

Natalia Kordala

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Biotechnologii Żywności
e-mail: natalia.kordala@uwm.edu.pl

Włodzimierz Bednarski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Biotechnologii Żywności
e-mail: wlodzimierz.bednarski@uwm.edu.pl

Nanoemulsje roślinnych olejków eterycznych oraz ich zastosowanie w utrwalaniu żywności

STRESZCZENIE

Przedstawiono aktualny stan wiedzy o kierunkach i możliwościach stosowania roślinnych olejków eterycznych w utrwalaniu żywności. Zwrócono uwagę na mechanizm oddziaływania składników olejków eterycznych na mikroorganizmy patogenne oraz wskazano czynniki decydujące o ich skuteczności. W celu jej doskonalenia opisano procedury stosowane w przygotowaniu nanoemulsji olejów eterycznych. Podano przykłady metod ich otrzymywania oraz zastosowania w utrwalaniu żywności.

Słowa kluczowe: roślinne olejki eteryczne, nanoemulsje, utrwalanie żywności.

Wstęp

Z dostępnych informacji wiadomo, że corocznie wzrasta liczba zachorowań wywołanych zakażeniami mikrobiologicznymi żywności¹. Dotyczy to zarówno ludności w krajach uprzemysłowionych, jak i rozwijających się, są one często przyczyną znacznej liczby zgonów w krajach słabo rozwiniętych². Ogólna liczba bakteryjnych zatruc pokarmowych w Polsce w roku 2015 wyniosła 9493. Najwięcej zachorowań bakteryjnych nadal wywołanych jest odzwierzęcymi pałeczkami jelitowymi *Salmonella*. W 2015 r. odnotowano 8656 przypadków salmonelloz, w tym 8425 przebiegało pod postacią zakażenia pokarmowego. W zakresie zakażeń wywołanych przez pałeczki z rodzaju *Yersinia* obserwowany

¹ D. G. Newell i in., *Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge*, „Int. J. Food Microbiol.” 2010, nr 139, s. 3–15.

² K. Trojanowska, *Mikroorganizmy niepożądane w żywności i skutki ich oddziaływania* [w:] *Mikroorganizmy w żywności i żywieniu*, red. J. Gawęcki, Z. Libudzisz, Wydawnictwo AR w Poznaniu, Poznań 2006.

był spadek (z 215 przypadków w 2014 r. do 187 w 2015 r.), natomiast stabilizacji uległa liczba zatruc pokarmowych wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Campylobacter* (652 w 2014 r., 657 w 2015 r.)³.

Mikrobiologiczne zatrucia pokarmowe spowodowane są spożyciem swoistych bakterii lub ich toksyn. Występują one głównie w surowcach zwierzęcych. W mięsie zwierząt często obecne są takie patogeny jak: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7 (występują głównie w wołowinie), *Salomonella* spp. i *Listeria monocytogenes*. Znaczące ryzyko zatruc związane jest również ze spożyciem produktów przechowywanych w warunkach chłodniczych⁴.

Tradycyjne metody utrwalania żywności oparte głównie na procesach cieplnych pozwalają zapewnić mikrobiologiczne bezpieczeństwo żywności często za cenę niekorzystnego oddziaływania na właściwości żywieniowe i organoleptyczne. Między innymi dlatego ostatnio zwraca się uwagę na poszukiwanie i opracowanie nowych procedur oraz technik umożliwiających zmniejszenie zagrożeń mikrobiologicznych z uwzględnieniem zarówno bezpieczeństwa, jak i jakości utrwalanych produktów. Przykłady postępu dotyczą metod nietermicznych oraz możliwości ich łączenia ze stosowaniem dodatków z naturalnych składników aktywnych antymikrobiologicznie, co sprzyja⁵:

- poprawie efektów letalnych procesów nietermicznych,
- zmniejszeniu niekorzystnego oddziaływania ciepła na jakość utrwalanych produktów, np. poprzez skrócenie czasu niezbędnego do uzyskania wymaganego stopnia inaktywacji mikroorganizmów,
- utrzymaniu fizykochemicznych właściwości utrwalanych produktów,
- zminimalizowaniu niekorzystnego oddziaływania na ich wartość żywieniową.

W doborze naturalnych dodatków spełniających wyżej wymienione wymagania zwraca się uwagę na roślinne olejki eteryczne, zawierające związki o aktywności antymikrobiologicznej wobec bakterii patogennych i tzw. mikroflory resztkowej, pozostającej np. w mleku po pasteryzacji. Stosowanie olejków eterycznych jako dodatków utrwalających daje szansę produkcji żywności bez udziału konserwantów syntetycznych. Niestety upowszechnienie ich bezpośredniego stosowania jest utrudnione ze względu na słabą rozpuszczalność olejków w wodzie i konieczność stosowania dużych dawek, co niekorzystnie oddziałuje na właściwości sensoryczne utrwalanych produktów.

Efektywność stosowania olejków eterycznych w utrwalaniu żywności zależy między innymi od źródła ich pochodzenia, składu chemicznego i stopnia zdyspergowania⁶. Skuteczność antymikrobiologicznego oddziaływania składników olejków zależy także od rodzaju i gatunku drobnoustrojów patogennych. Na przykład bardziej odporne szczepy spotyka się wśród bakterii Gram(-), co związane jest z budową ściany komórkowej, bardziej hydrofilnej

³ Raport z cyklu *Stan sanitarny kraju w roku 2015*, Główny Inspektorat Sanitarny, www.gis.gov.pl, dostęp: 4.04.2017 r.

⁴ K. Trojanowska, op. cit.

⁵ R. Severino i in., *Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against Listeria innocua in green beans*, „Int. J. Food Microbiol.” 2014, nr 191, s. 82–88.

⁶ L. Salvia-Trujillo i in., *Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils*, „Food Hydrocolloid.” 2015, nr 43, s. 547–556.; G. Venkadesaperumal i in., *Anti-quorum sensing activity of spice oil nanoemulsions against food borne pathogens*, „LWT – Food Sci. Technol.” 2016, nr 66, s. 225–231.

niż bakterii Gram(+), u których ściany komórkowe zawierają składniki lipofilne, sprzyjające penetracji składników olejków do wnętrza komórek⁷.

Celem opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o antymikrobiologicznych składnikach olejków eterycznych, o procedurach ich pozyskiwania oraz doskonaleniu właściwości, ze szczególnym uwzględnieniem metod nanotechnologicznych.

Charakterystyka składu oraz właściwości olejków eterycznych

Olejki eteryczne są produktem ekstrakcji z roślin aromatyzujących, takich jak zioła lub przyprawy. Są one mieszaniną nielotnych i lotnych składników syntetyzowanych przez wyżej wymienione rośliny jako metabolity wtórne⁸. Zawartość olejków w większości znanych roślin, tzw. przyprawowych, mieści się w granicach 1–2%⁹. Są one powszechnie stosowane w produkcji żywności, farmaceutyków i kosmetyków. O ich atrakcyjności aplikacyjnej decydują właściwości aromatyzujące, antymikrobiologiczne i antyutleniające¹⁰. Aktywność antymikrobiologiczna olejków zależy od składu chemicznego, w tym głównie od zawartości fenoli, terpenów i aldehydów. Przykłady ich obecności w olejkach pozyskanych z niektórych znanych ziół i przypraw przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład wybranych olejków eterycznych (Chosen essential oils composition)

Źródło olejku	Składniki
Goździki	eugenol, octan eugenilu
Tymianek	tymol, p-cymen (4-izopropyltoluen)
Geranium	citronell, geraniol
Majeranek	4-terpineol, cis tujan-4-ol
Szałwia	kanfor, 1,8-cineol, eukaliptol, kamfen, octan sabinolu
Mięta	mentol
Oregano	sabinen, tlenek karafilenu, β-kariofilen

Źródło: opracowanie własne na podstawie Salvia-Trujillo i in., op. cit.

Znane są przykłady potwierdzające właściwości antymikrobiologiczne olejków. Olejek z *Origanum vulgare* (oregano) działa bakteriobójczo względem bakterii *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Yersinia enterocolitica*

⁷ A.A. Almadiya i in., *Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four Achillea species and their nanoemulsions against foodborne bacteria*, „LWT – Food Sci. Technol.” 2016, nr 69, s. 529–537.

⁸ L. Salvia-Trujillo i in., op. cit.; O.K. Topuz i in., *Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens*, „Food Chem.” 2016, nr 203, s. 117–223.

⁹ R. Amarowicz i in., *Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram*, „Eur. J. Lipid Sci. Technol.” 2009, nr 111, s. 1111–1117.; O. Kosakowska i in., *Ocena składu chemicznego olejku eterycznego dziko rosnących populacji lebidki pospolitej (Origanum vulgare L.)*, „Polish J. Agron.” 2013, nr 15, s. 60–64.

¹⁰ R. Amarowicz i in., op. cit.

oraz grzybów *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae* i *Aspergillus niger*¹¹. Olejek eteryczny z *Rosmarinus officinalis* (rozmaryn) jest aktywny w stosunku do bakterii z rodzajów *Shigella*, *Salmonella* oraz *Escherichia*¹². Ważnym monoterpem, który może być wykorzystany jako substancja przeciwbakteryjna, wydaje się być karwon, który wykazuje efektywne działanie wobec *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, a także *E. coli*¹³. Olejki eteryczne pochodzące z oregano i tymianku (odpowiednio OEO i TEO) zastosowano do przedłużenia wymaganej jakości mięsa jagnięcego pakowanego w modyfikowanej atmosferze (MAP, z ang. *modified atmosphere packaging*; MP1: 60% CO₂/40% N₂; MP2: 80% CO₂/20% N₂) w czasie przechowywania w temperaturze 4°C. Najlepsze rezultaty osiągnięto przy dodatku 0,1% TEO i w warunkach MP2. Umożliwiło to 3-krotne wydłużenie trwałości mięsa w porównaniu do próby kontrolnej, przy jednoczesnym braku zmian barwy i zapachu mięsa. Odnotowano również zmniejszenie liczby drobnoustrojów z 4,6 log jtk · g⁻¹ do 2,8 log jtk · g⁻¹ w 9. dniu przechowywania¹⁴.

Wykazano, że izomer tymolu (karwakrol), występujący w znacznych ilościach w olejkach eterycznych oregano i tymianku, wykazuje działanie antybakteryjne wobec bakterii *Salmonella* w mięsie i produktach mięsnych¹⁵, sałacie¹⁶ czy owocach pomidorów¹⁷.

Olejki eteryczne cechuje również działanie przeciwgrzybicze. Olejek z rozmarynu jest inhibitorem wzrostu grzybów pleśniowych, takich jak *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*, przy czym grzyby nitkowate są znacznie mniej wrażliwe niż grzyby drożdżoidalne. Olejek ten hamuje również rozwój drożdży z rodzaju *Candida*, np. *C. tropicalis*, *C. albicans* czy *C. krusei*¹⁸. Olejek otrzymany z szałwii działa na szerokie spektrum grzybów, między innymi na drobnoustroje należące do rodzajów *Candida*, *Saccharomyces*, *Fusarium* i *Aspergillus*. Ziele oregano natomiast zawiera do 3% olejku eterycznego, którego związki aktywne działają hamująco na wzrost grzybów *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae* i *Aspergillus niger*¹⁹.

Matan i in.²⁰ przetestowali olejek cynamonowy i goździkowy jako potencjalny środek kontrolujący mikroflorę produktów pakowanych w modyfikowanej atmosferze. Autorzy wykaza-

¹¹ C. Busatta i in., *Evaluation of Origanum vulgare essential oil as antimicrobial agent in sausage*, „Braz. J. Microbiol.” 2007, nr 38, s. 610–616.

¹² B. Bozin i in., *Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils*, „J. Agric. Food Chem.” 2007, nr 55, s. 7879–7885.

¹³ C. C. C. R. de Carvalho, M. M. R. da Fonseca, *Carvone: why and how should one bother to produce this terpene*, „Food Chem.” 2006, nr 95, s. 413–422.

¹⁴ I. Karabagias, A. Badeka, M. G. Kontominas, *Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging*, „Meat Sci.” 2011, nr 88, s. 109–116.

¹⁵ S. A. Burt i in., *Inhibition of Salmonella enterica serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapor*, „Int. J. Food Microbiol.” 2007, nr 119, s. 346–350.

¹⁶ G. T. Gunduz, S. A. Gonul, M. Karapinar, *Efficacy of oregano oil in the inactivation of Salmonella Typhimurium on lettuce*, „Food Control” 2010, nr 21, s. 513–517.

¹⁷ G. T. Gunduz, S. A. Gonul, M. Karapinar, *Efficacy of sumac and oregano in the inactivation of Salmonella Typhimurium on tomatoes*, „Int. J. Food Microbiol.” 2010, nr 141, s. 39–44.

¹⁸ K. A. Hammer, C. F. Carson, T. V. Riley, *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*, „J. Appl. Microbiol.” 2003, nr 95, s. 853–860.

¹⁹ I. Generalić Mekinić i in., *In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: a correlation study*, „Food Technol. Biotechnol.” 2014, nr 52(1), s. 119–127.

²⁰ N. Matan i in., *Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions*, „Int. J. Food Microbiol.” 2006, nr 107, s. 180–185.

li, że wraz ze wzrostem zawartości CO₂ (40%) i obniżeniem udziału O₂ (<0,05%) w modyfikowanej atmosferze zwiększeniu ulega hamujące działanie wymienionych olejków wobec mikroorganizmów. W tych warunkach wzrost *S. aureus* został opóźniony o 41 dni, *M. plumbeus* o 40 dni, *P. halophilus* o 38 dni, *P. roqueforti*, *C. lipolyticus*, *D. hansenii*, *Z. rouxii* i *P. membranaefaciens* o 30 dni, a *A. flavus* o 18 dni.

Korzystne wyniki można uzyskać, wprowadzając do opakowania (opakowanie aktywne) odpowiednio wkomponowane olejki eteryczne. Problem jednak stanowi właściwe dobranie dawki olejku lub ekstraktu celem uzyskania satysfakcjonujących cech funkcjonalnych (działanie antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe) przy jednoczesnym zachowaniu wymaganych właściwości fizycznych materiału opakowaniowego (rozciągliwość, barierowość, właściwości optyczne) i akceptacji konsumentów²¹. Hosseini i in.²² w badaniach stwierdzili, że dodatek olejku z oregano do polimerowej matrycy folii żelatynowo-chitozanej wpływał na zmniejszenie jej wytrzymałości na rozciąganie (TS, z ang. *tensile strength*). Odmienne wnioski przedstawili Ojagh i inni²³, którzy po wprowadzeniu do folii z chitozanu olejku cynamonowego odnotowali wzrost wartości parametru TS. Włączenie hydrofobowego olejku eterycznego do hydrofilowej matrycy polimerowej wpływa natomiast na poprawę barierowości folii względem pary wodnej²⁴.

Jak wykazano, podstawową wadą olejków eterycznych jako dodatków antymikrobiologicznych jest ich słaba rozpuszczalność w fazie wodnej matrycy żywnościowej, w której obecne są głównie organizmy patogenne²⁵. W celu uzyskania satysfakcjonującej skuteczności ich oddziaływania stosowane są względnie duże dawki, co nie zawsze jest akceptowalne przez konsumentów. Jedną z możliwości doskonalenia właściwości olejków jest ich dyspergowanie do postaci nanoemulsji.

Mechanizm antymikrobiologicznej aktywności składników olejków eterycznych

Specyficzny mechanizm antymikrobiologicznej aktywności składników olejków jest mało poznany oraz interpretowany w różny sposób. Głównie znacznie przypisuje się lipofilnym właściwościom olejków, sprzyjającym ich akumulacji w błonach komórkowych, a następnie zmianom w profilu kwasów tłuszczowych poprzez zmniejszenie udziału kwasów nienasyconych na rzecz nasyconych²⁶. Toksyczne działanie olejków eterycznych względem

²¹ L. Atarés, A. Chiralt, *Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging*, „Trends Food Sci. Tech.” 2016, nr 48, s. 51–62.

²² S.F. Hosseini, *Bio-based composite edible films containing Origanum vulgare L. essential oil*, „Ind. Crop Prod.” 2015, nr 67, s. 403–413.

²³ S.M. Ojagh i in., *Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water*, „Food Chem.” 2010, nr 122, s. 161–166.

²⁴ S.M. Ojagh i in., op. cit.; C. Pires i in., *Hake proteins edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties*, „Food Hydrocolloid.” 2013, nr 30, s. 224–231.

²⁵ V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, *Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage*, „Colloids Surf. B Biointerfaces.” 2014, nr 114, s. 392–397.

²⁶ R. Di Pasqua i in., *Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils*, „J. Agric. Food Chem.” 2007, nr 55, s. 4863–4870; F. Bakkali i in., *Biological effect of essential oils – a review*, „Food Chem. Toxicol.” 2008, nr 46, s. 446–475; F. Donsi i in., *Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier*, „J. Biotechnol.” 2012, nr 159, s. 342–350.

komórek eukariotycznych objawia się również koagulacją cytoplazmy, depolaryzacją błony mitochondrialnej, zaburzeniem funkcjonowania kanałów jonowych i niewydolnością bioenergetyczną. Z badań Ultee i in.²⁷ wynika, że cząsteczka karwakrolu, związku fenolowego obecnego w oregano, wnika w strukturę błony cytoplazmatycznej komórek, niszcząc ją i doprowadzając do wymiany grup hydroksylowych na inne. Wykazano również, że karwakrol w komórkach *E. coli* oddziałuje na błony cytoplazmatyczne i powoduje zmniejszenie liczby cząsteczek wewnątrzkomórkowego ATP, przy jednoczesnym zwiększeniu liczby cząsteczek zewnątrzkomórkowego ATP. W badaniach Landry i in.²⁸ potwierdzono skuteczne działanie bakteriobójcze nanoemulsji z udziałem karwakrolu wobec *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (ATCC BAA-1045) oraz wobec *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 42895), którymi zakażone były brokuły i marchew. Ich przemywanie roztworem z nanoemulsją karwakrolu (4000–6000 ppm) przez 60 minut doprowadziło do skutecznej inaktywacji wspomnianych patogenów.

Mechanizm antymikrobiologicznej aktywności limonenu, składnika olejków eterycznych, polega na jego destrukcyjnym działaniu na błony cytoplazmatyczne komórek bakterii, hamowaniu aktywności enzymów oddechowych i rozpraszaniu sił oddziaływania protonów²⁹.

W interpretacji mechanizmu bakteriobójczej aktywności olejków eterycznych znane są dwie teorie. Jedna z nich sugeruje, że składniki olejków wnikają do wnętrza ścian komórkowych bakterii, gdzie są uwalniane i działają od jej wewnętrznej strony. W drugiej zwraca się uwagę na znaczenie ich stałego stężenia w fazie wodnej komórek przez dłuższy okres czasu. Jest to szczególnie ważne z uwagi na słabą rozpuszczalność olejków w wodzie, co limituje ogólną zawartość składników antymikrobiologicznych oraz skuteczność ich bakteriobójczego oddziaływania. Ponadto zakłada się, że część tych składników może być wykorzystana przez drobnoustroje lub degradowana³⁰.

W charakterystyce mechanizmu oddziaływania olejków eterycznych należy również uwzględnić ich tendencję do wiązania się z hydrofilowymi składnikami żywności, co może wyraźnie pogorszyć ich bakteriobójczą aktywność³¹. W celu wyeliminowania tych niekorzystnych uwarunkowań antymikrobiologicznego działania olejków eterycznych w żywności proponuje się ich mikrokapsułkowanie, co poprawia ich rozpuszczalność i dyspergowanie w środowisku wodnym, eliminuje możliwość ich wiązania ze składnikami żywności oraz poprawia kontakt z komórkami bakterii. Znaczące są przykłady skutecznego mikrokapsułkowania olejków eterycznych lub ich składników w białkach i polisacharydach. Otrzymane emulsje wykazują korzystne właściwości antymikrobiologiczne związane z hydrofobowością i ładunkiem zdyspergowanych kropelek olejków³².

²⁷ A. Ultee, M. H. J. Bennik, R. Moezelaar, *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus*, „Appl. Environ. Microb.” 2002, nr 68, s. 1561–1568.

²⁸ K. S. Landry i in., *Effectiveness of a spontaneous carvacrol nanoemulsion against Salmonella enterica Enteritidis and Escherichia coli O157:H7 on contaminated broccoli and radish seeds*, „Food Microbiol.” 2015, nr 51, s. 10–17.

²⁹ J. Sikkema, J. A. M. Debont, B. Poolman, *Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes*, „J. Biol. Chem.” 1994, nr 269, s. 8022–8028.

³⁰ F. Donsi i in., op. cit.

³¹ R. Amarowicz i in., op. cit.

³² B. Shah, P. M. Davidson, Q. Zhong, *Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in bovine milk*, „Int. J. Food Microbiol.” 2013, nr 161, s. 53–59.

W dążeniu do poprawy aktywności antymikrobiologicznej olejków eterycznych stosuje się je w postaci nanoemulsji.

Metody otrzymywania oraz właściwości nanoemulsji

Obecnie wiadomo, że nanoemulsje (olej w wodzie) są dobrym nośnikiem związków antymikrobiologicznych w żywności. Ich korzystne właściwości związane są z minimalizowaniem średnicy kropeł emulsji. Sprzyja to ich migracji oraz przyłączaniu do ścian komórek bakterii i destabilizowaniu obecnej w nich frakcji lipidowej, a następnie łączeniu się ze składnikami wewnątrzkomórkowymi. Nanoemulsje otrzymuje się z zastosowaniem metod nisko- lub wysokoenergetycznych³³. W metodach niskoenergetycznych emulsje są tworzone spontanicznie, np. poprzez umieszczenie wszystkich składników (olej, woda, surfaktant lub kosurfaktant). Wielkość powstających kropeł jest zależna głównie od takich czynników jak skład emulsji oraz temperatura. Do wysokoenergetycznych metod zalicza się homogenizację wysokociśnieniową (około 100 MPa), mikrofluidyzację lub działanie ultradźwięków. Oddziaływanie wymienionych warunków sprzyja minimalizacji wielkości kropeł. W zależności od stosowanej techniki mieści się ona w granicach 60–600 nm³⁴.

Potwierdzeniem tych możliwości jest procedura opisana przez Almadiya i in.³⁵ Polegała ona na łączeniu olejku z wodą w stosunku 1:100, intensywnym mieszaniu (2400 rpm przez 5 min) z dodatkiem Tween 20 w ilości 0,5%, a następnie poddaniu działaniu wysokich ciśnień (około 300 MPa). Średnica kropeł w otrzymanej nanoemulsji wynosiła 65,8–144 nm, a układ był stabilny przez ponad 30 dni w warunkach chłodniczych.

Mikrofluidyzację zastosowali w swoich badaniach Salvia-Trujillo i in.³⁶ We wstępnym etapie doświadczenia otrzymano emulsję tzw. podstawową. W tym celu do wody (70°C) dodano alginian sodu oraz olejek eteryczny w ilości 1%. Całość mieszano (3400 rpm przez 2 min), a następnie otrzymaną emulsję poddano 3-krotnej mikrofluidyzacji przy ciśnieniu 150 MPa. Wielkość kropeł w otrzymanej nanoemulsji wyniosła 60–600 nm. O stopniu rozdrobnienia i dystrybucji olejku w nanoemulsji, jak wykazali autorzy, decydowały nie tylko warunki jej otrzymywania, ale także właściwości fizyczne olejku rzutuujące np. na jej lepkość.

Procedurę ultradźwiękową w przygotowaniu nanoemulsji przydatnej jako nośnik eugenolu, związku o aktywności antymikrobiologicznej, który występuje między innymi w bazylii, zastosowali Ghosh i in.³⁷. W przygotowaniu nanoemulsji zastosowano olej sezamowy, niejonowy surfaktant (Tween 20/Tween 80) i wodę. Stężenie oleju było stałe i wyniosło 6%. Procedura obejmowała dwa etapy. W pierwszym uzyskano tzw. emulsję podstawową, mieszając olej z surfaktantem i dodając wodę. Następnie otrzymaną emulsję traktowano ultradźwiękami o częstotliwości 20 kHz. Eugenol dodawano do fazy organicznej zawierającej olej sezamowy i Tween 80. Wykazano, że wielkość tworzonych kropeł mieściła się w granicach 13–191 nm i była zależna od proporcji olej–surfaktant, stężenia dodawanego eugenolu, od rodzaju surfaktantu i czasu emulgowania. Unieruchomiony w nanoemulsji eugenol

³³ V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, op. cit.

³⁴ Ibidem.

³⁵ A. A. Almadiya i in., op. cit.

³⁶ L. Salvia-Trujillo i in., op. cit.

³⁷ V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, op. cit.

zastosowano w utrwalaniu soku pomarańczowego zakażonego bakteriami *Staphylococcus aureus*. Skuteczność antybakteryjnego działania eugenolu przy jego stężeniu w soku na poziomie 0,3% była porównywalna z efektem działania benzoenu sodu przy tym samym stężeniu. Wykazano również, że zależała ona od czasu działania (6–72 h) oraz w niewielkim stopniu od temperatury (4°C lub 25°C).

Alternatywną propozycją stosowania eugenolu jest jego unieruchomienie w nanokapsułkach z koniugatu białek serwatkowych oraz maltodekstryn³⁸. Koniugaty produkowano na drodze reakcji Maillarda w procesie suszenia mieszaniny wyżej wymienionych białek i sacharydów. Otrzymane koniugaty zastosowano do przygotowania emulsji eugenolu rozpuszczonej w heksanie. Otrzymaną emulsję suszono metodą rozpyłową w celu usunięcia heksanu i uzyskania mikrocząstek o doskonałym zdyspergowaniu oleju, ułatwiającym dostępność składników antimikrobiologicznych w fazie wodnej utrwalanej żywności. Aktywność antimikrobiologiczną nanodyspergowanego eugenolu sprawdzono wobec bakterii *E. coli* oraz *L. monocytogenes*, namnażanych w mleku pełnym, 2-procentowym i odtłuszczonej oraz dla porównania w podłożu z hydrolizatu sojowego. Wykazano, że aktywność antimikrobiologiczna kapsułkowanego eugenolu wobec testowanych bakterii była różna i zależała od zawartości tłuszczu w mleku. Im wyższa jego zawartość, tym mniejsza skuteczność antimikrobiologiczna eugenolu.

Podsumowanie

Niepokojąco wzrasta liczba zachorowań spowodowanych zakażeniami mikrobiologicznymi żywności oraz antybiotykooporność niektórych patogenów. Według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) maleje liczba zatruc wywołanych pałeczkami z rodzaju *Salmonella*, natomiast odnotowuje się trend wzrostowy dla kamylobakterioz oraz zakażeń werotoksycznymi pałeczkami *E. coli*. W 2014 r. bakterie z rodzaju *Campylobacter* były przyczyną ponad 2,5-krotnie większej liczby zakażeń jelitowych niż bakterie *Salmonella* (236 851 przypadków wobec 88 715)³⁹. Dodatkowo obserwuje się niebezpieczną tendencję dotyczącą pojawiania się przypadków zatruc pokarmowych wywołanych nowymi, silnie patogennymi szczepami bakterii, które stanowią wyzwanie dla współczesnego systemu bezpieczeństwa żywności. Wymienione zjawiska uzasadniają potrzebę doskonalenia metod utrwalania żywności.

Postęp w tym zakresie dotyczy między innymi upowszechniania metod nietermicznych, np. pulsacyjnego pola elektrycznego, presuryzacji. W celu zminimalizowania stosowania chemicznych konserwantów zwraca się uwagę na stosowanie naturalnych dodatków o aktywności antimikrobiologicznej, np. roślinnych olejków eterycznych. W opracowaniu opisano mechanizm ich oddziaływania na komórki drobnoustrojów. Wskazano, że ich aktywność bakteriobójcza zależy głównie od stopnia zdyspergowania w środowisku. Jedną

³⁸ B. Shah, P.M. Davidson, Q. Zhong, *Encapsulation of eugenol using Maillard-type conjugates to form transparent and heat stable nanoscale dispersions*, „LWT – Food Sci. Technol.” 2012, nr 49, s. 139–148.

³⁹ EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014*, „EFSA J.” 2015, nr 12, s. 4329.

z możliwości doskonalenia tej właściwości jest stosowanie procedur nanotechnologicznych. W pracy przedstawiono metody otrzymywania nanoemulsji olejków eterycznych, opisano ich właściwości oraz podano przykłady zastosowania w utrwalaniu żywności.

Literatura

- Almadiya A.A., Nenaaha G.E., Al Assiutyc B.A., Moussa E.A., Mira M.N., *Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four Achillea species and their nanoemulsions against foodborne bacteria*, „LWT – Food Sci. Technol.” 2016, nr 69, s. 529–537.
- Amarowicz R., Żegarska Z., Rafałowski R., Pegg R.B., Karamać M., Kosińska A., *Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram*, „Eur. J. Lipid Sci. Technol.” 2009, nr 111, s. 1111–1117.
- Atarés L., Chiralt A., *Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging*, „Trends Food Sci. Tech.” 2016, nr 48, 51–62.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., *Biological effect of essentials oils – a review*, „Food Chem. Toxicol.” 2008, nr 46, s. 446–475.
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E., *Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils*, „J. Agric. Food Chem.” 2007, nr 55, s. 7879–7885.
- Burt S.A., Fledderman M.J., Haagsman H.P., van Knapen F., Veldhuizen E.J.A., *Inhibition of Salmonella enterica serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapor*, „Int. J. Food Microbiol.” 2007, nr 119, s. 346–350.
- Busatta C., Mossi A.J., Rodrigues M.R.A., Cansian R.L., de Oliveira J.V., *Evaluation of Origanum vulgare essential oil as antimicrobial agent in sausage*, „Braz. J. Microbiol.” 2007, nr 38, s. 610–616.
- Carvalho de C.C.C.R., da Fonseca M.M.R., *Carvone: why and how should one bother to produce this terpene*, „Food Chem.” 2006, nr 95, s. 413–422.
- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G., *Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils*, „J. Agric. Food Chem.” 2007, nr 55, s. 4863–4870.
- Donsì F., Annunziata M., Vincenzi M., Ferrari G., *Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier*, „J. Biotechnol.” 2012, nr 159, s. 342–350.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014*, „EFSA J.” 2015, nr 12, s. 4329.
- Generalić Mekinić I., Skroza D., Ljubenković I., Šimat V., Možina S.S., Katalinić V., *In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: a correlation study*, „Food Technol. Biotechnol.” 2014, nr 52(1), s. 119–127.
- Ghosh V., Mukherjee A., Chandrasekaran N., *Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage*, „Colloids Surf. B Biointerfaces.” 2014, nr 114, s. 392–397.

- Gunduz G. T., Gonul S. A., Karapınar M., *Efficacy of oregano oil in the inactivation of Salmonella Typhimurium on lettuce*, „Food Control” 2010, nr 21, s. 513–517.
- Gunduz G. T., Gonul S. A., Karapınar M., *Efficacy of sumac and oregano in the inactivation of Salmonella Typhimurium on tomatoes*, „Int. J. Food Microbiol.” 2010, nr 141, s. 39–44.
- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V., *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*, „J. Appl. Microbiol.” 2003, nr 95, s. 853–860.
- Hosseini S. F., Rezaei M., Zandi M., Farahmandghavi F., *Bio-based composite edible films containing Origanum vulgare L. essential oil*, „Ind. Crop Prod.” 2015, nr 67, s. 403–413.
- Karabagias I., Badeka A., Kontominas M. G., *Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging*, „Meat Sci.” 2011, nr 88, s. 109–116.
- Kosakowska O., Bączek K., Geszprych A., Węglarz Z., *Ocena składu chemicznego olejku eterycznego dziko rosnących populacji lebidki pospolitej (Origanum vulgare L.)*, „Polish J. Agron.” 2013, nr 15, s. 60–64.
- Landry K. S., Micheli S., McClements D. J., McLandsborough L., *Effectiveness of a spontaneous carvacrol nanoemulsion against Salmonella enterica Enteritidis and Escherichia coli O157:H7 on contaminated broccoli and radish seeds*, „Food Microbiol.” 2015, nr 51, s. 10–17.
- Matan N., Rimkeeree H., Mawson A. J., Chompreeda P., Haruthaithanasan V., Parker M., *Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions*, „Int. J. Food Microbiol.” 2006, nr 107, s. 180–185.
- Newell D. G., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Opsteegh M., Langelaar M., Threlfall J., Scheutz F., van der Giessen J., Kruse H., *Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge*, Int. „J. Food Microbiol.” 2010, nr 139, s. 3–15.
- Ojagh S. M., Rezaei M., Razavi S. H., Hosseini S. M. H., *Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water*, „Food Chem.” 2010, nr 122, s. 161–166.
- Pires C., Ramos C., Teixeira B., Batista I., Nunes M. L., Marques A., *Hake proteins edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties*, „Food Hydrocolloid.” 2013, nr 30, s. 224–231.
- Raport z cyklu Stan sanitarny kraju w roku 2015, Główny Inspektorat Sanitarny, www.gis.gov.pl.
- Salvia-Trujillo L., Rojas-Graü A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O., *Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils*, „Food Hydrocolloid.” 2015, nr 43, s. 547–556.
- Severino R., Vu K. D., Donsì F., Salmieri S., Ferrari G., Lacroix M., *Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against Listeria innocua in green beans*, „Int. J. Food Microbiol.” 2014, nr 191, s. 82–88.
- Shah B., Davidson P. M., Zhong Q., *Encapsulation of eugenol using Maillard-type conjugates to form transparent and heat stable nanoscale dispersions*, „LWT – Food Sci. Technol.” 2012, nr 49, s. 139–148.

- Shah B., Davidson P.M., Zhong Q., *Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in bovine milk*, „Int. J. Food Microbiol.” 2013, nr 161, s. 53–59.
- Sikkema, J., Debont, J.A.M., Poolman, B., *Interactions of cyclic hydrocarbons with biological-membranes*, „J. Biol. Chem.” 1994, nr 269, s. 8022–8028.
- Topuz O.K., Özvural E.B., Zhao Q., Huang Q., Chikindas M., Gölükçü M., *Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens*, „Food Chem.” 2016, nr 203, s. 117–223.
- Trojanowska K. *Mikroorganizmy niepożądane w żywności i skutki ich oddziaływania* [w:] Gawęcki J., Libudzisz Z., *Mikroorganizmy w żywności i żywieniu*, Wydawnictwo AR w Poznaniu, Poznań 2006.
- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus*, „Appl. Environ. Microb.” 2002, nr 68, s. 1561–1568.
- Venkadesaperumal G., Rucha S., Sundar K., Shetty P.H., *Anti-quorum sensing activity of spice oil nanoemulsions against food borne pathogens*, „LWT – Food Sci. Technol.” 2016, nr 66, s. 225–231.

SUMMARY

Natalia Kordala, Włodzimierz Bednarski

Plant essential oils nanoemulsions and their application in food preservation

The article describes the current state of knowledge on directions and possibilities of the use of plant essential oils in food preservation. Attention is drawn to the mechanism of action of essential oils components on pathogenic microorganisms and indication of the factors in determining their effectiveness. An overview of the procedures used in the preparation of essential oils nanoemulsions is provided. The examples of methods for their preparation and use in food preservation are also presented.

Key words: plant essential oils, nanoemulsions, food preservation.

Data wpływu artykułu: 11.01.2017 r.

Data akceptacji artykułu: 27.03.2017 r.