ludzki. Nadmiar może np. powodować nekrozę tkanek wątroby oraz chorobę o nazwie Agryja, objawiającą się przebarwieniami skóry w postaci niebieskoszarych plamek oraz wysuszeniem błon śluzowych [67]. Odkładanie się srebra w organizmie może powodować również zaburzenia wzroku oraz inne choroby nerek i wątroby [51]. Największe dopuszczalne stężenie srebra w wodzie według Dz. U. z dnia 6 kwietnia 2007 r. wynosi 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Srebro nie jest zatem całkowicie bezpieczne dla zdrowia człowieka, w związku z tym jego zastosowanie jako czynnika przeciwdrobnoustrojowego w opakowaniach żywności powinno być ograniczone. Wprawdzie nanosrebro nie dyfunduje do środowiska żywności, ale w przypadku jego utlenienia jony srebra mogą przedostawać się z opakowania do produktu.

PODSUMOWANIE

Z powyższego przeglądu literatury wynika, że substancje przeciwdrobnoustrojowe wprowadzane w strukturę folii opakowaniowych z naturalnych, biodegradowalnych polimerów mogą skutecznie ograniczać wzrost lub inaktywować drobnoustroje w żywności. Siła ich przeciwdrobnoustrojowego działania zależy od wielu czynników: przede wszystkim od stopnia związania substancji przeciwdrobnoustrojowej z matrycą polimerową

oraz szybkości uwalniania substancji do środowiska pakowanej żywności. Niektóre substancje np. bakteriocyny są aktywne jedynie wobec wąskiej grupy mikroorganizmów i mogą znaleźć zastosowanie tylko w opakowaniach wybranych produktów żywnościowych. Dlatego też, nadal trwają poszukiwania substancji o większym spektrum przeciwdrobnoustrojowego oddziaływania, a jednocześnie nie zmieniających właściwości mechanicznych i barierowych opakowań.

LITERATURA

- [1] Weng Y-M., Chen M.: *Lebensm. Wiss. Technol.* 1997, **30**, 485. [2] Feldman M.: „Nowe tendencje w opakowaniu żywności” w pracy zbiorowej „Opakowania żywności”. Wyd.: Agro Food Technology, Czeladź, 1998, str. 952–959. [3] Scanel A., Hill C., Ross R.: *Int. J. Food Microbiol.* 2000, **64**, 151. [4] Conte A., Buonocore G. G., Sinigaglia M., Nobile M. A.: *J. Food Eng.* 2007, **78**, 741. [5] Nerin C., Tovar L., Salafranca J.: *J. Food Eng.* 2008, **84**, 313. [6] Coma V.: *Meat Sci.* 2008, **78**, 90. [7] Bower C. K., McGuire J., Daeschel M. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, **61**, 992. [8] Appendini P., Hotchkiss J. H.: *Packag. Technol. Sci.* 1997, **10**, 271. [9] Guilbert S., Cuq B., Gontard N.: *Food Add. Contamin.* 1997, **14**, 741. [10] Padgett T., Han I. Y., Dawson P. L.: *J. Food Prot.* 1998, **61**, 1330. [11] Devlignere F., Vermeiren L., Bockstal A., Debevere J.: *Acta Aliment.* 2000, **29**, 137. [12] Han J. H.: *Food Technol.* 2000, **54**(5), 56. [13] Pranoto Y., Rakshi S. K., Salokhe V. M.: *Lebensm. Wiss. Technol.* 2005, **38**, 859. [14] Seydim A. C., Sarikus G.: *Food Res. Int.* 2006, **39**, 639. [15] Sanjurjo K., Flores S., Gerschenson L., Jagus R.: *Food Res. Int.* 2006, **39**, 749. [16] Xu W-T., Huang K-L., Guo F., Qu W., Yang J-J., Liang Z-H., Luo Y-B.: *Postharvest. Biol. Technol.* 2007, **46**, 86. [17] Cha D. S., Chinnan M. S., Choi J. H., Park H. J.: *Lebensm. Wiss. Technol.* 2002, **35**, 715. [18] Sirugusa G. R., Dickson J. S.: *J. Food Safety* 1993, **13**, 147. [19] van Dam H.: *Pig Progress* 2006, **22**, 26. [20] Chichester D. F., Tanner F. W.: „Antimicrobial Food Additives” w pracy zbiorowej „CRC Handbook of Food Additives” (red. Furia T. E.), CRC Press LLC, str. 133. [21] Ouattara B., Simard R. E., Piette G., Bégin A., Holley R. A.: *J. Food Sci.* 2000, **65**, 768. [22] *Pat. US 7 160 580* (2007). [23] Wang C., Hsiue G.: *J. Appl. Polym. Sci.* 1993, **50**, 1141. [24] Garcia-Garibay M., Luna-Salazar A., Casas L. T.: *Food Biotech.* 1995, **9**, 157. [25] Düring K.: *FEBS Lett.* 1999, **449**, 93. [26] Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E., Michiels Ch.: *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **67**, 339. [27] Mecitoglu C., Yemencioğlu A., Arslanoğlu A., Elmacýc Z. S., Korela F., Çetind A. E.: *Food Res. Int.* 2006, **39**, 12. [28] Gucbilmez C. M., Yemencioğlu A., Arslanoğlu A.: *Food Res. Int.* 2007, **40**, 80. [29] Tylingo R., Mazur-Sandomierska A., Sadowska M.: *Polimery* 2008, **53**, 576. [30] Appendini P., Hotchkiss J. H.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 2002, **3**, 113. [31] Kalchayanand N., Frethem C., Dunne P., Sikes A., Ray B.: *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 2002, **3**, 33. [32] Hoff-



man K. L., Dawson P. L., Acton J. C., Han I. Y., Ogale A. A.: *Res. Dev. Act. Mil. Food Packag. Syst. Rep.* 1998, **50**, 238. [33] Hoffman K. L., Han I. Y., Dawson P. L.: *J. Food Prot.* 2001, **64**, 885. [34] Franklin N. B., Cooksey D. K., Getty K. J. K.: „IFT Annual Meeting-New Orleans” 2001, Louisiana, 73D-6. [35] Ming X., Weber G. H., Ayres J. W., Sandine W. E.: *J. Food Sci.* 1997, **62**, 413. [36] Petti S., Scully C.: *J. Dentistry* 2009, **37**, 413. [37] Roller S., Seedhar P.: *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, **35**, 390. [38] Raybaudi-Massilia R. M., Mosqueda-Melgar J., Martín-Belloso O.: *J. Food Prot.* 2006, **69**, 1579. [39] Oyelami O. A., Agbakwuru E. A., Adeyemi L. A., Adedeji G. B.: *J. Active Complement. Med.* 2005, **11**, 369. [40] Ku K.-J., Hong Y.-H., Song K. B.: *J. Food. Sci., C: Food Chem.* 2008, **73**, 217.

[41] Sudharshan N. R., Hoover D. G., Knorr D.: *Food Biotech.* 1992, **6**, 257. [42] Fang S., Li C., Shih D.: *J. Food Prot.* 1994, **56**, 136. [43] Tsai G.-J., Wu Z.-Y., Su W.-H.: *J. Food Prot.* 2000, **63**, 747. [44] Rhoades J., Roller S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **66**, 80. [45] Chatelet C., Damour O., Dornard A.: *Biomaterials* 2001, **22**, 261. [46] Chien P.-J., Chou C.-C.: *J. Sci. Food Agric.* 2006, **86**, 1964. [47] Rabea E. I., Badawy M., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W.: *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **4**, 1457. [48] Chung Y.-c., Su Y.-p., Chen Ch.-ch., Jia G., Wang H.-l., Wu J. C. G., Lin J.-g.: *Acta Pharmacol. Sin.* 2004, **25**, 932. [49] Zheng L.-Y., Zhu J.-F.: *Carbohydr. Polym.* 2003, **54**, 527. [50] Coma V., Deschamps A., Gros A.: *J. Food Sci.* 2003, **68**, 2788.

[51] Bugla-Płoskońska G., Leszkiewicz A.: *Kosmos* 2007, **56**, 115. [52] Aymonier C., Schlotterbeck U., Antonietti L., Zacharias P., Thomann R., Tiller J. C., Mecking S.: *Chem. Comm.* 2002, 3018. [53] Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T., Yacaman M. J.: *Nanotechnology* 2005, **16**, 2346. [54] Hurst K. M.: „Properties of silver nanoparticles” w pracy zbiorowej: „Characteristic and applications of antibacterial nano- silver” (red. Davis V.), Aburn University 2006, str. 1–25. [55] Żak J.: „Antybakteryjny”, Vidart 02, 2007, portal: http://www.vidart.com.pl/07_02/190_50.htm. [56] Sondi I., Salopek-Sondi B.: *J. Colloid Interface Sci.* 2004, **275**, 177. [57] Pal S., Tak Y. K., Song J. M.: *Environ. Microbiol.* 2007, **73**, 1712. [58] Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Dash D.: *Nanotechnology* 2007, **18**, 1. [59] Lok C.-N., Ho C.-M., Chen R., He Q.-Y., Yu W.-Y., Sun H., Tam P. K.-H., Chiu J.-F., Che C. M.: *J. Proteome Res.* 2006, **5**, 916. [60] Słaba M., Długoński J.: *Post. Mikrobiol.* 2002, **41**, 167.

[61] Virella G.: „Podstawy bakteriologii” w pracy zbiorowej: „Mikrobiologia i choroby zakaźne” (red. Heczko P.), Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner 2000, str. 7–9. [62] Chmielowski J., Kłapcińska B.: *Post. Mikrobiol.* 1984, **23**, 63. [63] Silver S.: *FEMS Microbiology Rev.* 2003, **27**, 341. [64] Hwang M. G., Katayama H., Ohgaki S.: *Water Res.* 2007, **41**, 4097. [65] Clement J. L., Jarrett P. S.: *Metal- Based Drugs* 1994, **1**, 467. [66] Samuel U., Guggenbichler J. P.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 2004, **23**, 75. [67] Irocha I. R., Esimone C. O., Orji J. O., Imomoh O. O.: *Sci. Res. Essay* 2007, **2**, 338.

Otrzymano 27 VII 2009 r.

Targi Międzynarodowe
Nr 1 na świecie w branży
tworzyw sztucznych
i kauczuku



k-online.de

Online Services +++ Targeted Search Functions +++
Products and Exhibitors +++ www.k-online.de/2410

Najważniejsze dla Ciebie targi na świecie!

Nadchodzi czas K, czyli 3 000 wystawców z ponad 50 krajów zaprezentuje najnowsze produkty i koncepcje, od standardów aż po najnowsze rozwiązania technologiczne. Pierwszorzędna oferta – zarówno ilościowo jak i jakościowo – sprawia, że K jest najważniejszą platformą biznesową dla wszystkich branż wykorzystujących tworzywa sztuczne i kauczuk. W 19 halach obecni będą wszyscy, którzy decydują o przyszłości branży – od tych wiodących na rynku po producentów niszowych.

Ty też bądź w Düsseldorfie – w miejscu, gdzie spotyka się światowa czołówka branż tworzyw sztucznych i kauczuku!

Przedstawicielstwo w Polsce:
A.S. Messe Consulting Sp. z o.o.
ul. Kazachska 1/57
02-999 Warszawa
tel. 0 22 855 24 90 - 92
fax: 0 22 855 47 88
e-mail: biuro@as-messe.pl
www.as-messe.pl

Basis for
Business


Messe
Düsseldorf