

BARBARA WÓJCIK-STOPCZYŃSKA, BARBARA JAKUBOWSKA

OCENA *IN VITRO* AKTYWNOŚCI PRZECIWRZYBOWEJ NIEKTÓRYCH SUSZONYCH PRZYPRAW ZIOŁOWYCH

Streszczenie

W pracy oceniono skład chemiczny oraz aktywność przeciwrzybową suszonych ziół przyprawowych – bazylii, oregano, rozmarynu i tymianku. Susze zakupiono w sieci handlowej w opakowaniach jednostkowych. W wymieszanym i rozdrobnionym materiale oznaczono zawartość: suchej masy, białka ogółem, cukrów ogółem, polifenoli ogółem i olejków eterycznych. Do oceny aktywności przeciwrzybowej użyto 12 szczepów grzybów: *Alternaria alternata*., *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium cyclopium* oraz *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*, *E. repens*, *E. rubrum*. W przypadku grzybów z rodzaju *Eurotium* stosowano podłoże Agar DG18, a w pozostałych – Malt Extract Agar. Na podłożach zawierających dodatek suszu (1 %) prowadzono doświadczalne hodowle grzybów, a na podłożach bez suszu – hodowle kontrolne. Próbę kontrolną pozytywną stanowił benzoesan sodu (0,05 %). W 3. 6. i 9. dobie inkubacji mierzono średnice kolonii doświadczalnych oraz kontrolnych i obliczano procentową inhibicję wzrostu grzybów powodowaną przez susze. Stwierdzono, że aktywność przeciwrzybowa była zróżnicowana w zależności od rodzaju suszu, gatunku grzyba i czasu inkubacji. W 9. dniu doświadczenia susz z oregano odznaczający się największą zawartością olejku (2,40 % s.m.) i dużą zawartością polifenoli (4,06 % s.m.) powodował istotnie największe średnie zahamowanie wzrostu zarówno grzybów *Eurotium* ssp. (95,5 %), jak i pozostałych grzybów (90,2 %). Susz bazyliowy o najmniejszej zawartości olejku i polifenoli, a największej – białka ogółem stymulował wzrost części grzybów. Badane susze powodowały największe zahamowanie wzrostu kolonii *A. fumigatus*, *A. alternata* i *E. amstelodami*, a najmniejsze – *A. niger* i *E. rubrum*. Hamowanie wzrostu grzybów malało wraz z czasem inkubacji, ale różnice między średnim zahamowaniem wzrostu grzybów w 6. i 9. dniu hodowli były nieistotne. Susze z oregano, tymianku i rozmarynu efektywniej hamowały wzrost kolonii grzybów niż benzoesan sodu.

Słowa kluczowe: bazylia, oregano, rozmaryn, tymianek, właściwości przeciwrzybowe

Wprowadzenie

Do powszechnie znanych, olejkodajnych ziół z rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*) należą: bazylija (*Ocimum basilicum* L.), oregano (lebiodka, *Origanum vulgare* L.), rozmaryn (*Rosmarinus officinalis* L.) i tymianek (*Thymus vulgaris* L.). Od wieków wykorzystywane są ich właściwości przyprawowe, a także lecznicze i kosmetyczne. Proces suszenia nadaje ziołom trwałość i prowadzi do zwielokrotnienia ogólnej zawartości suchej masy oraz związków biologicznie czynnych [1]. Do aktywnych składników ziół należą m.in. flawonoidy, garbniki, glikozydy, saponiny, alkaloidy, sterole i olejki eteryczne [2]. Składniki aktywne kształtują nie tylko smak i zapach ziół, ale także różne ich właściwości, m.in. antyoksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe [11, 25]. Rosnąca świadomość konsumentów i ekologiczny trend powodują, że na przestrzeni ostatnich lat prowadzi się liczne badania aktywności ziół. Ich efektem może być chociaż częściowe zastąpienie przez substancje naturalne szkodliwych dla zdrowia i środowiska środków chemicznych stosowanych w ochronie roślin i konserwacji żywności [3, 7, 18]. Częstym obiektem badań są olejki eteryczne [10, 11, 13, 18]. Niektóre z nich stosowane są m.in. w ochronie produktów ogrodniczych [28]. Uwagę badaczy zwraca też aktywność przeciwdrobnoustrojowa proszków roślinnych [3, 6, 7], które mogą być stosowane m.in. jako naturalne zaprawy nasion [4, 16], mogą też stabilizować jakość mikrobiologiczną żywności mało przetworzonej [8].

W prowadzonych dotychczas badaniach wykazano przeciwgrzybową aktywność olejków bazylii, tymianku, oregano i rozmarynu [13, 18], natomiast właściwości przeciwgrzybowe suszy otrzymanych z tych ziół są mniej rozpoznane.

Celem pracy było określenie wpływu suszy ziołowych – bazylii, oregano, rozmarynu i tymianku, wprowadzonych do podłoża hodowlanego, na wzrost grzybów z rodzajów *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium* i *Penicillium*. Podjęto też próbę oceny aktywności przeciwgrzybowej badanych ziół w odniesieniu do ich składu chemicznego.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym były suszone przyprawy ziołowe – bazylija, oregano (lebiodka), rozmaryn i tymianek pochodzące z sieci handlowej. Zakupiono je w opakowaniach jednostkowych, w ilości zapewniającej uzyskanie próby każdego suszu o masie ok. 300 g. Susze pochodziły z jednej krajowej firmy, a każdy jego rodzaj reprezentował tę samą partię produkcyjną. Przed wykonaniem badań próbki jednostkowe każdego rodzaju suszu mieszano, rozdrabniano w młynku laboratoryjnym i przesiewano przez sito o oczkach 1 mm. W tak przygotowanym materiale oznaczano skład chemiczny oraz aktywność przeciwgrzybową.

Ocena składu chemicznego suszu obejmowała oznaczanie zawartości: suchej masy (metodą suszarkowo-wagową), białka ogółem (jako % suchej masy) – metodą Kjeldahla oraz cukrów ogółem – metodą Luffa-Schoorla [15]. W suszach oznaczano też zawartość olejków eterycznych i polifenoli ogółem. Olejki wyodrębniano metodą hydrodestylacji zgodnie z normą [23] i wyrażano jako (% v/m) w stosunku do suchej masy. Polifenole ogółem oznaczano metodą Folina-Ciocalteu’a [27] polegającą na redukcji zawartego w odczynniku Folina-Ciocalteu’a molibdenu(VI) do molibdenu(V) przez związki fenolowe obecne w badanej próbce, w wyniku czego powstaje niebieski związek. Pomiaru intensywności zabarwienia próbek dokonywano w spektrofotometrze Helios- γ (Thomas Scientific, USA), przy długości fali $\lambda = 750$ nm. Do sporządzenia krzywej wzorcowej używano roztworu kwasu galusowego. Zawartość polifenoli ogółem wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy jako % suchej masy.

Właściwości przeciwgrzybowe oceniano w stosunku do 12 gatunków grzybów, w tym 7 gatunków należących do rodzajów: *Alternaria* (*A. alternata*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium* (*P. cyclopium*), *Cladosporium* (*C. herbarum*) i *Fusarium* (*F. oxysporum*) oraz 5 gatunków grzybów kserofilnych z rodzaju *Eurotium* (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*, *E. repens*, *E. rubrum*). Szczepy grzybów pochodziły z kolekcji własnej, a także z zakupu z kolekcji Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej i Banku Patogenów Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Do oceny aktywności przeciwgrzybowej zastosowano dwa podłoża: Agar DG18 (firmy BTL Sp. z oo., Łódź, Polska) o $a_w = 0,95$, na którym prowadzono hodowle grzybów kserofilnych *Eurotium* ssp. [10] oraz agar na brzeczce (Malt Extract Agar – MEA,) Oxoid, Wlk. Brytania), który stosowano do hodowli pozostałych szczepów [26]. Podłoża MEA i DG18 z dodatkiem suszu w ilości 1 % (m/v) oraz bez suszu (kontrolne) rozlewano na płytki Petriego o średnicy 90 mm. Po zestaleniu inokulowano je centralnie poprzez wprowadzenie 10 μ l zawiesiny zarodników i grzybni [10^6 jtk \cdot cm $^{-3}$] sporządzonej z 10-dniowych kultur grzybów. Zaszczepione płytki umieszczano w termostacie w temp. 25 °C i prowadzono hodowle przez 9 dni. Co 3 dni mierzono średnice kolonii [mm] i na podstawie ich wielkości obliczano procent zahamowania wzrostu kolonii (I) przez susze, według formuły:

$$I = [(K - B) : K] \times 100,$$

gdzie: K – średnica kolonii kontrolnej, B – średnica kolonii doświadczalnej (na podłożu z dodatkiem suszu) [3]. Równolegle, jako próbę kontrolną pozytywną, prowadzono hodowlę grzybów na podłożach MEA i DG18 zawierających benzoosan sodu (cz.d.a., PPH Stanlab, Polska) w dawce 0,05 %. Susze dodawano do podłoży przed ich pasteryzacją w aparacie Kocha, a benzoosan sodu po pasteryzacji.

Wszystkie oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach. Do statystycznej oceny wyników zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji w programie FR-ANALWAR. Istotność różnic między wartościami średnimi szacowano testem Tukeya przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Przyprawy ziołowe odznaczały się zróżnicowaną zawartością badanych składników (tab. 1). Susze oreganowy i tymiankowy zawierały istotnie więcej suchej masy (odpowiednio: 93,52 i 93,48 %) niż rozmarynowy i bazyliowy. Istotnie najwięcej białka ogółem stwierdzono w suszu bazyliowym (25,27 % s.m.), istotnie najwięcej cukrów ogółem występowało w tymianku (8,54 % s.m.), oregano odznaczało się istotnie największą zawartością olejku (2,40 % s.m.), a rozmaryn – polifenoli (4,25 % s.m.).

Tabela 1. Zawartość wybranych składników w badanych przyprawach ziołowych
Table 1. Contents of selected components in dried herbs studied

Rodzaj suszu Type of dried herb	Sucha masa Dry matter [%]	Białko ogółem [% s.m.] Total proteins [% d.m.]	Cukry ogółem [% s.m.] Total sugars [% d.m.]	Polifenole ogółem [% s.m.] Total polyphenols [% d.m.]	Olejek eteryczny [% s.m.] Essential oil [% d.m.]
Bazyliowy Basil	91,76 ^b ± 0,12	25,27 ^a ± 0,05	2,43 ^c ± 0,05	2,90 ^d ± 0,07	1,20 ^d ± 0,07
Oreganowy Oregano	93,52 ^a ± 0,08	9,85 ^c ± 0,11	6,61 ^b ± 0,09	4,06 ^b ± 0,09	2,40 ^a ± 0,05
Rozmarynowy Rosemary	90,97 ^c ± 0,09	8,22 ^d ± 0,10	2,62 ^c ± 0,06	4,25 ^a ± 0,09	2,20 ^b ± 0,04
Tymiankowy Thyme	93,48 ^a ± 0,11	18,41 ^b ± 0,08	8,54 ^a ± 0,08	3,64 ^c ± 0,06	1,90 ^c ± 0,05

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenie standardowe / Table shows mean values ± standard deviation; $n = 3$; a, b, c, d – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly $p \leq 0,05$.

Zawartość suchej masy w badanych suszach odpowiadała wymaganiom norm [22, 24] i była zbliżona do wyników Adámkovej i wsp. [1]. W ziele różnych gatunków ziół udział białka ogółem wynosi $5,79 \div 8,27$ %, a cukrów ogółem – $0,29 \div 2,05$ % [9]. Zawartość białka w bazylii ocenianej w pracy była większa niż w bazylii ($13,4 \div 20,0$ % s.m.) badanej przez Nurzyńską i wsp. [21]. Zawartość polifenoli ogółem w suszu bazyliowym, oreganowym i tymiankowym była również większa niż w prób-

kach tych ziół z rynku krajowego analizowanych przez Modnickiego i Balcerka [20], ale kolejność malejącej średniej zawartości polifenoli w układzie „oregano < tymianek < bazylią” w badaniach własnych była zgodna z wynikami tych autorów. Większą zawartość polifenoli w rozmarynie w porównaniu z tymiankiem i bazylią wykazali Stanciu i wsp. [29]. Zawartość polifenoli oznaczona w niniejszej pracy w oregano była natomiast mniejsza, a w tymianku większa niż stwierdzona przez Adamkovą i wsp. [1] (odpowiednio: $4,73 \div 4,83$ i $2,35 \div 2,44$ % s.m.). Zawartość olejku oznaczona w suszu bazyliowym i tymiankowym była zgodna z wymaganiami norm [22, 24], a w przypadku tymianku odpowiadała też doniesieniom wskazującym, że tymianek dostępny w handlu w Polsce zawierał $1,12 \div 2,99$ % olejków [19]. Na dużą zawartość olejku w rozmarynie (do 1,7 ml w 100 g świeżej masy) wskazują Stefanovits-Bányai i wsp. [30]. W oregano zawartość olejku jest zmienna w zależności od podgatunku, a jego zawartość oznaczona w pracy była zbliżona do ilości tego związku w *O. vulgare* ssp. *hirtum* [13].

Stwierdzone w pracy zróżnicowanie zawartości badanych składników w suszonych ziołach przyprawowych wynikało z różnej ich zawartości w materiale świeżym, w którym koncentracja składników odżywczych i biologicznie czynnych zależy istotnie od gatunku ziół [9]. Na skład chemiczny ziół wpływają też inne czynniki, m.in. ich pochodzenie, warunki siedliska i uprawy [19, 30, 21], dlatego występują różnice zawartości składników oznaczanych przez różnych autorów w ziołach tych samych gatunków.

Susze ziołowe obecne w podłożach hodowlanych wywierały zróżnicowany wpływ na wzrost kolonii użytych w badaniach grzybów (tab. 2). W 9. dniu inkubacji średnie wartości średnic kolonii grzybów rosnących na podłożach MEA i DG18 z dodatkiem suszu bazyliowego i benzoenu sodu były zbliżone do wartości średnic kolonii kontrolnych, wynoszących odpowiednio: 59,2 i 57,2 mm. W przypadku suszu bazyliowego średnie wartości średnic kolonii grzybów na podłożach MEA i DG18 (odpowiednio: 60,0 i 60,8 mm) były nieznacznie większe od kontrolnych, co wskazuje na przewagę stymulującego wpływu tego suszu na wzrost grzybów. Istotnie mniejsze od średnic kontrolnych były średnie wartości średnic kolonii grzybów na podłożach MEA i DG18 z rozmarynem (odpowiednio: 39,0 i 38,2 mm), tymiankiem (odpowiednio: 10,9 i 10,3 mm) i oregano (odpowiednio: 5,8 i 2,6 mm).

Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji wskazują (tab. 3), że wartość zahamowania wzrostu kolonii wyrażona w procentach zależała od rodzaju suszu w podłożu, gatunku grzyba oraz współdziałania obu tych czynników. Susz oreganowy obecny w podłożu DG18 i MEA powodował istotnie największe średnie zahamowanie wzrostu grzybów – odpowiednio: o 95,5 i 90,2 %. Duże było również średnie zahamowanie wzrostu grzybów na podłożach z tymiankiem – wynosiło odpowiednio: 82,0 i 81,6 %. Umiarkowanie hamował wzrost grzybów rozmaryn (średnio o 33,2 i 34,1 %), natomiast

susz bazyliowy obecny w podłożach DG18 i MEA stymulował wzrost grzybów hodowanych na nich (średnio o 6,3 i 1,4 %). Największą wrażliwość na działanie badanych suszy ziołowych wykazywały *E. amstelodami*, *A. fumigatus* i *A. alternata* (średnie zahamowanie ich wzrostu wynosiło odpowiednio [%]: 67,1, 58,9 i 57,6), a najmniejszą – *E. rubrum* i *A. niger*, których wzrost hamowany był średnio o 27,5 i 33,6 %.

Tabela 2. Średnice kolonii grzybów w 9. dobie wzrostu na podłożu kontrolnym i podłożach z dodatkiem suszu i benzoianu sodu

Table 2. Diameters of fungal colonies on the 9th day of growth on control medium and on media with dried herbs and sodium benzoate added

Gatunek grzyba Fungus species	Kolonia kontrolna Control colony [mm]	Średnice kolonii na podłożu z suszem Diameter of colony on medium with dried herbs [mm]				Średnica na podłożu z b. s. / Diameter on medium with s. b. [mm]
		bazylia basil	oregano oregano	rozmaryn rosemary	tymianek thyme	
<i>A. alternata</i>	54,0 ± 1,0	44,3 ± 1,1	3,0 ± 1,0	33,0 ± 1,0	10,7 ± 1,2	48,0 ± 0,8
<i>A. niger</i>	62,1 ± 2,1	79,7 ± 2,5	9,7 ± 1,5	55,3 ± 2,3	20,3 ± 1,5	60,0 ± 1,0
<i>A. flavus</i>	74,2 ± 1,5	72,0 ± 1,8	13,7 ± 0,8	44,0 ± 1,0	9,7 ± 0,8	74,0 ± 1,5
<i>A. fumigatus</i>	78,0 ± 1,0	67,3 ± 2,1	0,0 ± 0,0	41,7 ± 0,6	15,6 ± 1,6	76,5 ± 1,5
<i>C. herbarum</i>	32,0 ± 1,7	35,0 ± 1,7	0,0 ± 0,0	24,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0
<i>F. oxysporum</i>	75,0 ± 2,6	80,7 ± 3,0	9,3 ± 0,8	44,0 ± 1,0	9,0 ± 0,0	63,0 ± 2,1
<i>P. cyclopium</i>	39,1 ± 0,7	40,7 ± 0,6	4,7 ± 0,6	31,0 ± 1,7	6,0 ± 1,0	40,5 ± 1,2
\bar{x}	59,2 ^a ± 1,5	60,0 ^a ± 1,8	5,8 ^c ± 0,7	39,0 ^b ± 1,1	10,9 ^c ± 0,9	53,6 ^a ± 1,2
<i>E. amstelodami</i> *	53,0 ± 1,4	40,8 ± 1,2	0,0 ± 0,0	21,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0	52,0 ± 2,0
<i>E. chevalieri</i>	35,0 ± 1,0	43,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	24,7 ± 1,8	17,3 ± 0,7	34,3 ± 1,7
<i>E. herbariorum</i>	77,7 ± 1,8	73,9 ± 2,1	0,0 ± 0,0	43,0 ± 0,5	8,7 ± 0,6	70,0 ± 2,0
<i>E. repens</i>	57,0 ± 1,1	63,8 ± 2,0	4,3 ± 0,7	36,3 ± 1,7	8,3 ± 0,7	51,5 ± 1,5
<i>E. rubrum</i>	63,3 ± 1,0	82,6 ± 1,6	8,7 ± 0,6	66,0 ± 2,0	9,0 ± 0,5	59,0 ± 1,0
\bar{x}	57,2 ^a ± 1,3	60,8 ^a ± 1,6	2,6 ^c ± 0,0	38,2 ^b ± 1,4	10,3 ^c ± 0,7	53,4 ^a ± 1,6

Objaśnienia / Explanatory notes:

b.s. – benzoian sodu / s.b. – sodium benzoate; * – wzrost *Eurotium* ssp. prowadzono na agarze DG18, a pozostałych grzybów na Malt Extract Agar / growth of *Eurotium* ssp. was conducted on DG18 Agar and growth of other fungi on Malt Extract Agar.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenie standardowe / Table shows mean values ± standard deviation; n = 3; a, b, c – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$ / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly $p \leq 0.05$.

W badaniach wpływu poszczególnych suszy dodanych do podłoża MEA na wzrost badanych gatunków grzybów wykazano, że w 9. dobie inkubacji zahamowanie wzrostu grzybów przez susz oreganowy wynosiło od 81,5 % (*A. flavus*) do 100 % (*A. fumigatus* i *C. herbarum*) – rys. 1. Susz ten powodował istotnie największe zahamo-

wanie wzrostu *A. fumigatus*, *C. herbarum*, *A. alternata* i *A. niger*. Susz tymiankowy hamował wzrost grzybów w zakresie od 67,3 % (*A. niger*) do 88,0 % (*F. oxysporum*). Zahamowanie wzrostu *A. flavus*, *F. oxysporum* i *P. cyclopium* przez tymianek i oregano nie różniło się istotnie, ale tymianek hamował wzrost *A. flavus* i *F. oxysporum* silniej niż oregano. Hamujące działanie rozmarynu mieściło się w zakresie od 11,0 % (*A. niger*) do 46,5 % (*A. fumigatus*). Susz bazyliowy w niewielkim stopniu hamował wzrost *A. flavus*, *A. fumigatus* i *A. alternata* (3,0 ÷ 19,9 %), a stymulował wzrost czterech pozostałych szczepów w zakresie od 4,1 % (*P. cyclopium*) do 28,3 % (*A. niger*).

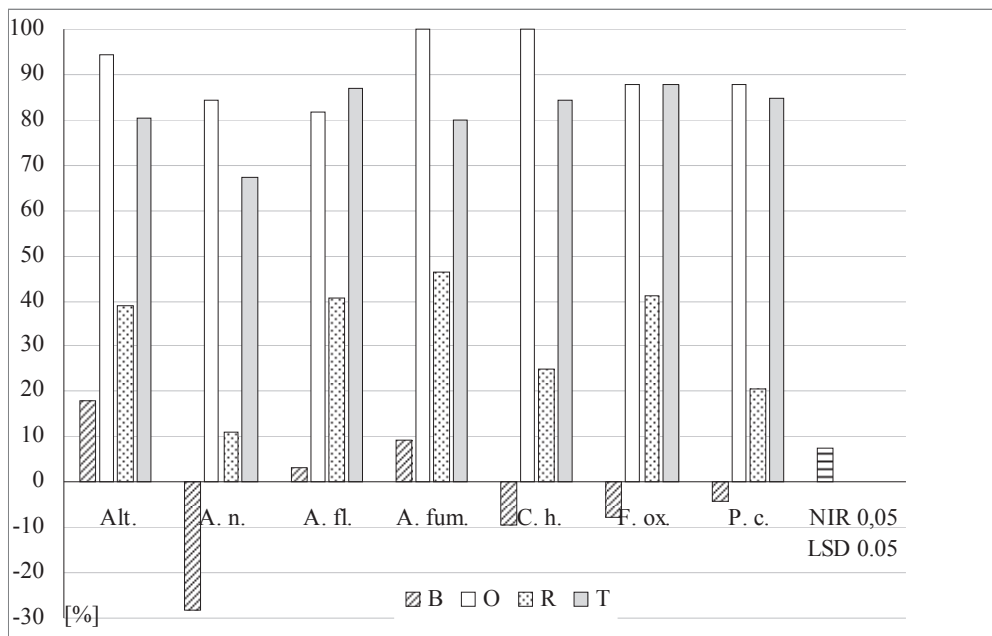
Tabela 3. Średnie zahamowanie wzrostu kolonii w 9. dobie hodowli, w zależności od rodzaju suszu w podłożu (I czynnik doświadczenia) oraz gatunku grzyba (II czynnik doświadczenia)

Table 3. Mean growth inhibition of colony on the 9th day of incubation depending on type of dried herbs in medium (1st factor of experiment) and on fungus species (2nd factor of experiment)

Czynnik doświadczenia Factor of experiment		Zahamowanie wzrostu Growth Inhibition [%]	NIR _{0,05} LSD _{0,05}	NIR _{0,05} dla interakcji LSD _{0,05} for interactions
Analiza wyników uzyskanych na agarze DG18 / Analysis of results obtained on DG18 Agar				
I – rodzaj suszu w podłożu I – type of dried herbs in medium	Bazylia / Basil	-6,3*	5,574	I/II = 12,463 II/I = 13,268
	Oregano / Oregano	95,5		
	Rozmaryn / Rosemary	33,2		
	Tymianek / Thyme	82,0		
II – gatunek grzyba II – fungus species	<i>E. amstelodami</i>	67,1	6,643	
	<i>E. chevalieri</i>	39,3		
	<i>E. herbariorum</i>	59,6		
	<i>E. repens</i>	40,5		
	<i>E. rubum</i>	34,3		
Analiza wyników uzyskanych na MEA / Analysis of results obtained on MEA				
I – rodzaj suszu w podłożu I – type of dried herbs in medium	Bazylia / Basil	-1,4	2,450	I/II = 6,483 II/I = 7,488
	Oregano / Oregano	90,2		
	Rozmaryn / Rosemary	34,1		
	Tymianek / Thyme	81,6		
II – szczep grzyba II – fungus species	<i>A. alternata</i>	57,6	3,744	
	<i>A. niger</i>	33,6		
	<i>A. flavus</i>	53,0		
	<i>A. fumigatus</i>	58,9		
	<i>C. herbarum</i>	40,0		
	<i>F. oxysporum</i>	52,5		
	<i>P. cyclopium</i>	47,3		

Objaśnienie / Explanatory note:

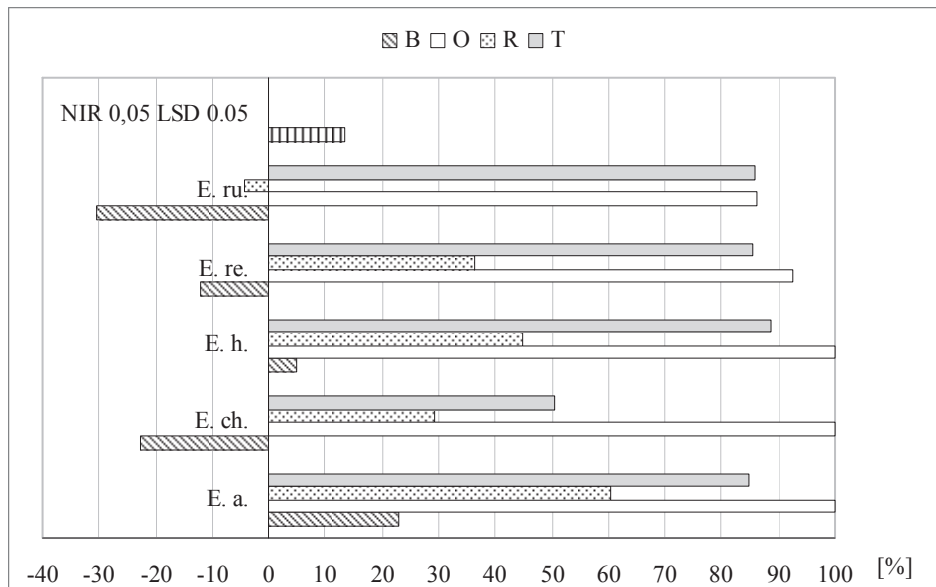
* – minus oznacza stymulowanie wzrostu grzybów / minus means growth stimulation of fungi



Rys. 1. Zahamowanie wzrostu grzybów: *A. alternata* – Alt., *A. niger* – A. n., *A. flavus* – A. fl., *A. fumigatus* – A. fum., *C. herbarum* – C.h., *F. oxysporum* – F. ox., *P. cyclopium* – P. c., przez badane susze (B – bazylia, O – oregano, R – rozmaryn, T – tymianek) w 9. dobie inkubacji

Fig. 1. Growth inhibition of: *A. alternata* – Alt.; *A. niger* – A. n.; *A. flavus* – A. fl.; *A. fumigatus* – A. fum.; *C. herbarum* – C.h.; *F. oxysporum* – F. ox.; *P. cyclopium* – P. c. by dried herbs studied (B – basil, O – oregano, R – rosemary, T – thyme) on the 9th day of incubation

Na podłożu DG18 z dodatkiem suszu oreganowego zahamowanie wzrostu grzybów wynosiło od 86,3 % (*E. rubrum*) do 100 % (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*) – rys. 2. Susz oreganowy powodował istotnie największe procentowe zahamowanie wzrostu *E. amstelodami* i *E. chevalieri*, natomiast wzrost grzybów pozostałych gatunków z rodzaju *Eurotium* hamował również najsilniej, ale wartości zahamowania ich wzrostu nie różniły się istotnie od otrzymanych w przypadku suszu tymiankowego. Na podłożu DG18 z suszem tymiankowym największym zahamowaniem wzrostu (88,8 %) odznaczał się *E. herbariorum*, a najmniejszym (50,6 %) – *E. chevalieri*. Susz rozmarynowy stymulował wzrost *E. rubrum* (o 4,3 %), a wzrost pozostałych szczepów hamował w zakresie od 29,4 % (*E. chevalieri*) do 60,4 % (*E. amstelodami*). Susz bazyliowy nieznacznie hamował wzrost *E. herbariorum* (4,9 %) i *E. amstelodami* (23,0 %), a stymulował wzrost *E. repens* (o 11,9 %), *E. chevalieri* i *E. rubrum* (o 30,5 %).

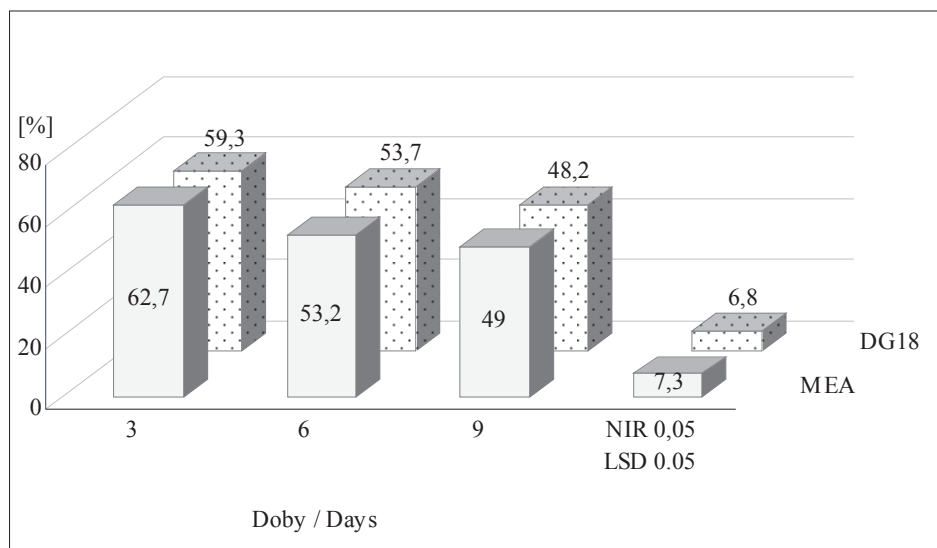


Rys. 2. Zahamowanie wzrostu grzybów: *E. amstelodami* – E. a., *E. chevalieri* – E.ch., *E. herbariorum* – E.h., *E. repens* – E.re., *E. rubrum* – E. ru. przez badane susze (B – bazylia, O – oregano, R – rozmaryn, T – tymianek) w 9. dobie inkubacji

Fig. 2. Growth inhibition of: *E. amstelodami* – E. a.; *E. chevalieri* – E.ch.; *E. herbariorum* – E.h.; *E. repens* – E.re.; *E. rubrum* – E. ru. by dried herbs studied (B – basil, O – oregano, R – rosemary, T – thyme) on the 9th day of incubation

Wykazano, że zahamowanie wzrostu badanych grzybów rosnących na podłożach DG18 i MEA z dodatkiem ocenianych suszy ziołowych malało wraz z czasem inkubacji (rys. 3). Na obydwu podłożach w 3. dobie inkubacji wartość zahamowania wzrostu była istotnie większa niż w 6. i 9. dobie, jednak średnie wartości tego wskaźnika odnotowane w 6. i 9. dobie były do siebie zbliżone, co wskazuje na stosunkowo stabilne działanie ziół.

Badane susze ziołowe, odznaczające się istotnymi różnicami pod względem zawartości składników odżywczych i biologicznie czynnych, wprowadzone do podłoża hodowlanych wywierały zróżnicowany wpływ na wzrost kolonii grzybów. Wyrażona w procentach wartość zahamowania wzrostu kolonii zależała od rodzaju suszu, gatunku grzyba i czasu inkubacji. El-Mougi i Abdel-Kader [7] również wykazali znaczenie gatunku grzyba oraz rodzaju suszu, a także jego dawki. Malejącą wraz z czasem inkubacji aktywność przeciwgrzybową olejków stwierdzili Lopez-Reyes i wsp. [18]. Różną wrażliwość drobnoustrojów na działanie naturalnych roślinnych substancji wykazano w wielu badaniach [5, 6, 12, 13, 14].



Rys. 3. Zahamowanie wzrostu grzybów w 3., 6. i 9. dobie inkubacji na podłożach DG18 i MEA zawierających dodatek suszonych ziół

Fig. 3. Growth inhibition of fungi on the 3rd, 6th, and 9th day of incubation on DG18 and MEA media with dried herbs added

Spośród badanych ziół susz oreganowy powodował istotnie największe zahamowanie wzrostu zarówno grzybów kserofilnych, jak i hodowanych na podłożu o dużej aktywności wody. Jako silny należy też ocenić wpływ suszu tymiankowego. Średnie zahamowanie wzrostu grzybów przez obydwa te susze wynosiło > 75 % i poziom ten zdaniem Askarnego i wsp. [3] pozwala zaliczyć susz do mających wysoką aktywność przeciwgrzybową. W warunkach doświadczenia susz rozmarynowy miał umiarkowany wpływ na zahamowanie wzrostu kolonii, a bazyliowy stymulował rozwój części gatunków grzybów. O stymulowaniu wzrostu grzybów na podłożach zawierających niektóre susze roślinne świadczą też badania, które przeprowadzili Askarne i wsp. [3]. Odmienne niż w niniejszej pracy, Chalfoun i wsp. [6] stwierdzili, że susz oreganowy w niewielkim stopniu hamuje rozwój *A. niger* i *E. repens*, a jego działanie było słabsze niż tymianku. El-Mougi i Abdel-Kader [7] wykazali silniejsze zahamowanie wzrostu grzybów przez susz bazyliowy (51,1 ÷ 71,1 %) niż rozmarynowy (0,0 ÷ 50,5 %), ale, podobnie jak w badaniach własnych, susz tymiankowy był od nich efektywniejszy. W warunkach przeprowadzonego doświadczenia susze oreganowy, tymiankowy i rozmarynowy działały na zahamowanie wzrostu grzybów istotnie silniej niż benzoesan sodu. Jego niższą skuteczność w zapobieganiu rozwojowi grzybów w porównaniu z ziołami i przyprawami stwierdzili też Azzouz i wsp. [5].

Na poziom aktywności przeciwgrzybowej badanych ziół niewątpliwy wpływ wywierał ich skład chemiczny. Olejki eteryczne i polifenole wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową, a cukry i białka mogą wzbogacać podłoże hodowlane w składniki odżywcze. Największe zahamowanie wzrostu grzybów przejawiał susz oreganowy zawierający najwięcej olejku oraz dużo polifenoli, natomiast susz bazyliowy o istotnie najmniejszej zawartości tych związków, a największej – białka działał głównie stymulująco. Tymianek o istotnie mniejszej zawartości olejku i polifenoli niż rozmaryn odznaczał się w porównaniu z nim istotnie większą aktywnością. Jest to zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi, że nie występuje prosta zależność między ogólną zawartością polifenoli oraz olejków w ziołach a ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową [14, 25, 26]. Znaczenie ma bowiem skład jakościowy tych związków. Do głównych komponentów olejku tymianku i oregano należą tymol i karwakrol, linalol jest charakterystyczny dla olejku bazyliowego, a dla rozmarynowego – 1,8-cyneol, kamfora, borneol [18]. Tymol i karwakrol to fenolowe składniki olejków wykazujące największą aktywność przeciwdrobnoustrojową [12]. Przy tym samym składniku głównym olejki mogą jednak wykazywać różną aktywność, co wskazuje na znaczenie ogólnej kompozycji olejku i rolę składników drugorzędnych [26].

Przeprowadzone badania wykazały, że susz oreganowy i tymiankowy są surowcami o wysokim potencjale przeciwgrzybowym. Przy aplikacji ziół należy wziąć pod uwagę, że mogą być one źródłem znacznej liczby grzybów (10^6 jtk·g⁻¹). Termiczne metody dekontaminacji surowców ziołowych mają dużą skuteczność przy niewielkich zmianach barwy smaku i zapachu [17]. W niniejszej pracy susz oreganowy i tymiankowy wykazywały silną aktywność przeciwgrzybową po poddaniu ich pasteryzacji w podłożach hodowlanych.

Wnioski

1. Suszone zioła przyprawowe – bazylia, oregano, rozmaryn i tymianek odznaczały się istotnie zróżnicowaną zawartością białka, cukrów, polifenoli i olejków eterycznych oraz zróżnicowaną aktywnością przeciwgrzybową, uzależnioną też od gatunku grzyba oraz czasu inkubacji.
2. Susz z oregano charakteryzujący się największą zawartością olejku (2,40 % s.m.) i dużą zawartością polifenoli (4,06 % s.m.) powodował istotnie największe średnie zahamowanie wzrostu grzybów z rodzaju *Eurotium* (95,5 %) oraz pozostałych szczepów (90,2 %). Susz bazyliowy o najmniejszej zawartości olejku (1,20 % s.m.) i polifenoli (2,90 % s.m.), a największej – białka ogółem (25,27 % s.m.) stymulował wzrost części grzybów.
3. Badane susze ziołowe powodowały największe zahamowanie wzrostu *A. fumigatus*, *A. alternata* i *E. amstelodami*, a najmniejsze – *A. niger* i *E. rubrum*.

4. Działnie ziół hamujące wzrost grzybów malało wraz z czasem inkubacji, ale różnice między zahamowaniem wzrostu grzybów w 6. i 9. dobie doświadczenia były nieistotne.

Literatura

- [1] Adámková A., Kouřimska L., Kadlecová B.: The effect of drying on antioxidant activity of selected *Lamiaceae* herb. *Potravinstvo*, 2015, 9 (1), 252-257.
- [2] Agbor G.A., Kuate D., Oben J.E.: Medicinal plants can be good source of antioxidants: Case study in Cameroon. *Pak. J. Biol. Sci.*, 2007, 10 (4), 537-544.
- [3] Askarne L., Talibi I., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Serghini M.A.: *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Prot.*, 2012, 40, 53-58.
- [4] Awuah R.T., Ellis W.O.: Effects of some groundnut packaging methods and protection with *Ocimum* and *Syzygium* powders on kernel infection by fungi. *Mycopathologia*, 2001, 154, 29-36.
- [5] Azzouz M.A., Bullerman L.B.: Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *J. Food Prot.*, 1992, 45 (14), 1298-1301.
- [6] Chalfoun S.M., Pereira M.C., Resende M.L., Angelico C.L., da Silva R.A.: Effect of powdered spice treatments on mycelial growth, sporulation and production of aflatoxins by toxigenic fungi. *Cienc. Agrotec. Lavras*, 2004, 28 (4), 856-862.
- [7] El Mougy N.S., Abdel-Kader M.: Antifungal effect of powdered spices and their extracts on growth and activity of some fungi in relation to damping-off disease control. *J. Plant Prot. Res.*, 2007, 43 (3), 267-278.
- [8] Grohs B.M., Kunz B.: Use of spice mixtures for the stabilization of fresh portioned pork. *Food Cont.*, 2000, 11, 433-436.
- [9] Grzeszczuk M., Jadczyk D.: The estimation of biological value of some species of spice herbs. *Acta Hort.*, 2009, 830, DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.830.98.
- [10] Guynot M.E., Ramos A.J., Seto L., Purroy P., Sanchis V., Marin S.: Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *J. Appl. Microb.*, 2003, 94, 893-899.
- [11] Hussain A.I., Anwar F., Hussain S.T., Przybylski R.: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.*, 2008, 108, 986-995.
- [12] Kalembe D., Kunicka A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Med. Chem.*, 2003, 10, 813-829.
- [13] Kiedos P., Wójcik-Stopczyńska B.: Contents, composition and antifungal activity of *Origanum vulgare* L. essential oils. II Int. Conf. "Human ecology", Szczecin, 2016, June, 9-10, pp. 99-100.
- [14] Kiedos P., Wójcik-Stopczyńska B.: Ocena aktywności przeciwgrzybiczej suszu i wywaru otrzymanych z ziela lebidki pospolitej (*Origanum vulgare* L.). W: *Rolnictwo XXI wieku. Problemy i wyzwania 2016*. Red. D. Łuczycza. Idea Knowledge Future. Wrocław 2016, ss. 96-104.
- [15] Krełowska-Kułas M.: *Badanie jakości produktów spożywczych*. PWE, Warszawa 1993.
- [16] Krishnamurthy Y.L., Shashikala J., Naik B.S.: Antifungal potential of some natural products against *Aspergillus flavus* in soybean seeds during storage. *J. Stored Prod. Res.*, 2008, 44, 305-309.
- [17] Kunicka-Styczyńska A., Śmigielski K.: Bezpieczeństwo mikrobiologiczne surowców ziółowych. *Przem. Spoż.*, 2011, 65, 50-53.

- [18] Lopez-Reyes J.G., Spadaro D., Gullino M.L., Garibaldi A.: Efficacy of plant essential oils on post-harvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. *Flavour and Fragrance J.*, 2010, 25, 171-177.
- [19] Marzec M., Polakowski C., Chilczuk R., Kołodziej B.: Evaluation of essential oil content, its chemical composition and price of thyme (*Thymus vulgaris* L.) raw material available in Poland. *Herba Polonica*, 2010, 56 (3), 37-52.
- [20] Modnicki D., Balcerek M.: Estimation of total polyphenols contents in *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. commercial samples. *Herba Pol.*, 2009, 1 (55), 35-42.
- [21] Nurzyńska-Wierdak R., Borowski B., Dzida M.: Yield, and chemical composition of basil herb depending on cultivar and foliar feeding with nitrogen. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 2011, 10 (1), 207-219.
- [22] PN-A-86959:1997. Przyprawy ziołowe. Bazylika.
- [23] PN-EN ISO 6571:2009. Przyprawy i zioła. Oznaczanie zawartości olejku eterycznego (metoda hydrodestylacji).
- [24] PN-ISO-6754:1999. Suszone ziele tymianku (*Thymus vulgaris* L.). Wymagania.
- [25] Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.-J.E., Komaitis M.: Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.*, 2006, 95, 664-671.
- [26] Rakotonirainy M.S., Lavedrine B.: Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2005, 55, 141-147.
- [27] Singleton L., Orthofer R., Lamuela-Raventions R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 1999, 299, 152-178.
- [28] Solgi M., Ghorbanpour M.: Application of essential oils and their biological effects on extending the shelf-life and quality of horticultural crops. *Trakia J. Sci.*, 2014, 2, 198-210.
- [29] Stanciu G., Cristache N., Lupsor S., Dobrinas S.: Evaluation of antioxidant activity and total phenols content in selected spices. *Rev. Chem.*, 2017, 68 (7), 1429-1434.
- [30] Stefanovits-Bányai E., Tulok M.H., Hegedűs A., Renner C., Varga I.S.: Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biol. Szeged*, 2003, 47 (1-4), 111-113.

IN VITRO ASSESSMENT OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SOME DRIED HERBS

S u m m a r y

In the study, there were assessed the chemical composition and the antifungal activity of some dried herbs, i.e. basil, oregano, rosemary, and thyme. The individually prepackaged dried herbs were purchased in a retail network. In the mixed and powdered samples, there were determined the contents of dry matter, total protein, total sugars, total polyphenols, and essential oils. To study the antifungal activity of herbs, twelve strains of fungi were used, i.e.: *Alternaria alternata*., *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium cyclopium* and *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*, *E. repens*, and *E. rubrum*. As for the *Eurotium* ssp. fungi, a Dichloran Glycerol (DG-18) Agar Base was used, and for the other fungi: a Malt Extract Agar Base. The experiment included fungal cultures grown on the media with the dried herbs added (1 %) and control cultures grown on the media without the dried herbs. Sodium benzoate (0.05 %) was used as a positive control sample. On the 3rd, 6th, and 9th day of the experiment, the diameters of the analysed and the control colonies were measured and a percent rate was computed of the fungal growth inhibition caused by the dried herbs. It was found that the antifungal activity varied depending on the type of dried herbs, the fungus species, and

the incubation time. On the ninth day of the experiment, the dried oregano containing the highest level of essential oil (2.40 % d.m.) and a lot of polyphenols (4.06 % d.m.) caused the growth of both the *Eurotium* ssp. fungi and the other fungi to be inhibited at the significantly highest mean rate (95.5 and 90.2 %, respectively). The dried basil containing the lowest amounts of oil and polyphenols and the highest amount of total proteins stimulated the growth of some part of the fungi. The dried herbs studied caused the strongest growth inhibition of the cultures of *A. fumigatus*, *A. alternata*, and *E. amstelodami* fungi and the weakest growth inhibition of *A. niger* and *E. Rubrum*. The growth inhibition of the fungi decreased with the time of incubation but the differences between the mean percent rates of growth inhibition on the 6th and the 9th day of the incubation period were insignificant. The dried oregano, thyme, and rosemary inhibited the growth of fungal colonies more effectively than the sodium benzoate.

Key words: basil, oregano, rosemary, thyme, antifungal properties ☒



Polskie Towarzystwo Technologów Żywności

we współpracy z

Katedrą Technologii Mięsa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

zapraszają na

V Międzynarodową Konferencję Naukową z cyklu:

“MEAT IN TECHNOLOGY AND HUMAN NUTRITION” –

“MEAT AS A FUNCTIONAL AND PRO-HEALTHY PART OF OUR DIET”

Tarnowo Podgórze k. Poznania, 27 – 29 czerwca 2018 r.

Główne sesje konferencji:

1. Produkcja mięsa w zmieniającym się świecie
2. Mięso – źródło bioaktywnych związków i jego funkcjonalne właściwości
3. Innowacje w nauce o mięsie i jego przetwarzaniu
4. Postęp w ocenie jakości mięsa, bezpieczeństwa zdrowotnego i autentyczności żywności

Zgłoszenie uczestnictwa i tytułu prezentacji – **do 15.01.2018 r.**

Informacje: www.up.poznan.pl/meat2018

Kontakt: dr inż. Mirosława Krzywdzińska-Bartkowiak

e-mail: meat2018@up.poznan.pl; tel. 61 848 72 54