



ÜLEVAADE TAIMSETE LISANDITE ANTIMIKROOBSE TOIME UURINGUTEST IN VITRO JA TOORETES SEAHAKKLIHATOODETES

OVERVIEW OF STUDIES ON THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF PLANT ADDITIVES IN VITRO AND IN RAW MINCED PORK PRODUCTS

Kadrin Meremäe, Julia Koskar, Tõnu Püssa, Piret Raudsepp, Dea Anton, Mati Roasto

Eesti Maailikool, veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut, veterinaarse biomeditsiini ja toiduhügieeni õppetool,
Fr. R. Kreutzwaldi 56/3, 51014 Tartu

Saabunud:
Received: 15.09.2022

Aktsepteeritud:
Accepted: 17.06.2023

Avaldatud veebis:
Published online: 15.08.2023

Vastutav autor:
Corresponding author: Kadrin Meremäe

E-mail: kadrin.meremae@emu.ee

ORCID:

0000-0002-8616-9581 (KM)
0000-0001-8686-443X (JK)
0000-0002-3461-7805 (TP)
0000-0002-9447-1895 (PR)
0000-0002-6113-5342 (DA)
0000-0002-7835-0647 (MR)

Keywords: foodborne pathogens, total microbial counts, plant extracts and powders, antimicrobial activity, raw minced pork products.

DOI: 10.15159/jas.23.07

ABSTRACT. Plant additives can be used in food technologies as natural additives to replace synthetic food additives partially or completely. The present work aims to give an overview of studies that have been carried out over the years 2011–2019 in the Department of Food Hygiene and Safety at the Estonian University of Life Sciences on the antimicrobial activity of plant additives *in vitro* as well as in raw minced pork products in the perspective to find effective candidates to use them further in meat products. The findings of the *in vitro* studies showed that the strongest bacterial growth inhibition was observed in the 96% ethanol extracts of rhubarb root and petiole as well as berries of blackcurrant and chokeberry. In the present *in vitro* study, plant extracts had the strongest antimicrobial activity against *Campylobacter jejuni*. In raw minced pork studies, the total microbes as well as yeasts and molds were inhibited in raw minced pork samples only in the presence of powders of rhubarb petioles and tomato or their mixture. In conclusion, this work revealed that powders of rhubarb, tomato and berries of blackcurrant and chokeberry are perspective candidates for inhibiting microbial growth in raw minced pork products.

© 2023 Akadeemiline Põllumajanduse Selts. | © 2023 Estonian Academic Agricultural Society.

Sissejuhatus

Toidus võib leiduda erinevaid mikroorganisme, mis mõjutavad toidu ohutust, kvaliteeti ja säilimisega. Mikroorganismidest võivad toidus esineda nii inimese tervisele kasulikud bakterid (nt mõned *Lactobacillus*'e ja *Bifidobacterium*'i liigid) kui ka toidu kvaliteeti halvendavad ja rikkemist esile kutsuvad mikroobid (nt suur osa hallitus- ja pärmseentest, piimhappebakterid ja pseudomonased) (Roasto, 2019). Samuti võivad toidu tootmise, töötlemise ja tarbimise ahelas esineda toidupatogeeneid nagu *Salmonella enterica* (Kuus jt, 2021), *Listeria monocytogenes* (Koskar jt, 2019), *Campylobacter* spp. (Mäesaar jt, 2014; 2018), *Escherichia coli* O157:H7 (Kramarenko jt, 2016) jt, mis toitu sattudes

on terviseriskiks inimestele. Seepärast kasutatakse toidu tootmisel ka sünteetilisi toidu lisaaineid sh säilitusaineid, et tagada toidu kvaliteet ja ohutus ning säilimisega (Amit jt, 2017).

Paljud tarbijad soovivad sünteetiliste toidu lisaainete asendamist tervisele ohutumate looduslike alternatiividega, nt toidu riknemist pidurdavate taimsete lisanditega (Lorenzo jt, 2018). Taimse päritoluga lisandid toidus omavad tähtsust ka tervise tugevdamises ja krooniliste haiguste ennetamises (Prakash jt, 2017). Sünteetiliste lisaainete osaliseks või täielikuks asendamiseks ja/või efektiivsete funktsionaalsete toitade tootmiseks on võimalik kasutada taimedest, taimeosadest või nende tootmisjääkidest pärinevaid sobilike omaduste ja kasutusvõimalustega lisandeid (Pisoschi jt, 2018).



Viimase kümnendi jooksul on läbi viidud arvukaid uuringuid määramaks erinevate Eesti päritolu taime liikide (mustsõstar, rabarber, tomat, aroonia, mustikas, astelpaju, söödav kuslapuu, pihlakas, sibul, küüslauk jt) antimikroobseid ja antioksüdantseid omadusi (Raudsepp jt, 2013; Anton jt, 2014; Raudsepp jt, 2019; Anton jt, 2019; avaldamata andmed). Kõigis neis traditsioonilistes toidutaimedes leidub vähemal või rohkemal määral fütokeemikaale, nt polüfenoolseid, sh flavonoidide rühma kuuluvaid ühendeid, millel on tuvastatud nii antimikroobseid, antioksüdantseid kui ka farmakoloogilisi toimeid (Pisoschi jt, 2018; Lorenzo jt, 2018). Paljudes *in vitro* uuringutes (Berköz jt, 2017; Gonelimali jt, 2018; Mostafa jt, 2018; Sima jt, 2018) on taimsetel lisanditel tuvastatud antimikroobne toime toidu riknemist esile kutsuvate mikroobide ja toidupatogeenide suhtes.

Taimsete lisanditena sobivad kasutamiseks eeskätt need, mis sisaldavad rikkalikult polüfenoolseid ühendeid ja suudavad pärssida ka mikroobide kasvu ja seeläbi tagada optimaalse toidu säilimisaja, soodustada või säilitada kasulike piimhappebakterite elutegevust ning tõsta toidu tervislikkust (Bouarab-Chibane jt, 2019; Oulahal, Degraeve, 2022). Kõikidele ootustele vastavaid taimseid lisandeid, mis omaksid soovitavaid tulemusi nii *in vitro* kui ka toidumaatriksitega läbiviidavates katsetes, on aga keeruline leida.

Käesoleva töö eesmärgiks on koondada viimase kümnendi jooksul Eesti Maaülikooli toiduhügieeni ja -ohutuse uurimisgrupis läbi viidud teadusuuringute olulisemad tulemused, et anda ülevaade Eesti päritolu taimsete lisandite või nende kombinatsioonide antimikroobsest mõjust erinevatele mikroorganismidele *in vitro* ja toretes seahakklihatoodetes.

Materjal ja meetodika

Taimne materjal

Aastatel 2011–2019 teostati kolm mahukat katse seeriat (I–III). Esimesse uuringusse (I) kaasati taimsest materjalist tomati (*Lycopersicon esculentum* Mill.) viljad, mustika (*Vaccinium myrtillus* L.) marjad, astelpaju (*Hippophae rhamnoides* L.) marjad, musta sõstra (*Ribes nigrum* L.) marjad ja lehed, söödava kuslapuu (*Lonicera caerulea* L.) marjad ning rabarberi (*Rheum rhaponticum* L.) juured ja varred. Teise uuringusse (II) võeti rabarberi (*Rheum rhaponticum* L.) juured ja varred; mustsõstra (*Ribes nigrum* L.) marjad ja lehed, aroonia (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) ja söödava kuslapuu (*Lonicera caerulea* L. var. *edulis*) marjad.

I ja II uuringus läbi viidud taimsete materjalide ettevalmistust on kirjeldatud Raudsepp jt (2013; 2019) uuringus. Uuringuteks vajaminevad taimede vesiekstraktid valmistati dekoktsiooni meetodil (Bisset, Wichtl, 1994). Lisaks uuriti taimeekstraktide mõju valitud mikroorganismide suhtes 96, 30 ja 20% etanooliekstraktides.

Kolmandas uuringus (III) kasutatud taimseks materjaliks olid rabarberi (*Rheum rhaponticum* L.) juured ja varred; mustsõstra (*Ribes nigrum* L.) marjad ja lehed, tomati (*Lycopersicon esculentum* Mill.) viljad ning

aroonia (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) ja söödava kuslapuu (*Lonicera caerulea* L. var. *edulis*) marjad. Mikroobide kasvu pärssivate toimete uurimiseks valmistati taimsetest materjalidest pulbrid või pulbrite segud, millest on lähemalt antud ülevaade Anton jt (2019) artiklis.

Mikroorganismid

Taimeekstraktide antimikroobseid toimeid *in vitro* uuriti järgmiste Gram-positiivsete (G+) bakterite *Bacillus subtilis* (BGA), *Bacillus pumilus* (CV 607), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *Bifidobacterium bifidum* (Bb12), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), ja Gram-negatiivsete (G-) bakterite *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (NCCB 100282), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Yersinia ruckeri* (NCIM 13282) ja *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291) suhtes (uuring I, II).

Mikrobioloogilisteks uuringuteks külvati bakterid väljakasvuks mitteselektiivsetele agarsöötmetele, mida on lähemalt kirjeldatud Raudsepp jt (2013 ja 2019) uuringutes. Seejärel võeti 1 µl bakterimassi ja inkubeeriti 37 °C juures 20 tundi Mueller Hinton (Oxoid, Basingstoke, UK) puljongis baktersistensiooni (10⁶ pesa moodustavat ühikut milliliitris, pmü ml⁻¹) saamiseks.

In vitro katsetele järgnesid taimsete lisanditega rikastatud torete seahakklihatoodete uuringud aeroobsete mesofiilsete mikroorganismide ning hallitus- ja pärmseente arvukuse dünaamika uurimiseks määratletud säilimisaja jooksul (uuring III).

Antimikroobse toime uuringud *in vitro*

Taimeekstraktide antimikroobse toime väljaselgitamiseks kasutati agar-kaevu difusiooni meetodit (uuring I, II), mida on lähemalt kirjeldatud Raudsepp jt (2013) uuringus. Selleks kanti eelmääratletud kontsentratsiooniga baktersistensioon Mueller Hintoni agarile. Seejärel, aseptilisi võtteid kasutades, lõigati agarisse 6 mm läbimõõduga süvendid, mis täideti 30 µl lahjendusega (1:20 m v⁻¹) taimeekstraktide või kontrolllahusega. Positiivse kontrollina kasutati klooramfenikooli (1 mg ml⁻¹, LAB M) ja negatiivseteks kontrollideks olid fosfaatpuhver (pH 7) ja etanool. Seejärel inkubeeriti Petri tase bakteritüvedele optimaalsetel kasvu (37 °C või 42 °C juures) 24 tunni jooksul. Antimikroobset toimet näitas süvendi ümber tekkinud bakterite kasvu täielikult pärssinud tsoon, mille diameeter (d) mõõdeti millimeetrites (mm). Analüüsid viidi läbi kahes korduses.

Antimikroobse toime uuringud toretes seahakklihatoodetes

Mikroorganismide loendamiseks kasutati EVS-EN ISO 4833-2:2013 ning hallitus- ja pärmseente loendamiseks EVS-ISO 21527-1:2009 standardeid (uuring III). Katseproovide, algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste ettevalmistamisel mikrobioloogilisteks uuringuteks lähtuti standardist EVS-EN ISO 6887-2:2017.

Katseseeriade läbiviimiseks kaaluti steriilsesse stomahher kotti 10 grammi proovimaterjali, millele valati 90 ml steriilset peptonvedelikku ning loksutati stomahheris (Stomacher[®] 400 Circulator, Seward, UK)

ühe minuti jooksul. Valmislahust kasutati nii aeroobsete mesofiilsete mikroorganismide kui hallituste ja pärmide üldarvu määramiseks. Mikroorganismide loendamiseks kasutati Plate Count Agarit (PCA, Lancashire, UK) ning hallitus- ja pärmseente loendamiseks Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agarit (DRBC, Lancashire, UK). PCA plaatidele kanti vastava lahjendusega uurimismaterjali 100 µl, DRBC plaatidele 1 ml. PCA plaate inkubeeriti 30 °C 72 tundi ja DRBC plaate 25 °C 5 päeva. Pärast inkubeerimist kolooniad loendati ja tulemused väljendati pmü arvuga kümnendlogaritmidest grammi toote kohta (log pmü g⁻¹). Katsetes uuritud tooreid seahakklihatoodete proove säilitati külmikus +4...+6 °C juures ning neis sisalduvate mikroorganismide arvukusi loendati 0., 2., 4. ja 6. päeval. Analüüsid viidi läbi kahes korduses.

Statistiline analüüs

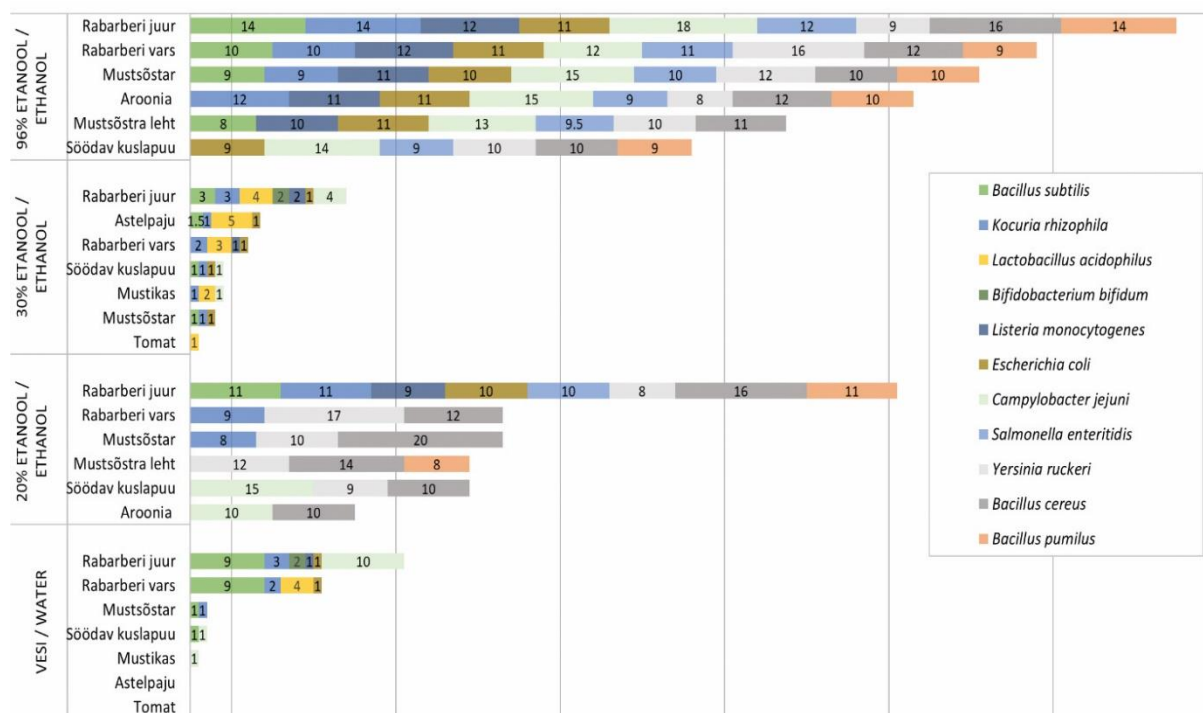
Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati mikroorganismide arvukuse paralleelproovide keskmiseid väärtuseid ning võrdlus toimus kontrollprooviga (toores

seahakkliha) 0. päev *versus* katse viimane päev. Mikroorganismide loendamisel kogutud andmete statistiliseks töötlemiseks kasutati Microsoft Office Excel programmi. Taimseid lisandeid sisaldavates tootes seahakklihatoodetes ja kontrollproovides leiduvate mikroorganismide keskmiste arvukuste ± standardhälve (SD) võrdlemiseks kasutati t-testi. Tulemus loeti statistiliselt oluliseks kui p-väärtus < 0,05.

Tulemused

Antimikroobse toime uuringud *in vitro* katsetes

Uuringud I–II keskendusid bakterite antimikroobset toimet omavate taimeekstraktide (1:20 m/v) otsingutele, et võrrelda rabarberi (juure ja varre), mustsõstra (marja ja lehe), söödava kuslapuu, aroonia ja astelpaju marjade ning tomati antimikroobset toimet *in vitro*. Erineva kontsentratsiooniga etanooliekstraktide võrdluses avaldus taimsete lisandite antimikroobne mõju enim 96% etanooliekstraktides (joonis 1).



Joonis 1. Taimeekstraktide (1:20 m/v) antimikroobse toime G(+) ja G(-) bakteritele (n = 11) mõõdetuna inhibeerimistsooni diameetrites (mm).

Figure 1. Antimicrobial activity of plant ethanol (96%, 30%, 20%; 1:20 w/v) and water infusions against bacteria (n = 11) in inhibition zones (mm): Rabarberi juur / Rhubarb root; Rabarberi vars / Rhubarb petiole; Mustsõstar / Blackcurrant berry; Aroonia / Chokeberry berry; Mustsõstra leht / Blackcurrant leaf; Söödava kuslapuu / Blue honeysuckle berry; Mustikas / Bilberry; Astelpaju / Sea buckthorn berry; Tomat / Tomato

Kõige tugevam antimikroobne toime ilmnes rabarberi juure ja varre puhul, kui täheldati üheteistkümnest testitud bakteriliigist üheksa puhul (sh nii Gram-positiivsete (G+) kui -negatiivsete (G-) bakterite) kasvu pidurdumist. Suurimad inhibeerimistsoonid mõõdeti rabarberi juure 96% etanooliekstrakti bakterite *C. jejuni* (d = 18 mm), *B. cereus* (d = 16 mm), *B. subtilis* (d = 14 mm), *K. rhizophila* (d = 14 mm) ja *B. pumilus* (d = 14 mm) suhtes. Rabarberi vars inhibeeris

samuti kokku üheksa testitud bakteri kasvu ning inhibeerimistsoonid jäid vahemikku 9–16 mm. Kinnitust leidis ka mustsõstra ja aroonia marjade 96% etanooliekstraktide tugev antibakteriaalne toime, sest ekstraktid inhibeerisid vastavalt üheksa (d = 9–15 mm) ja kaheksa (d = 8–15 mm) testitud bakteriliigi kasvu.

Rabarberi juur osutus efektiivseks ka 30% etanooliekstraktis pidurdades selles seitsme testitud bakteriliigi kasvu, kuid inhibeerimistsoonid (d = 1–4 mm) jäid

väiksemaks võrreldes 96% etanooliekstraktiga ($d = 9\text{--}18$ mm). Mõningasi tulemusi 30% etanooliekstraktis näitasid ka rabarberi vars ja astelpaju mari, mis pärssisid viie testitud bakteriliigi kasvu, kuid mõõdetud inhibeerimistsoonide diameeter oli siiski väike, jäädes vahemikku 1–5 mm.

Võrreldes 30% etanooliekstraktiga, täheldati taimsete lisandite 20% etanooliekstrakti kasutamisel efektiivsemat antibakteriaalset toimet, kuid see ilmnis eeskätt G(+) bakterite ja vähem G(–) bakterite suhtes. Suurimad inhibeerimistsoonid mõõdeti rabarberi juure 20% etanooliekstrakti, mille puhul mõõdetud inhibeerimistsoonid ($d = 8\text{--}16$ mm) sarnanesid 96% etanooliekstraktiga saadud tulemustele ($d = 9\text{--}18$ mm). Kuigi taimsed lisandid 20% etanooliekstraktis inhibeerisid vaid kolme bakteriliiki (*B. cereus*, *Y. ruckeri*, *B. Pumilus*), olid mõõdetud inhibeerimistsoonid märkimis-

väärsed ($d = 8\text{--}20$ mm). Silmapaistev oli ka mustsõstra 20% etanooliekstrakti antibakteriaalne toime *B. cereus*'e suhtes ($d = 20$ mm). Taimsete lisandite vesiekstraktide võrdluses täheldati rabarberi juure ja varre toimet vastavalt kuue ja nelja testitud bakteri suhtes. Suurimad inhibeerimistsoonid mõõdeti juurel *C. jejuni* ($d = 10$ mm) ja varrel *B. Subtilis*'e ($d = 9$ mm) suhtes. Tähelepanuväärne on, et sõltumata kasutatavast ekstraktist osutusid taimsetele lisanditele, eeskätt mustsõstra marjadele kõige vastupidavamaks probiootikumidena tuntud *L. acidophilus* ja *B. bifidum*.

Mõningate etanooliekstraktide võrdluses oluliste toidupatogeenide nagu *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *B. cereus* ja *L. monocytogenes* suhtes täheldati 96% etanooliekstraktidel oluliselt ($p < 0.001$) suuremat antibakteriaalset toimet võrreldes 20% etanooliekstraktide toimetega (tabel 1).

Tabel 1. Taimede 20 ja 96% etanooliekstraktide (1:20 m/v) antibakteriaalse toime võrdlus oluliste toidupatogeenide ($n = 4$) suhtes (kasvu inhibeerimistsoon (mm) \pm standardhälve)

Table 1. Antimicrobial activity of plant 20 and 96% ethanol (1:20 w/v) against pathogenic bacteria ($n = 4$) in inhibition zones (mm) \pm SD

Taimiekstraktid / Plant extracts	<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Salmonella enteritidis</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	20%	96%	20%	96%	20%	96%	20%	96%
Rabarberi juur / <i>Rhubarb root</i>	–	18 \pm 3	–	11,5 \pm 0,7	16	15,5 \pm 2,1	9	11,5 \pm 0,7
Rabarberi vars / <i>Rhubarb petiole</i>	–	12	–	11 \pm 2	11,5 \pm 0,71	12	–	12
Mustsõstar / <i>Blackcurrant berry</i>	–	15 \pm 2	–	10	12	10	–	11 \pm 2
Mustsõstra leht / <i>Blackcurrant leaf</i>	–	13	–	9,5 \pm 0,7	14	10,5 \pm 0,7	–	10
Aroonia / <i>Chokeberry berry</i>	–	15	–	9 \pm 2	10	12	–	10,5 \pm 0,7
Söödäva kuslapuu / <i>Blue honeysuckle berry</i>	–	14 \pm 2	–	9	10	10	–	–

– Toime puudub / No effect detected

Selgus, et 96% etanooliekstrakti *in vitro* uuringus oli taimeekstraktidel kõige tugevam antimikroobne toime vähenemas järjekorras järgmistele toidupatogeenidele: *C. jejuni* > *B. cereus* > *S. enteritidis* > *L. monocytogenes*. Siiski võib öelda, et kõige efektiivsemaks osutus rabarberi juure ja varre 96% etanooliekstrakt ($d = 11\text{--}18$ mm), mis inhibeeris ka testitud bakteriliikidest kõige vastupidavamaks osutunud *L. monocytogenes*'t ($d = 11\text{--}12$ mm). Kõige tundlikumaks osutunud *C. jejuni* elutegevust inhibeeris nii rabarberi kui ka mustsõstra ja aroonia marja 96% etanooliekstrakt.

Antimikroobse toime uuringud toretes seahakklihatoodetes

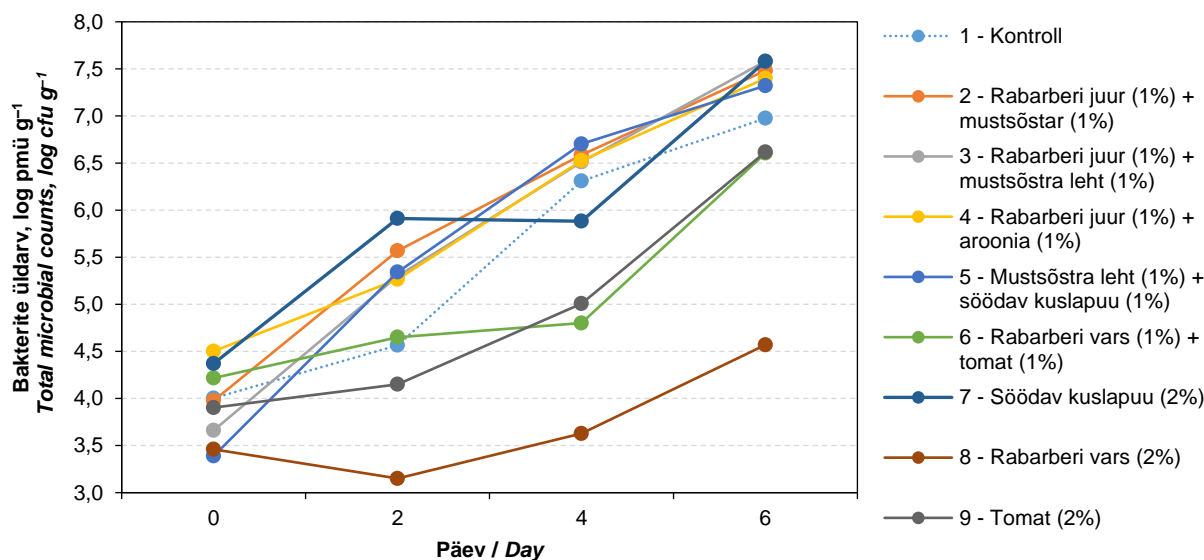
Uuring III keskendus tootekatsetes mikroorganismide kasvu pärssimise suhtes efektiivsete taimsete pulbrites otsingutele. Toidumaatriksina kasutati toorest seahakkliha. Mikroorganismide arvukuse dünaamikaid jälgiti kontrollproovides ja ühe kuni kahe erineva lisandiga rikastatud hakklihaproovides. Vaatluse all oli kuuepäevase uurimisperiodi jooksul taimsete lisandite mikroobide kasvu pärssiv mõju seahakklihas leiduvatele aeroobsetele mesofiilsetele bakteritele (joonis 2) ning hallitus- ja pärmseentele (joonis 3).

Kõikides seahakklihaproovides täheldati enamikel juhtudel sarnast aeroobsete mesofiilsete bakterite arvukuse kasvu kogu säilimisaja jooksul. Katse alguses (0. päeval) oli toretes seahakklihaproovides bakterite

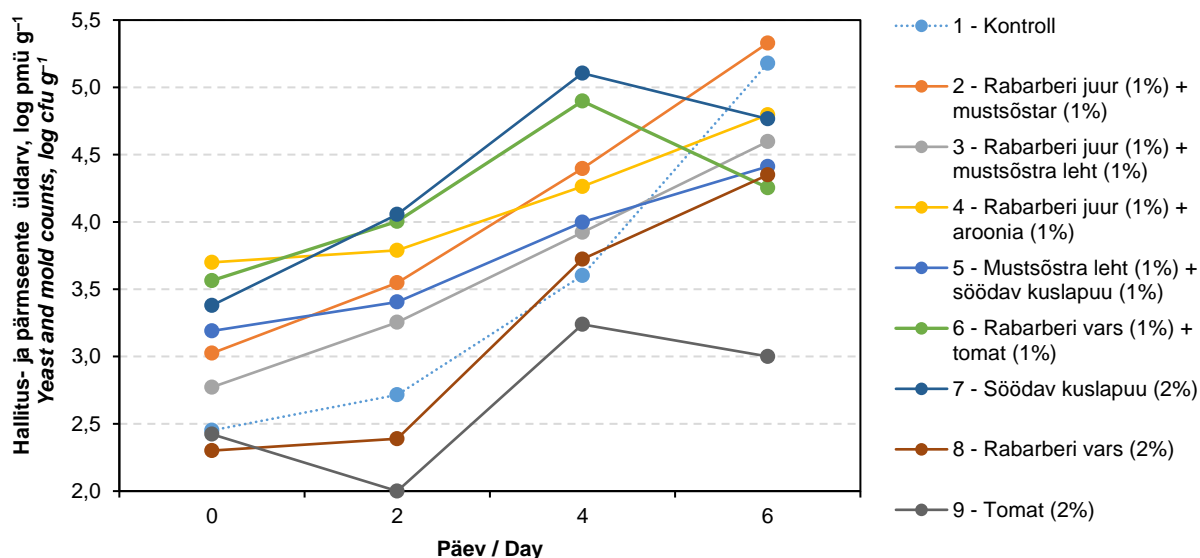
üldarv vahemikus 3,4 \pm 0,12 kuni 4,5 \pm 0,17 log pmü g^{-1} , tõustes uurimisperiodi lõpuks (6. päeval) arvukuseni 4,6 \pm 0,09 kuni 7,58 \pm 0,10 log pmü g^{-1} . Mikroobide kasvu pärssiv toime ilmnis toretes seahakklihatoodetes ainult rabarberi varre ja tomati või nende segu lisandi korral. Täheldati aeroobsete bakterite arvukuse tõusu aeglustumist nelja esimese päeva jooksul. Kui algselt oli antud proovides mikroobide arvukus 3,46–4,22 log pmü g^{-1} , siis neljandaks päevaks tõusis see arvukuseni 3,63–5,01 log pmü g^{-1} , jäädes madalamaks kui kontrollproovi või teiste taimsete lisanditega rikastatud seahakklihatoodete tulemused.

Hallitus- ja pärmseente arvukuse dünaamika toretes seahakklihaproovides on toodud joonisel 3. Hallitus- ja pärmseente arvukus tõusis kõikides uuritud proovides.

Kui katse alguses jäid loendatud tulemused vahemikku 2,30 \pm 0,01 ja 3,56 \pm 0,08 log pmü g^{-1} , siis 6. päeval olid need juba vahemikus 3,00 \pm 0,01 kuni 5,33 \pm 0,09 log pmü g^{-1} . Võrreldes kontrollprooviga, kus hallitus- ja pärmseente arvukus tõusis toretes seahakklihatoodetes algusest 2,45 \pm 0,64 kuni 5,18 \pm 0,57 log pmü g^{-1} , eristusid teistest proovidest rabarberi varre ja tomati lisandit sisaldavad tooteproovid. Võrreldes kontrollprooviga ilmnis neis proovides mõningane hallitus- ja pärmseente kasvu pärssiv toime, kuid teistes lisanditega rikastatud proovides statistiliselt olulist ($p > 0,05$) erinevust võrreldes kontrollprooviga siiski ei täheldatud.



Joonis 2. Aeroobsete bakterite üldarv ($\log \text{pmü g}^{-1}$) taimsete lisanditega rikastatud proovides 0., 2., 4. ja 6. säilituspäeval
Figure 2. Total microbial counts ($\log \text{pmü g}^{-1}$) of raw samples subjected to different treatments after storage time of 0, 2, 4 and 6 days: 1 – Kontroll (toores hakkliha; HL) / Control (raw minced meat; RM); 2 – HL + rabarberi juur (1%) + mustsõstar (1%) / RM with 1% rhubarb root + 1% blackcurrant berry; 3 – HL + rabarberi juur (1%) + mustsõstra leht (1%) / RM with 1% rhubarb root + 1% blackcurrant leaf; 4 – HL + rabarberi juur (1%) + aroonia (1%) / RM with 1% rhubarb root + 1% chokeberry berry; 5 – HL + mustsõstra leht (1%) + söödav kuslapuu (1%) / RM with 1% blackcurrant leaf + 1% blue honeysuckle berry; 6 – HL + rabarberi vars (1%) + tomat (1%) / RM with 1% rhubarb petiole + 1% tomato; 7 – HL + söödav kuslapuu (2%) / RM with 2% blue honeysuckle berry; 8 – HL + rabarberi vars (2%) / RM with 2% rhubarb petiole; 9 – HL + tomat (2%) / RM with 2% tomato



Joonis 3. Hallitus- ja pärmseente üldarv ($\log \text{pmü g}^{-1}$) taimsete lisanditega rikastatud proovides 0., 2., 4. ja 6. säilituspäeval
Figure 3. Yeast and mold counts ($\log \text{pmü g}^{-1}$) of raw samples subjected to different treatments after storage time of 0, 2, 4 and 6 days: 1 – toores hakkliha (HL) / raw minced meat (RM); 2 – HL + rabarberi juur (1%) + mustsõstar (1%) / RM with 1% rhubarb root + 1% blackcurrant berry; 3 – HL + rabarberi juur (1%) + mustsõstra leht (1%) / RM with 1% rhubarb root + 1% blackcurrant leaf; 4 – HL + rabarberi juur (1%) + aroonia (1%) / RM with 1% rhubarb root + 1% chokeberry berry; 5 – HL + mustsõstra leht (1%) + kuslapuu (1%) / RM with 1% blackcurrant leaf + 1% blue honeysuckle berry; 6 – HL + rabarberi vars (1%) + tomat (1%) / RM with 1% rhubarb petiole + 1% tomato; 7 – HL + söödav kuslapuu (2%) / RM with 2% blue honeysuckle berry; 8 – HL + rabarberi vars (2%) / RM with 2% rhubarb petiole; 9 – HL + tomat (2%) / RM with 2% tomato

Arutelu

Tarbijate soov sünteetiliste säilitusainete kasutamise vähendamise osas toidus ning taimsete lisandite potentsiaalne mikroobide kasvu pärssiv toime on üks olulisemaid põhjuseid, miks otsitakse võimalusi nende kasutamiseks toidutehnoloogias. Eesti Maaülikooli toiduhügieeni ja -ohutuse uurimisgrupis läbiviidud

in vitro uuringud kinnitavad, et taimeekstraktid inhibeerivad mikroobide kasvu, kuid antimikroobse toime tugevus sõltub taimsest materjalist, selle ettevalmistusviisist ja sihtmikroorganismist. *In vitro* uuringutes avaldusid kõige selgemalt antimikroobsed omadused eeskätt rabarberi juurel ja varrel, mis inhibeerisid nii G(+) kui ka G(-) bakterite kasvu. Antimikroobse toime olemasolu rabarberi taime

erinevatel osadel on leidnud kinnitust ka teistes *in vitro* uuringutes (Berköz jt, 2017; Sima jt, 2018; Bhattacharjee jt, 2021). Rabarberi antimikroobse toime põhjusena on välja pakutud polüfenoolsete ühendite kõrge sisaldus (Püssa jt, 2009; Berköz jt, 2017), kusjuures rabarberi antimikroobse toimega seostatakse nii stilbenoide (resveratrool, rapontiin, deoksürapontiin jt) kui ka antrakinoone (aaloe-emosiin, krüsofanooli jt) (Smolarz jt, 2013).

Rabarberi juur ja vars näitasid *in vitro* uuringus häid antimikroobseid omadusi ka oluliste toidupatogeenide nagu *C. jejuni*, *B. cereus*, *S. enteritidis* ja *L. monocytogenes* suhtes. Marjadest väärib tähelepanu mustsõstar. Oluline tulemus on, et mustsõstar ei pidurdanud probiootiliste bakterite nagu *L. acidophilus* ja *B. bifidum* elutegevust, küll aga pärssis mõnede patogeenide nagu *C. jejuni*, *B. cereus*, *S. enteritidis* jt kasvu. Nii on võimalik mustsõstra marjapulbreid edukalt kasutada probiootilistes toiduainetes pärssimata nende mikroorganismide arvukust. Taimsete ekstraktide võime soodustada probiootilise pärmi *Saccharomyces boulardii* kasvu pidurdades samal ajal patogeenide *Candida* liike on leidnud kinnitust Milutinović jt (2021) uuringus. Miladinović jt (2014) uuringus leiti, et fenoolseid ühendeid rikkalikult sisaldanud mustsõstra ekstraktidel on G(+) ja G(-) baktereid pärssiv toime. Sarnaselt eeltoodule, ka meie esimeses uuringus (Raudsepp jt, 2013) leiti, et taimeekstraktide antimikroobne toime ei sõltu bakteri kuuluvusest G(+) või G(-) rühma.

Teatud erinevused ilmnisid meie teises uuringus (Raudsepp jt, 2019), kus 20% etanooliekstraktides olid G(-) bakterid taimsete lisandite mõju suhtes vastupidavamad. Põhjuseks võis olla hüdrofiilsete ühendite passiivse difusiooni piiramine G(-) bakterite lipopolüsahhariidmembraani poolt (Raudsepp jt, 2019). G(-) bakterite sein sisaldab õhukest peptoglykaanikihti ja välismembraani, mida G(+) bakteritel ei leidu. Välismembraani puudumine G(+) bakteritel võib suurendada bioaktiivsete ühendite läbilaskvust rakkudes (Tian jt, 2009). Põhjusi võib olla teisigi, näiteks Zhang jt (2020) leidsid, et suures koguses flavonoidide sisaldavad taimeekstraktid inhibeerisid tõhusalt *Staphylococcus aureus*'t, kahjustades rakuseina ja rakumembraani terviklikkust, inhibeerides rakusiseseid ensüüme, muutes geeniekspressiooni ja kutsudes esile bakteriaalse apoptoosi. Samuti on leitud, et hüperpolarisatsioon ja rakusisese tsütoplasma pH langus on olulised bakterirakkude membraanikahjustuse näitajad (Vanhauteghem jt, 2013). Bakteri rakuseina ehitus võib seda mõjutada põhjustades teatud bakteriliikidel kiirema raku hüperpolarisatsiooni (Gonelimali jt, 2018) ning elutegevuse peatumise või mikroobiraku hukkumine (Pisoschi jt, 2018). Bhattacharjee jt (2021) uuringus omas rabarberi varre vesiekstrakt tugevat antibakteriaalset toimet bakterite *E. coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *S. aureus* ja *B. subtilis* vastu. Siiski leiti, et G(-) bakterite kasvu pärssimiseks on vaja rabarberi varre kõrgema kontsentratsiooniga

vesiekstrakti. Käesoleva uuringu tulemused on kooskõlas varasemate tulemustega, kus täheldati antimikroobse toime otsest seost ekstraktides leiduva taimse lisandi kontsentratsiooniga (Bhalodia jt, 2011; Gonelimali jt, 2018).

Uuringutega on leitud, et Gram-värvumine ei oma siiski väga olulist rolli antimikroobse toime tugevuses. Näiteks Taguri jt (2006) leidsid, et taimeekstraktide antimikroobne toime ei olnud korrelatsioonis bakteri kuuluvusega G(+) või G(-) hulka, vaid sõltus peamiselt katsesse valitud bakteriliikidest ning taimsete ekstraktide polüfenoolsest koostisest. Samuti leiti, et näiteks pürogalloolirühmi sisaldavad polüfenoolid olid oluliselt aktiivsemad kui katehhooli- või resortsinoolitsüklitega polüfenoolid (Taguri jt, 2006). Ka käesolevas ülevaates leiti, et G(+) ja G(-) bakterite tundlikkus sõltub taimsete lisandite koostises leiduvatest antimikroobsetest ühenditest, sest patogeenide suhtes kõige efektiivsemaks osutunud rabarberi juures sisaldus suures koguses trans-resveratrooli, emodiini ning mitmeid teisi hüdrofoobseid stilbenoide ja hüdroksüantrakinoone, mis avaldasid antimikroobset toimet nii G(+) kui ka G(-) bakteritele (Raudsepp jt, 2018). Antimikroobse toime tugevuse sõltuvus bakteri liigist on tõendatud ka Bouarab-Chibane jt (2019) ning Oulahal ja Degraeve (2022) uuringutes.

Käesolevas *in vitro* uuringus oli taimeekstraktidel kõige tugevam antimikroobne toime *C. jejuni* suhtes. *C. jejuni* sage esinemine broilerilihas ja seos kampülobakterenteriidiga (Mäesaar jt, 2014; 2018) loob vajaduse sellega seonduvate rahvatervise riskide maandamiseks. Uuringute *in vitro* katsetes leiti taimsete lisandite hulgast sobivaid kandidaate, näiteks rabarber, mustsõstar ja aroonia, pärssimaks kampülobakterite elutegevust. Taimsete lisandite mõju efektiivsuse hindamine tootekatsetes vajab siiski veel lisauuringuid. Taimsed lisandid on võimelised mõjutama ka patogeenide virulentsust. Sima jt (2018) uuringus leidis kinnitust, et tsitruseliste, viinamarjaseemnete ja hariliku pune ekstraktid vähendavad tõhusalt kampülobakteritest *C. jejuni* ja *C. coli* virulentsust nii *in vitro* kui ka *in vivo*.

Taimede antimikroobse toime efektiivsus meie *in vitro* uuringutes sõltus ekstraheerimisel kasutatud lahustist. Raudsepp jt (2019) uuringus leidis kinnitust solvendist sõltuv polüfenoolsete ühendite profiil erinevates taimeekstraktides. Kõige tugevam antimikroobne toime ilmnis 96% etanooliekstraktides võrreldes 20–30% etanooliekstrakti või vesiekstraktiga. Tulemus viitab asjaolule, et antibakteriaalse toimega polüfenoolsed ühendid on enamasti hüdrofoobse struktuuriga, mõjutades kõige enam sihtmikroorganismide membraani läbilaskevõimet (Oulahal, Degraeve, 2022). Gonelimali jt (2018) uuringus leidis kinnitust taimsete lisandite, nii etanooli- kui ka vesiekstraktide, antimikroobne toime toidupatogeenide ja toidu riknemist esile kutsuvatele mikroorganismidele suhtes. Sarnaselt meie tulemustele oli antimikroobne toime suurem etanooliekstraktide puhul.

Tuginedes käesolevasse ülevaatesse koondatud uuringute tulemustele saab järeldada, et taimsed lisandid, mille antimikroobne toime on suurem etanooliekstraktides, sisaldavad rohkem hüdrofoobseid põlufenoolseid ja ka muid antimikroobse toimega ühendeid, mistõttu sobivad rohkem rasvarikkamates toodetes kasutamiseks (Raudsepp jt, 2013; Anton jt, 2019). Samas tuleb arvestada, et rasvarikkamates toitudes võib bakteritele moodustuda mikroobe kaitsev lipiidkiht, mis omakorda vähendab antimikroobsete ühendite toimet (Cabral jt, 2013).

Kui *in vitro* uuringud taimsete lisandite polüfenoolide antimikroobse efektiivsuse kohta on olnud paljulubavad (Bouarab-Chibane jt, 2019), siis toidukatsetes on täheldatud taimsete lisandite antimikroobse toime vähenemist sõltuvalt toidumaatriksi koostisest ja selle algsest mikrobiotast (Oulahal, Degraeve, 2022).

Meie seahakklihatoodete katsetes lisati taimsed materjalid tooresse hakklihase pulbri kujul. Taimepulbrid segunevad hakklihase kergesti ja ühtlaselt ning sobivad hästi kasutamiseks ka toidutööstuses (Anton jt, 2019). Pulber on ka rikkalikum erineva hüdrofoobusega ainete poolest, mis liiguvad lihamaatriksis erinevatesse aladesse, kui mistahes ekstrakt. Toidu mikrobioloogilised uuringud teostati kestvuskatsete põhimõttel, kus toidu mikrobioloogilise kvaliteedi hindamiseks kasutatakse eelkõige mikroobide üldarvude määramist. Katsetulemused näitasid, et rabarberil on nõrgem antimikroobne toime tooretas seahakklihatoodetes võrreldes *in vitro* uuringute tulemustega. Seda saab selgitada asjaoluga, et *in vitro* katsetes puudusid toidumaatriksist tingitud toime inhibiitorid. Mikroobide kasvu toores hakklihase mõjutab nii tooraine algne mikrobioloogiline kvaliteet (mikroobide liigiline koostis ja kontsentratsioon) kui ka tooraine keemiline koostis. On leitud, et looduslike polüfenoolsete ühendite antimikroobset toimet toidus mõjutab ebasoodsalt pH tõus, madal veeaktiivsus ning keedusoola, rasva ja liitsüsiivesikute sisaldus toidus (Kalogianni jt, 2020). Polüfenoolsete ühendite hüdrofoobne olemus hõlbustab nende akumulereerumist rasvas, mistõttu liha kõrge rasvasisaldus ei soodusta nende kontakti liha hüdrofiilse faasis kogunevate patogeensete mikroorganismidega (Larson jt, 1996). Ka toidu koostises olevad valgud võivad moodustada polüfenoolsete ühenditega tugevaid komplekse, mis võib vähendada taimsete lisandite antimikroobset võimet. Senised uuringud on andnud vastuolulisi tulemusi, mistõttu on vajalikud täiendavad uuringud valkude mõjust polüfenoolsete ühendite antimikroobsele toimele (Ozidal jt, 2013).

Käesolevas ülevaates selgus, et aeroobsete mesofiilsete mikroorganismide kasvu on võimalik inhibeerida kombineerides tootes rabarberi varre ja tomati pulbrite segu. Hallitus- ja pärmseente arvukust aitas tooretas seahakklihaproovides samuti kõige enam ohjata rabarberi juure või tomati lisand, v.a nende kahe lisandi kombinatsioon.

Kokkuvõte

Ülevaates leiti, et mõnede taimsete lisandite etanooliekstraktid omavad antibakteriaalset toimet patogeensetele bakteritele *in vitro* ning mõningad taimsed pulbrid omavad mikroobide kasvu pärssivat toimet tooretas seahakklihatoodetes. Siiski vajab *in vitro* katsetes efektiivseks osutunud taimsete lisandite või nende kombinatsioonide mõju erinevates toidumaatriksites täiendavat uurimist nakatamiskatsete abil, eriti *L. monocytogenes*'e kasvu suhtes valmistoitutes. Senised *in vitro* katsed valitud patogeenidega näitasid, et taimsest materjalist, eeskätt rabarberi juur ja vars ning marjadest mustsõstar ja aroonia omavad toidus kasutamise potentsiaali. Tooretas seahakklihatoodetes avaldusid parimad antimikroobsed omadused rabarberi varre ja tomati pulbri kombinatsioonil. Seega osutus rabarber efektiivseks nii *in vitro* kui ka toorete seahakklihatoodete katsetes.

Edasistes uuringutes on oluline keskenduda komplekssetele analüüsidele, et välja selgitada efektiivseteks osutunud taimsete lisandite antimikroobset toimet mõjutavad ühendid ja nende antagonistlikud või sünergistlikud koostoimed, seonduvad toimemehhanismid ja taimse materjali optimaalne kontsentratsioon toidus. Samuti vajab väljaselgitamist taimsete lisandite toidutööstuses kasutamise potentsiaal k.a majanduslik tasuvus.

Tänuavaldused

Uuringuid on finantseerinud:

- Eesti Teadusagentuur (PRG1441) "Looduslike bioaktiivsete ainete toimet mehhanismide uurimine loomsetes toitudes",
- projekt P180279VLTR "Looduslike bioaktiivsete ainete toime ning seonduvate mehhanismide uurimine toidumaatriksites",
- projekt P170054VLTH "Toidutaimede metaboolika ning sekundaarsete metaboliitide antioksidantse ja antibakteriaalse toime intensiivsuse ja mehhanismide uurimine",
- projekt 8-2/T15024VLTH "Säästvad taimsed lisandid tervislikumate lihatoodete saamiseks – ideede tõestamine".

We would like to express thank to the Estonian Research Council (Project No PRG1441), the Estonian University of Life Sciences (Projects No P180279VLTR and P170054VLTH) and Ministry of Agriculture (Project No 8-2/T15024VLTH).

Huvide konflikt / Conflict of interest

Autorid kinnitavad artikliga seotud huvide konflikti puudumist.

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Autorite panused / Authors contributions

Kõigil autoritel oli võrdne panus publikatsiooni koostamisel ja valmimisel.

All authors had an equal contribution to making and compilation of the publication.

Kasutatud kirjandus

- Anton, D., Koskar, J., Raudsepp, P., Meremäe, K., Kaart, T., Püssa, T., Roasto, M. 2019. Antimicrobial and antioxidative effects of plant powders in raw and cooked minced pork. – *Foods*, 8(12):1–18. DOI: 10.3390/foods8120661.
- Anton, D., Matt, D., Pedastsaar, P., Bender, I., Kazimierczak, R., Roasto, M., Kaart, T., Luik, A., Püssa, T. 2014. Three-year comparative study of polyphenol contents and antioxidant capacities in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars grown under organic and conventional conditions. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22):5173–5180. DOI: 10.1021/jf500792k.
- Amit, S.K., Uddin, M.M., Rahman, R., Islam, S.M.R., Khan, M.S. 2017. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. – *Agriculture & Food Security*, 6(51):1–22.
- Berköz, M., Yıldırım, M., Allahverdiyev, O., Krošniak, M., Francik, R., Bozan, N., Yalın, S. 2017. Antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities of Turkish rhubarb (*Rheum palmatum* L.) leaf extracts. – *Proceedings*, 1, 1032. DOI: 10.3390/proceedings1101032.
- Bhalodia, N.R., Shukla, V.J. 2011. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2):104–109. DOI: 10.4103/2231-4040.82956
- Bhattacharjee, W.N., Bommareddy, P.K., DePass, A.L. 2021. A water-soluble antibiotic in rhubarb stalk shows an unusual pattern of multiple zones of inhibition and preferentially kills slow-growing bacteria. – *Antibiotics*, 10(8):951:1–13. DOI: 10.3390/antibiotics10080951
- Bisset, N.G., Wichtl, M. 1994. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on scientific basis. – Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 91–95.
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., Bordes, C. 2019. Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) models. – *Frontiers in Microbiology*, 10:829. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00829
- Cabral, L.C., Pinto, V.F., Patriarca, A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. – *International Journal of Food Microbiology*, 166(1):1–14. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026
- Chibane, L.B., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., Oulahal, N. 2018. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. – *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4):1457–1474. DOI: 10.1002/jsfa.9357.
- EVS-EN ISO 4833-2:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 degrees by the surface plating technique (ISO 4833-2:2013).
- EVS-ISO 21527-1:2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95 (ISO 21527-1:2008).
- EVS-EN ISO 6887-2:2017. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (ISO 6887-2:2017).
- Gonellimali, F.D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., Hatab, S.R. 2018. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. – *Frontiers in Microbiology*, 9:1–9.
- Kalogianni, A.I., Lazou, T., Bossis, I., Gelasakis, A.I. 2020. Natural phenolic compounds for the control of oxidation, bacterial spoilage, and foodborne pathogens in meat. – *Foods*, 9(6):794. DOI: 10.3390/foods9060794.
- Koskar, J., Kramarenko, T., Meremäe, K., Kuningas, M., Sögel, J., Mäesaar, M., Anton, D., Lillenberg, M., Roasto, M. 2019. Prevalence and numbers of *Listeria monocytogenes* in various ready-to-eat foods over a 5-year period in Estonia. – *Journal of Food Protection*, 82(4):597–604. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-383
- Kramarenko, T., Roasto, M., Mäesaar, M., Maugliani, A., Tozzoli, R., Meremäe, K., Elias, T., Kuningas, M. 2016. Pheno-genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from cattle at slaughter. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(11):703–708. DOI: 10.1089/vbz.2016.1961
- Kuus, K., Kramarenko, T., Sögel, J., Mäesaar, M., Fredriksson-Ahomaa, M., Roasto, M. 2021. Prevalence and serotype diversity of *Salmonella enterica* in the Estonian meat production chain in 2016–2020. *Pathogens*, 10(12):1–9. DOI: 10.3390/pathogens10121622
- Larson, A.E., Yu, R.R.Y., Lee, O.A., Haas, G.J., Johnsona, E.A. 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Food Microbiology*, 33:195–207. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01155-5
- Lorenzo, J.M., Pateiro, M., Domínguez, R., Barba, F.J., Putnik, P., Kovačević, D.B., Shpigelman, A., Granato, D., Franco, D. 2018. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Research International*, 106:1095–1104. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.12.005
- Miladinović, B., Kostić, M., Šavikin, K., Đorđević, B., Mihajilov-Krstev, T., Živanović, S., Kitić, D. 2014. Chemical profile and antioxidative and antimicrobial activity of juices and extracts of 4 black currants varieties (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Food Science*, 79(3):C301–C309. DOI: 10.1111/1750-3841.12364
- Milutinović, M., Dimitrijević-Branković, S., Rajilić-Stojanović, M. 2021. Plant extracts rich in poly-

- phenols as potent modulators in the growth of probiotic and pathogenic intestinal microorganisms. *Frontiers in Nutrition*, 8:1–11. DOI: 10.3389/fnut.2021.688843
- Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N., Bakri, M.M. 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2):361–366. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.02.004
- Mäesaar, M., Meremäe, K., Ivanova, M., Roasto, M. 2018. Antimicrobial resistance and multilocus sequence types of *Campylobacter jejuni* isolated from Baltic broiler chicken meat and Estonian human patients. *Poultry Science*, 97(10):3645–3651. DOI: 10.3382/ps/pey219
- Mäesaar, M., Praakle, K., Meremäe, K., Kramarenko, T., Sögel, J., Viltrop, A., Muutra, K., Kovalenko, K., Matt, D., Hörman, A., Hänninen, M.-L., Roasto, M. 2014. Prevalence and counts of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail level in Estonia. *Food Control*, 44:72–77. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.03.044
- Oulahal, N., Degraeve, P. 2022. Phenolic-rich plant extracts with antimicrobial activity: an alternative to food preservatives and biocides? *Frontiers in Microbiology*, 12:753518. DOI: 10.3389/fmicb.2021.753518
- Ozidal, T., Capanoglu, E., Altay, F. 2013. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51:954–970. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.02.009
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N.K., Mathe, E. 2018. An overview of natural antimicrobials in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143:922–935. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.11.095
- Prakash, B., Kujur, A., Singh, P.S., Kumar, A., Yadav, A. 2017. Plants-derived bioactive compounds as functional food ingredients and food preservative. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2(1):1–7.
- Püssa, T., Raudsepp, P., Kuzina, K., Raal, A. 2009. Polyphenolic composition of roots and stalks of *Rheum rhaponticum* L. *Phytochemical Analysis* 20:98–103. DOI: 10.1002/pca.1102
- Raudsepp, P., Anton, D., Roasto, M., Meremäe, K., Pedastsaar, P., Mäesaar, M., Raal, A., Laikoja, K., Püssa, T. 2013. The antioxidative and antimicrobial properties of the blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.), Siberian rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) and some other plants, compared to ascorbic acid and sodium nitrite. *Food Control*, 31:129–135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.10.007
- Raudsepp, P., Koskar, J., Anton, D., Meremäe, K., Kapp, K., Laurson, P., Bleive, U., Kaldmäe, H., Roasto, M., Püssa, T. 2019. Antibacterial and antioxidative properties of different parts of garden rhubarb, blackcurrant, chokeberry and blue honeysuckle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5):2311–2320. DOI: 10.1002/jsfa.9429
- Roasto, M. 2019. Indikaatormikroorganismid toidus. *Terve Loom ja Tervislik Toit*. Eesti Maaülikool, Vali Press OÜ, ISBN 978-9949-629-66-4: 8–16.
- Sima, F., Stratakos, A. C., Ward, P., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L., et al. 2018. A novel natural antimicrobial can reduce the *in vitro* and *in vivo* pathogenicity of T6SS positive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* chicken isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9:2139. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02139
- Smolarz, H.D., Swatko-Ossor, M., Ginalska, G., Medyńska, E. 2013. Antimycobacterial effect of extract and its components from *Rheum rhaponticum*. *Journal of AOAC International*, 96(1):155–160. DOI: 10.5740/jaoacint.12-010
- Zhang, L.L., Zhang, L.F., Xu, J.G. 2020. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.). *Scientific reports*, 10(1):8876. DOI: 10.1038/s41598-020-65802-7.
- Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I. 2006. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11):2226–2235. DOI: 10.1248/bpb.29.2226
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., Luo, Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113:173–179. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.062
- Vanhauteghem, D., Janssens, G. P., Lauwaerts, A., Sys, S., Boyen, F., Cox, E., Mayer, E. 2013. Exposure to the proton scavenger glycine under alkaline conditions induces *Escherichia coli* viability loss. *PLoS One* 8: e60328. DOI: 10.1371/journal.pone.0060328.

Review of studies on the antimicrobial activity of plant additives *in vitro* and in raw minced pork products

Kadrin Meremäe, Julia Koskar, Tõnu Püssa, Piret Raudsepp, Dea Anton, Mati Roasto

Estonian University of Life Sciences, Institute of Veterinary Medicine and Sciences, Chair of Veterinary Biomedicine and Food Hygiene, Fr. R. Kreutzwaldi 56/3, 51014 Tartu, Estonia

Summary

Concerns regarding possible adverse health effects of synthetic food additives, including food preservatives, have increased consumers' demand for the use of natural antimicrobials in foods. This growing public demand led scientists to carry out new complex studies to find out the antimicrobial and microbial growth inhibiting effects of different plant materials both *in vitro* and in raw minced pork products. In nature, there are different natural antimicrobial compounds which play an important role in the natural defense of plants, therefore possibly having antimicrobial effects against certain microbes. The aim of this study is to provide a

comprehensive overview of the different studies that have been carried out over the years in Estonian University of Life Sciences, focusing on *in vitro* and raw minced pork products based antimicrobial and microbial growth inhibiting studies of different plant additives.

Antimicrobial effect of plant extracts was determined against Gram-positive *Bacillus subtilis* (BGA), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus pumilus* (CV 607), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *Bifidobacterium bifidum* (Bb12), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), and Gram-negative *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* (NCCB 100282), *Yersinia ruckeri* (NCIM 13282), *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291). Antimicrobial activity testing was performed by modified agar well-diffusion method. The EVS-EN ISO 4833-2:2013 standard was followed for the determination of total microbial counts, and the EVS-ISO standard 21527-1:2009 standard was followed for the enumeration of yeasts and molds.

In vitro studies revealed that the strongest bacterial growth inhibition was observed in the 96% ethanol extracts of rhubarb root and petiole as well as berries of blackcurrant and chokeberry. The inhibitory effect of plant ethanol extracts on the tested bacteria was found more effective compared to plant water extracts. Plant extracts had the strongest antimicrobial activity against *C. jejuni*. In raw minced pork products, studies the total microbes as well as yeasts and molds were inhibited in raw minced pork products only in the presence of powders of rhubarb petioles and tomato or their mixture. Similarly to *in vitro* studies, rhubarb showed the best microbial growth inhibition effect in raw minced pork products as well.

In conclusion, this work found that powders of rhubarb, tomato and berries of blackcurrant and chokeberry are perspective candidates for inhibiting microbial growth in raw minced pork products.