

ISTRAŽIVANJE ANTIMIKROBNIH AGENSA U STOČNOJ HRANI EKSTRAHIRANIH IZ BILJAKA U KINI

STUDI OF THE FEED ANTIMICROBIAL AGENS EXTRACTED FROM PLANTS IN CHINA

Shi Bo

Stručni članak
UDK:636.086.74.75.087.8.
Primljeno: 3. lipanj 2003.

SAŽETAK

Neškodljivost hrane za ljude i životinje od velike je važnosti. Dodaci stočnoj hrani, posebice ljekoviti dodaci, značajno utječu na kakvoću jaja, mlijeka i mesa.

Na primjer, životinjama se u hrani daju antibiotici u niskim koncentracijama radi pospješavanja rasta i stoga se nazivaju "promotorima rasta". To su isti ili slični antibiotici koji se koriste za liječenje ljudi. U životinja kao i u ljudi antibiotici se također koriste za liječenje bakterijskih bolesti. Dobro je poznato da prekomjerna primjena antibiotika dovodi do razvoja otpornosti bakterija na antibiotike i stoga predstavlja opasnost za čovjeka. Upotreba antibiotika "promotora rasta" u hrani za životinje bit će zabranjena u svim europskim državama od 2006. g. U ovom su radu opisana provedena istraživanja o antimikrobijskim sredstvima u stočnoj hrani ekstrahiranim iz kineskih biljaka, kao što su origano ulje (Oregano oil), te flavonoidi Ampelosis Grossedetala. Origano ulje se dobiva iz kineske divlje biljke *Origanum vulgare* Linnaeus tretiranjem vodenom parom. Divlja *Origanum vulgare* Linnaeus već se stotinama godina koristi u Kini kao ljekovita trava s dobrim kurativnim učinkom na crijevne bolesti. Ampelosis Grossedetala je vrsta divljeg čaja koji raste u mnogim provincijama Kine. List ovog čaja sadržava 40 posto flavonoida. Flavonoidi ekstrahirani iz ove vrste čaja djelotvorni su u liječenju respiratornih oboljenja. Radi sigurnosti za ljude, životinje i okoliš, oдавно se počelo primjenom ova dva ekstrakta koja se dodaju u hranu za životinje umjesto antibiotika. Rezultati su ohrabrujući.

Ključne riječi: Antimikrobijski agensi, kineske biljke, origano ulje, Dihidromirice

UVOD

Intenzivna proizvodnja hrane u Kini započela je ranih 80-ih godina i u relativno kratko vrijeme doživjela je vrlo brz razvoj. Danas je Kina jedna od velikih zemalja u svijetu koja proizvodi i prerađuje

Shi Bo; Istraživački institut za stočnu hranu, Kineska akademija poljoprivrednih znanosti, NR China, No. 12 Zhongguancun South Street, Haidian District, Peking 100081; Feed Research Institute, Chinese Academy of agricultural Sciences, PR China, No. 12 Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081 Email:shibo@mail.caas.net.cn.

hranu. Količine mesa, ribe, jaja i mlijeka pokrivaju potrebe domaćeg tržišta, dok se meso peradi izvozi u brojne druge zemlje (Japan, Južna Koreja). Na slici 1. prikazana je godišnja proizvodnja hrane u Kini u razdoblju od 1990. do 2001.

Slično kao i druge zemlje, Kina se susreće s problemom zloupotrebe antibiotika u hrani za životinje. Antibiotici se koriste za liječenje bolesti i za poboljšanje zdravlja životinja, ali se mnogi od njih koriste u niskim koncentracijama radi pospješivanja rasta i stoga se nazivaju "promotorima rasta". To su isti antibiotici ili vrlo slični onima koji se koriste u ljudi. U uzgoju životinja obično se postiže 3 do 5% poboljšanja koeficijenta rasta i konverzije hrane dodavanjem antibiotika u hranu za životinje. Svojstva antimikrobijskih agensa da

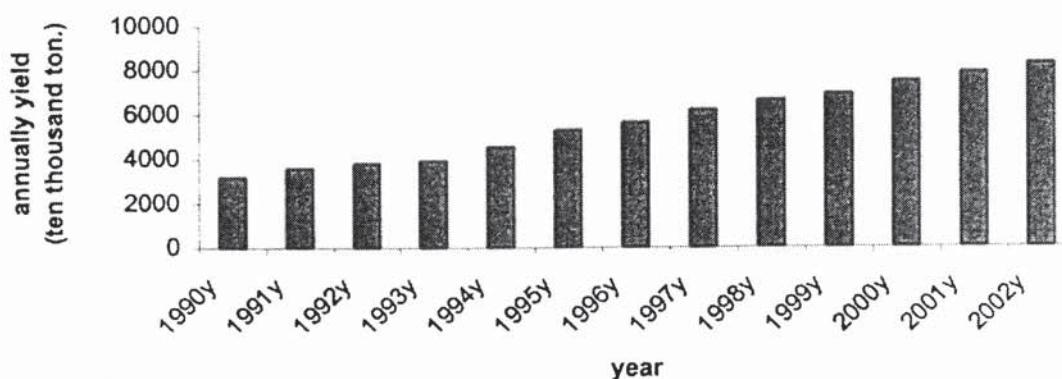
dodavaju hrani za životinje u mnogim zemljama. EU će zabraniti upotrebu svakog antibiotika "promotora rasta". Kina je donijela odgovarajuću zakonsku regulativu i objavila da će proizvoditi "organske" proizvode životinjskog podrijetla. Vlada Republike Kine potiče proizvođače da proizvode neškodljivo i zdravstveno ispravno meso, jaja i mlijeko.

ISTRAŽIVANJA I RAZVOJ ANTIMIKROBIJSKIH SREDSTAVA U HRANI DOBIVENIH IZ BILJA U KINI

Kina je velika poljoprivredna zemlja s iznimno velikim brojem stanovnika. Opskrba hranom oduvijek je bila njen veliki problem. Kina je vrlo brzo

Figure 1. Annually yield of feed from 1990 to 2002 in China

Slika 1. Godišnja proizvodnja hrane u Kini u razdoblju 1990-2001



pospješuju rast životinja uzgajanih na farmama otkrivena su još kasnih 1940-tih godina (Doyle, 2001.). Praksa dodavanja supertapijskih doza u hranu za životinje vrlo je uspješno usvojena i uskoro je postala sastavni dio razvojnih hranidbenih strategija za sve farmske životinje. Međutim, tek je nakon izdavanja Swan Izvješća u 1968.g. skrenuta pozornost na opasnost razvoja otpornosti bakterija na neke antibiotike i moguće štetno djelovanje kako na ljudsko tako i životinjsko zdravlje. Od tada sve više raste zabrinutost za prijenos otpornih bakterija, što je dovelo do toga da se preispita upotreba antibakterijskih sredstava u hrani za životinje pa čak i prekine s njihovom daljnjom upotrebom. EU je zabranila upotrebu nekoliko glavnih "promotora rasta" kao što su virginiamicin, spiramicin, tilosin bacitracincink u srpnju 1999. Ti se antibiotici obično

razvila agrikulturu i akvakulturu životinja da bi zadovoljila potrebe za hranom i poboljšala razinu života svojih stanovnika. Praksa je potvrdila da je intenzivan način hranjenja značajan za razvoj kineske proizvodnje životinja i riba. Intenzivan način hranjenja nameće i stimulira sve veću upotrebu antibiotika "promotora rasta" u Kini. Proizvodnja antibiotika godinama se sve više povećavala.

Mnoge su zemlje počele smanjivati, ograničavati i zabranjivati upotrebu takvih antibiotika u hrani za životinje. Kina je zadužila svoje istraživače da ispituju učinak kineskih biljnih aditiva kao i drugih zamjena za antibiotike. Ljekovite trave i bilje od davnina se koriste u Kini za liječenje raznih bolesti i poboljšanje ljudskog zdravlja. U Kini postoji više od 12000 vrsta bilja koje se koriste kao ljekovita sredstva i Kina je prva

zemlja u svijetu koja je započela primjenu ljekovitog bilja u hrani za životinje. To može zahvaliti svom velikom iskustvu u primjeni ljekovitog bilja u svrhu liječenja. Danas se više od 5000 vrsta ljekovitog bilja može koristiti u proizvodnji dodatka hrani za životinje (Yaohua i Guangwen, 2001.). U usporedbi s antibioticima, koji se dodaju hrani za životinje, kineski biljni aditivi imaju mnoga bolja svojstva (Qianjun, 2001.).

- Neprerađeni (sirovi)
- Brojne učinke
- Neškodljivost
- Dobri su za okoliš

Dobivaju se iz prirodnih biljaka. Dokazano je da dobro djeluju na zdravlje ljudi i životinja, a ljudi ih lako prihvataju. Sastav kineskih biljaka je kompleksan. Glavni su sastojci alkaloidi, saponini, bjelančevine, peptidi, aminokiseline, oligosaharidi, tanini, masnoće, organske kiseline, pigmenti, vitamini, eterična ulja, elementi u tragovima. Kinesko bilje ima brojne specifične funkcije, na primjer, povećava imunitet životinja, sprječava i liječi razne bolesti, pospješuje rast, poboljšava kakvoću proizvoda životinjskog podrijetla itd. Iz duge povijesti poznavanja primjene ljekovitog bilja poznato je da je praktički neškodljivo za ljudsko i životinjske zdravlje. Mehanizam djelovanja razlikuje se od onog antibiotika za pospješivanje rasta. Bakterije ne razvijaju otpornost na njih. Ostaci bilja u tijelima životinja su neznatni. Njihova prisutnost u fecesu životinja ne djeluje štetno na tlo, vodotokove i okoliš. Oko 300 vrsta kineskog bilja koriste se kao dodaci hrani za životinje (Juntao, 2003.). U skladu s različitim sastavom i ljekovitim učincima, ovi se dodaci koriste za različite namjene: za poboljšanje imunog statusa životinja, kao antimikrobijska sredstva, za suzbijanje crijevnih parazita, povećanje apetita, povećanje nesivosti i mlječnosti, poticanje rasta, sprječavanje i liječenje bolesti, te za očuvanje svježine hrane. Kao alternativa antibioticima u Kini se koriste biljni dodaci u hrani za životinje.

Premda su s biljnim dodacima stočnoj hrani postignuti bolji rezultati nego s antibioticima, znanstvena istraživanja mehanizma djelovanja tek su započeta. Učinci nekih biljnih aditiva nisu postojani. S primjenom ovih proizvoda još uvijek ima nekih problema u praksi. Brojni kineski istraživači proučavaju djelatne sastojke ljekovitog

bilja kako bi ih mogli upotrebiti kao zamjenu za antibiotike. Istovremeno, koriste se neke suvremene tehnologije i eksperimentalne metode, kao što su SFECO₂, membranska separacija, te HSCCC za ekstrakciju i purifikaciju djelatnih sastojaka bilja. Kako koristiti ekstrakte i kako ih napraviti da odgovaraju određenim proizvodnim procesima stočne hrane, to se sada traži od istraživača u Kini. Kako bi udovoljili potrebama opskrbe dovoljnim količinama ljekovitog bilja, kineski su istraživači započeli s ispitivanjem novih tehnologija pripreme djelatnih sastojaka bilja pomoću molekularne biotehnologije bilja i tehnologije kulture tkiva bilja.

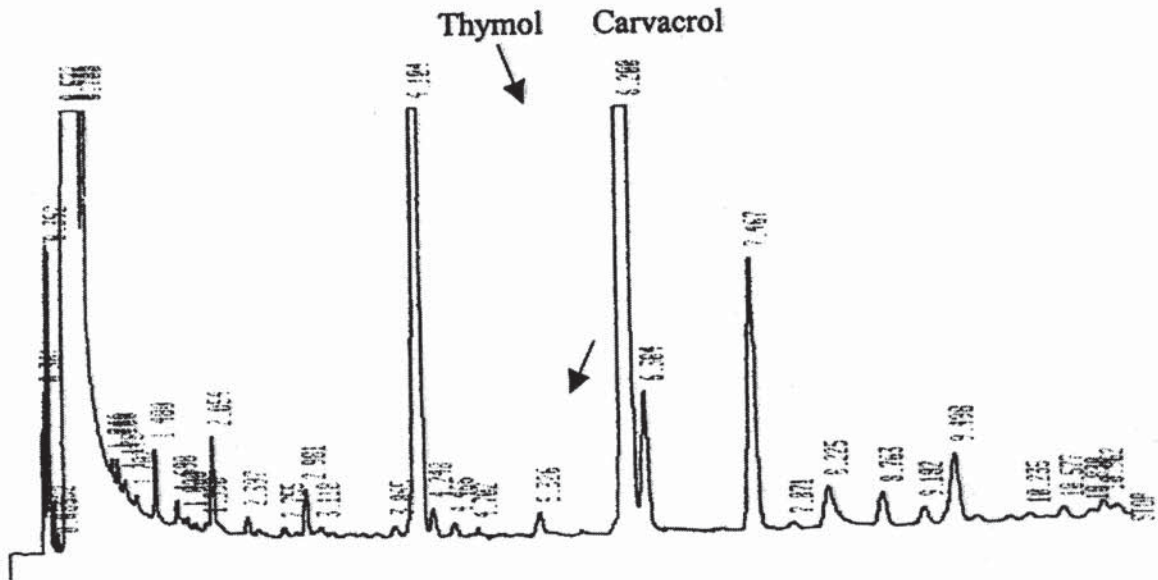
PRIMJERI ANTIMIKROBIJSKIH SREDSTAVA U HRANI ZA ŽIVOTINJE EKSTRAHIRANIH IZ KINESKOG BILJA

Istraživači ljekovitih biljnih dodataka od 2000. g. će proučavati mikro-elemente. Jedno od najvažnijih pitanja je kako razumno koristiti ograničene resurse bilja. Iako su količine ljekovitog bilja u Kini mnogo veće nego u drugim zemljama, polako dolazi do smanjenja tih resursa. Svake se godine povećava količina bilja koje se koristi. U radu su opisana nedavno provedena istraživanja ekstrakata *Oregano* i *Yaos ampelosis grossedetala* kao antimikrobijskih sredstava.

Origano ulje

Origano ulje se dobiva ekstrakcijom iz *Oreganum vulgare* L. tradicionalne kineske biljke. *Origano* se u Kini još naziva *Zilicao* ili *Tuxianlei* ili *Baihuayinchen* (Quinghua i sur., 2000.). Raste u mnogim područjima i provincijama kao što su *Xnjiang*, *Gansu*, *Shanxi*, *Henan*, *Jiangxi*, *Hubei*, *Hebei* te *Shangdong* provincija. Ova se biljka uglavnom koristi za liječenje proljeva i enteritisa. Kao sirovina za pokuse korišten je veći dio biljke iz provincije *Jiangxi*, odnosno lišće i peteljke, osušeni na sobnoj temperaturi. Postoje dvije metode za ekstrakciju *origano ulja*: destilacija parom i SFECO₂. Rezultati dviju ekstrakcija prikazani su na sljedećim slikama onako kako su zabilježeni plinskim kromatografom (GC).

Slika 2. Kromatogram origano ulja ekstrahiranog pomoću SFECO₂
Figure 2. GC of Oregano oil extracted by SFECO₂



SFECO₂ uvjeti: Pritisak ekstrakta, 300 psi

Vrijeme ekstrakcije, 4 sata

Brzina protoka CO₂, 2ml/min

Veličina čestica sirovine, 60-80 meša

GC uvjeti: Kolona, HP-5 (dužina 25m; unutrašnji promjer 0,32mm)

Stacionarna faza, unakrsno povezani PH.ME.Sillcone

Debljina filma, 0,25 µm

Temperatura peći, temperatura programiranja od 80° do 220° po 5°/min

Temperatura injektora 250°

Temperatura detektora, 270°

Detektor, tip plamene jonizacije

Plin nosač, dušik

Injektirani volumen, 1,0 µl

Brzina protoka plina nosača, 3,6 ml/min

SFECO₂ conditions: Extract pressure, 300 psi

Extract time, 4h

Flow rate of CO₂, 2ml/min

Raw material size, 60-80 mesh

GC conditions: Column, HP-5 (length 25m; internal diameter 0.32mm)

Stationary phase, Crosslinked PH. ME. Sillcone

Film thickness, 0.25µm

Oven Temperature, temperature programming from 80 to 220 at 5/min

Injector temperature, 250°

Detector temperature, 270°

Detector, flame ionization type

Carrier gas, nitrogen

Volume injected, 1,0 µl

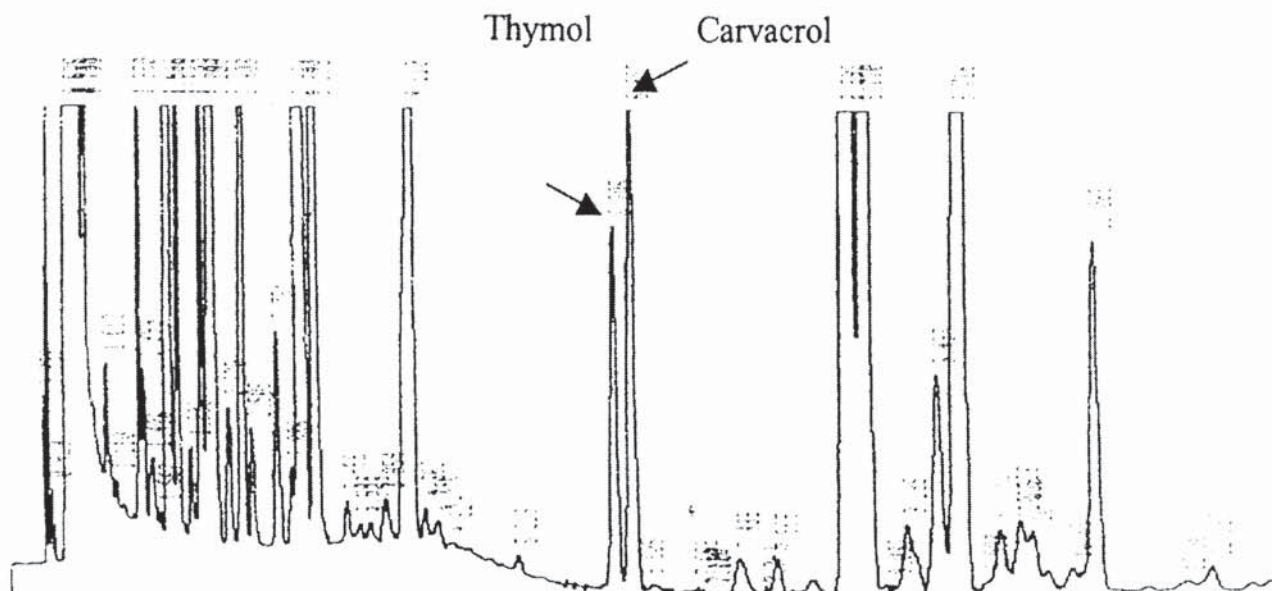
Flow rate of carrier gas, 3,6 ml/min

Sadržaj timola i karvakrola u uzorcima ekstrahiranim pomoću SFECO₂ mijenja se prema uvjetima SFECO₂. Boja tih uzoraka je tamnija od one uzoraka dobivenih destilacijom parom. Komponente tih uzoraka pripremljenih destilacijom parom skoro su jednake.

Origano ulje ima poseban okus i lako hlapi. Skoro sve vrste životinja u početku ne vole njegov

okus, pa to može imati utjecaja na uzimanje hrane. Da bi se to izbjeglo pripremljene su nove mikrokapsule origano ulja i smanjen njegov intenzivan okus i hlapljivost. Koristi se u liječenju proljeva u životinja, te u prevenciji i liječenju kokcidioze peradi. Dodaje se u hranu za stoku u koncentraciji od 0,1 do 0,2%. Doza za prevenciju i liječenje kokcidioze peradi iznosi 0,2%, odnosno 0,3 do 0,4%.

Slika 3. Kromatogram origano ulja ekstrahiranog destilacijom parom
Figure 3. GC of Oregano oil extracted by Steam Distillation



GC uvjeti:

Kolona, HP-5 (dužina 25 m; unutrašnji promjer 0,32 mm)
Stacionarna faza, unakrsno povezani PH. ME. Sillcone
Debljina filma, 0,25 µm
Temperatura peći, temperatura programiranja od 80° do 220° po 5°/mm
Temperatura injektora, 250°
Temperatura detektora, 270°
Detektor, tip plameni jonizator
Plin nosač, dušik
Injektirani volumen, 1.0 µl
Brzina protoka plina nosača, 3.6 ml/min

GC conditions:

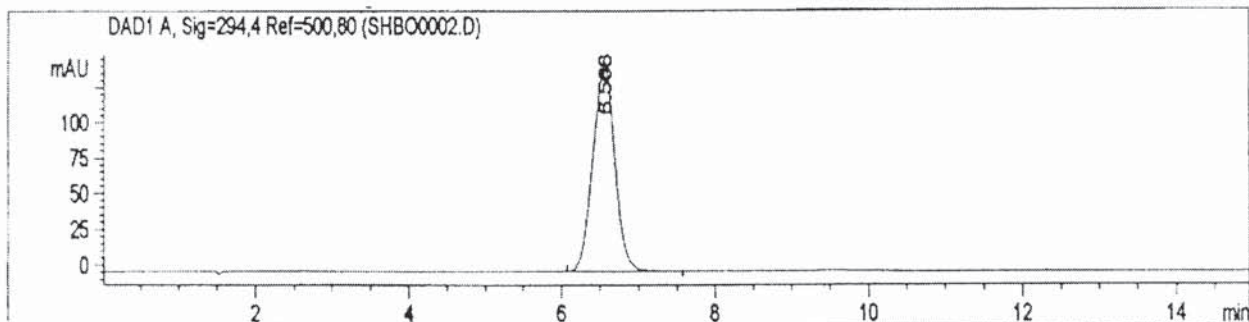
Column, HP-5 (length 25m; internal diameter 0.32 mm)
Stationary phase, Crosslinked PH. ME. Sillcone
Film thickness, 0.25µm
Oven Temperature, temperature programming from 80 to 220 at 5/min
Injector temperature, 250°
Detector temperature, 270°
Detector, flame ionization type
Carrier gas, nitrogen
Volume injected, 1.0 µl
Flow rate of carrier gas, 3.6 ml/min

Dihidromirice

Dihidromirice se dobiva iz *Amplopsi grossedentatahy*, poznate ljekovite biljke. Od davnina se *Amplopsi grossedentatahy* koristi u Kini za liječenje bolesti dišnih organa, groznica i prehlada, te hepatitisa (Axing i Xiaomei, 1998.). Ova je biljka veoma rasprostranjena u provincijama

Guanxi, Yunnan, Guangdong, Hunan i Fujian. U pokusu su kao sirovina korišteni su stariji listovi. Budući da je etanol neškodljiv za ljude i životinje, koristi se kao otapalo za ekstrakciju. Ekstrakt ovog lišća je uglavnom Dihidromirice. Rezultati prvih pokusa pokazali su da je ovaj proizvod koristan za sprječavanje i liječenje kašlja u svinja. Na sljedećim slikama su prikazani rezultati HPLC dihidromiricea i ekstrakta *Amplopsi grossedentatahy*.

Slika 4. HPLC standardnog uzorka dihidromirice pripremljenog u našem laboratoriju
Figure 4. HPLC of dihydromyric standard sample prepared in our lab.



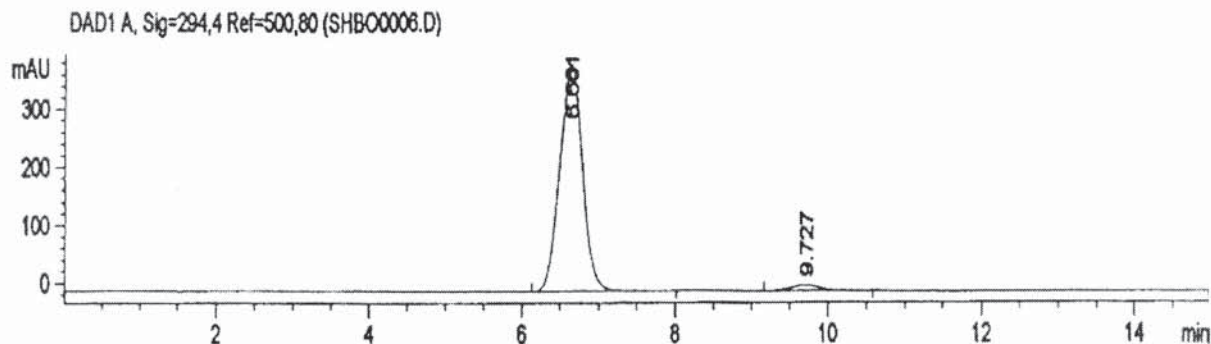
HPLC uvjeti:

Kolona, RPC₁₈ 150mm x 4,6mm i.d.
 Pumpa, HP1050
 Detektor, HP 1040 A diode UV294nm
 Temperatura kolone, 30°
 Mobilna faza, metanol/voda = 24:76 (v/v kontrola pH s fosfornom kis.)
 Brzina protoka, 1 ml/min.
 Injektirani volumen, 10 µl

HPLC conditions:

Column, RPC₁₈ 150mm x 4.6mm i.d.
 Pump, HP1050
 Detector, HP 1040A diode array UV 294 nm
 Column temperature, 30°
 Mobile phase, methanol/water = 24:76 (v/v control the pH with phosphoric acid)
 Flow rate, 1 ml/min.
 Volume injected, 10 µl

Slika 5. HPLC uzorka ekstrahiranog otopinim etanola
Figure 5. HPLC of the sample extracted by ethanol solution



HPLC uvjeti:

Kolona, RPC₁₈ 150mm x 4,6mm i.d.
 Pumpa, HP1050
 Detektor, HP 1040 A diode UV294nm
 Temperatura kolone, 30°
 Mobilna faza, metanol/voda = 24:76 (v/v kontrola pH s fosfornom kis.)
 Brzina protoka, 1 ml/min.
 Injektirani volumen, 10 µl

HPLC conditions:

Column, RPC₁₈ 150mm x 4.6mm i.d.
 Pump, HP1050
 Detector, HP 1040A diode array UV 294 nm
 Column temperature, 30°
 Mobile phase, methanol/water = 24:76 (v/v control the pH with phosphoric acid)
 Flow rate, 1 ml/min.
 Volume injected, 10 µl

Iz slika 4. i 5. vidljivo je da je glavni sastojak uzorka dihidromirice, a manjim dijelom mirice.

ZAKLJUČAK

Razvoj bakterija otpornih na antibiotike u svakom je slučaju velika prijetnja ljudskom zdravlju. U većini zemalja sada se smanjuje ili ograničava dodavanje i primjena antibiotika "promotora rasta" u hrani za životinje. U središtu pozornosti mnogih zemalja su istraživanja u cilju pronalaska alternativnih sredstava za pospješanje rasta umjesto antibiotika. Ispitivanja i primjene antimikrobijskih sredstava iz prirodnog bilja imat će ubrzan razvoj.

LITERATURA

1. M. Ellin, Doyle (2001): Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. FRI Briefings April 1-7.
2. William H. Close (2000): Producing Pigs without Antibiotic Growth Promoters. *Advances in Pork Production*, vol. 11:47-56.
3. Sun Yaohua, Zhang Guangwen, (2001): Development and Application of Chinese Herb Additives used into Animal Feeds *Jiang Xi Feed*, 1:18-20.
4. Li Qianjun, Mu Shuqin, Wang Wenjie (2001): Development and Application of Replacement of Antibiotics in the Feed of Animal and Poultry. *Ecology of Domestic Animal* 22(3):42-47.
5. Zhang Juntao, Wang Jianhua, Chang Wenhuan (2003): Development and Application of Chinese Herb Additives. *Livestock and poultry Industry* 115(2):40-42.
6. Lin Qinghua, Li Yan, Wei Guowei (2000): Antibiotic Effect of Total Extract of *Origanum Vulgare L.* And the *Xianglian*. *Amino Acid & Biotic Resource* 22(1):31-34.
7. Yuan Axing, Huang Xiaomei (1998): Studies on chemical Constituents in Aerial Part of *Ampelosis Grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang. *J. of Chinese herb medicine*, 23(6):359-360.

ABSTRACT

Food safety and feed safety are very important for human beings. Feed additives, especially medical feed additives, have a very important influence on the qualities of eggs, milk and meat.

As an example, in animals antibiotics are used at low levels as additive to animal feed to promote growth and thus referred to as "growth promotion" antibiotics. These antibiotics are the same or very similar to those used in man. In animals, as in man, antibiotics are also used to treat bacterial diseases. The widespread use of antibiotics has been recognized to lead to the development of antibiotic-resistant bacteria and is a danger for man. The use of "growth promotion" antibiotics in animal feeds will be banned all over Europe in 2006. This paper the research on reports of the feed antimicrobials extracted from Chinese plants such as *Oregano* oil, *Ampelosis Grossedetala* Flavonoids. *Oregano* oil is extracted from Chinese wild *Origanum vulgare* Linnaeus by water vapour. Wild *Origanum vulgare* Linnaeus has been used as a herb in China for several hundred years, and has a good curative effect on intestinal diseases. *Ampelosis Grossedetala* is a kind of wild tea growing in many provinces in China. There are about 40 percent flavonoids in the leaf of this tea. The flavonoids extracted from this tea are good for curing man's respiratory organs diseases. As safety for animal, man and environment, these two extracts are used in animal feeds instead of antibiotics. The prospects of these feed antimicrobials are promising.

Key word: Antimicrobial, Chinese plants, *Oregano* oil, *Dihydromyricice*