

TADEUSZ TUSZYŃSKI, MAŁGORZATA MAKAREWICZ

WPLYW EKSTRAKTÓW ZIOŁOWYCH NA WZROST WYBRANYCH SZCZEPÓW DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Streszczenie

Badano wpływ wodnych ekstraktów z wybranych roślin na wzrost kolonii drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Jako podłoże hodowlane stosowano brzeczkę piwną zestaloną agarem z dodatkiem 1 cm³ odpowiedniego wyciągu ziołowego. Po inkubacji (30°C, 48h) określono wielkość wyrosłych kolonii drożdży.

Stwierdzono dodatni wpływ ekstraktów z szałwi i rdestu na wzrost badanego szczepu drożdży piwowarskich – zwiększenie średnicy kolonii w granicach 45–75%. Wykazano także korzystne oddziaływanie ekstraktów z szałwi i tataraku na drożdże piwowarskie. Wyciągi z aloesu, tataraku i tymianku posiadały statystycznie istotny wpływ hamujący na wzrost drożdży gorzelniczych (redukcja średnicy kolonii od 21 do 62%). Jedynie ekstrakty tymiankowe oddziaływały negatywnie na rozwój kolonii wszystkich trzech badanych ras drożdży. Stosowane w doświadczeniach handlowe susze ziołowe (mięta, rdest, rumianek i arcydzięgiel) były skażone mikrobiologiczne, głównie florą bakteryjną (39 do 93·10⁴ kolonii/1 g).

Wstęp

Wykorzystywanie ziół przez człowieka ma bardzo odległe tradycje, szczególnie leczenie za pomocą roślin jest prawie tak samo stare jak ludzkość. Współczesna nauka często potwierdza sprawdzone przez wieki procedury dotyczące zbioru, przygotowania ziół oraz leczenia. Preparaty ziołowe wykazują działanie wzmacniające, poprawiają przemianę materii, a zawartość czynnych związków pobudza wydzielanie soku żołądkowego i ułatwia procesy trawienia. Między innymi z tych względów wiele roślin może mieć ważne znaczenie dla zdrowia, chociaż same nie zawierają istotnych ilości substancji odżywczych. Obecnie zioła znajdują coraz szersze zastosowanie nie tylko w medycynie, ale również w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym.

Większość z roślin zielnych zawdzięcza swoje właściwości różnego rodzaju substancjom biologicznie czynnym. Do najważniejszych związków zawartych w roślinach leczniczych zalicza się: alkaloidy, aminy biogenne, fenole, garbniki, substancje goryczkowe, olejki eteryczne, sole mineralne i witaminy. Ta wielka złożoność składu chemicznego ziół i sporządzonych z nich odpowiednich preparatów może wskazywać na fakt współdziałania różnych związków, co w rezultacie prowadzi do hamowania lub pobudzania procesów fizjologicznych organizmów.

Odpowiednio dobrany zestaw ziół przyprawowych, wprowadzony w określonej ilości do pożywienia, poprawia jego cechy sensoryczne lub nadaje nowe, pożądane właściwości, a zawartość związków barwnych (flawonoidów) umożliwia również ich stosowanie jako naturalnych, nietoksycznych barwników żywności [9].

Wiele ziół wykazuje ponadto działanie przeciwutleniające i konserwujące żywność. Badania Schwarza i Ternesa [11] oraz Ramarathnama i wsp. [10] dowodzą silnej aktywności antyutleniającej ekstraktów ziołowych i przypraw, które mogą pełnić rolę stabilizatorów produktów spożywczych.

Wiadomo również, że wyciągi ziołowe wywierają hamujący wpływ na rozwój bakterii oraz pleśni, które bardzo łatwo rozwijają się w żywności i przez to stanowią poważne zagrożenie ze względu na produkcję toksyn. Pierwsze doniesienia naukowe dotyczące powyższych właściwości ziół i przypraw pochodzą z końca XIX wieku i dalej odkrywane są ich nowe, nieznanie wcześniej cechy użytkowe [15]. Dotychczasowe badania wskazują na bakteriostatyczne oraz bakterio- i grzybobójcze działanie wyciągów z różnych roślin [2, 4, 6, 8, 12, 17]. Inne doświadczenia [1] wykazały, że niektóre wyciągi z przypraw posiadają dużą efektywność zmiatania wolnych rodników oraz nadtlenu wodoru i ponadtlenków.

Ekstrakty ziołowe ze względu na antybiotyczne właściwości mogą również spełniać, podobnie jak bakteriocyny, funkcję chemicznych środków konserwujących w przetwórstwie żywności. Tym samym powstaje szansa utrwalania żywności w sposób naturalny, co w ostatnich latach jest przedmiotem szczególnego zainteresowania zarówno konsumentów, jak i technologów żywności [3]. Wyniki wielu badań wskazują na duże możliwości wykorzystania ziół w różnych technologiach przemysłu spożywczego.

Celem pracy było określenie wpływu ekstraktów (wyciągów) z wybranych roślin na wzrost kolonii różnych ras drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Materiał i metody

Do badań zastosowano wodne wyciągi z liści aloesu (*Aloe ferox*), szałwi (*Salvia officinalis*), tymianku (*Thymus vulgaris*) oraz mięty pieprzowej (*Mentha piperata*), kwiatu rumianku (*Matricaria chamomilla*), ziela rdestu ptasiego (*Polygonum aviculare*), kłącza tataraku (*Acorus calamus*) i korzenia arcydzięgla (*Archangelica officinalis*).

Za wyjątkiem świeżych liści aloesu, używano ziół w postaci suszonej (Herbapol, Lublin) powszechnie dostępnych w sklepach zielarskich.

W celu określenia stopnia zakażenia mikrobiologicznego suszów ziołowych wykonano oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów z użyciem agaru bulionowego z glukozą (bakterie) oraz brzeczki zestalonej agarem – drożdże i pleśnie [16].

Ekstrakcję stacjonarną oraz dynamiczną (mieszadło magnetyczne, 5 h, 45°C) rozdrobionego materiału prowadzono w zamkniętym naczyniu z użyciem sterylnej wody (1:1), następnie roztwór poddawano sączeniu na lejku Büchnera.

Materiał biologiczny stanowiły wybrane szczepy drożdży browarniczych (Okocim), gorzelniczych Jaa i piekarskich G1 z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej AR w Krakowie. Jako podłoże hodowlane (10 cm³, zestalone agarem) stosowano niechmieloną brzeczkę piwną z dodatkiem 1 cm³ odpowiedniego ekstraktu ziołowego w stężeniu wyjściowym (1:1) lub rozcieńczonego jałową wodą destylowaną w stosunku 1:4. Po punktowym zaszczepieniu podłoża czystą kulturą drożdży i inkubacji (30°C, 48 h), określano wielkość wyrosłych kolonii poprzez dokładny pomiar ich średnicy. Kontrolę stanowiły podłoża bez dodatku wyciągu ziołowego.

Statystyczną istotność różnic między średnimi uzyskanych wyników z 10 równoległych doświadczeń sprawdzono przy pomocy testu t-Studenta [7].

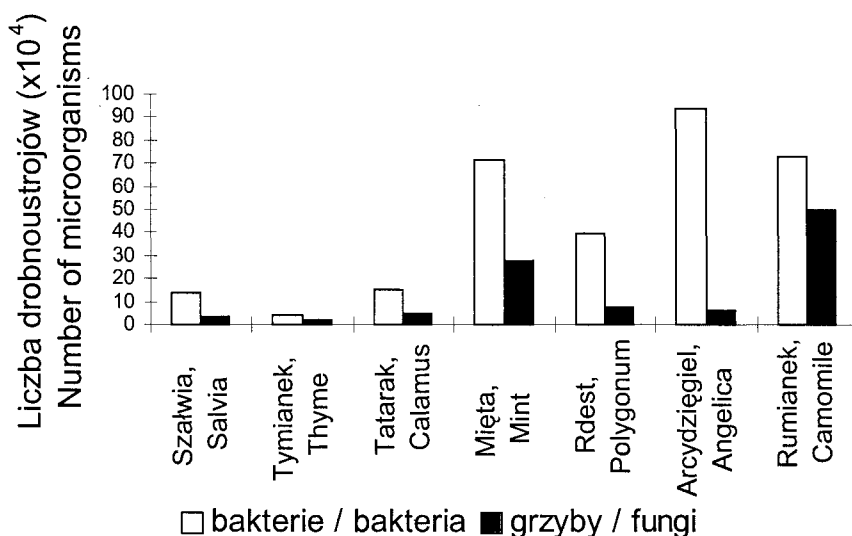
Wyniki i dyskusja

Na podstawie oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów stwierdzono, że niektóre susze ziołowe stosowane w doświadczeniach były istotnie skażone mikrobiologicznie. Szałwia, tymianek i tatarak charakteryzowały się stosunkowo najmniejszą liczbą bakterii (4–15·10⁴/1 g) i grzybów (3,5–4,6·10³/1 g), natomiast mięta, rdest, rumianek i arcydzięgiel zawierały znacznie więcej (39,6–93,5·10⁴ komórek/1 g) flory bakteryjnej (Rys. 1).

Ze względu na fakt stosunkowo dużego zanieczyszczenia niektórych suszów ziołowych drobnoustrojami, które mogłyby wywierać niekorzystny wpływ na wzrost kolonii badanych drożdży, w dalszych doświadczeniach do sporządzania wodnych wyciągów ziołowych użyto szałwii, tymianku, tataraku, rdestu i aloesu.

Wszystkie zastosowane wyciągi ziołowe wpływały hamująco na wzrost kolonii drożdży gorzelniczych. Najbardziej znaczący efekt odnotowano w przypadku użycia ekstraktów z tataraku (rozcieńczenie 1:1 i 1:4). Średnia wielkość wyrosłych kolonii wynosiła odpowiednio 2,1 i 1,3 mm, co stanowiło zmniejszenie ich wymiarów w stosunku do próby kontrolnej o 38 i 62% (Tab. 1). Istotne ograniczenie rozmiarów kolonii stwierdzono również w obecności aloesu, tymianku oraz szałwii i rdestu (Tab. 1 i 2). Powyższe wyciągi roślinne wykazują również działanie bakteriobójcze, co znajduje potwierdzenie w doniesieniach literaturowych [5]. Sivropoulou i wsp. [13] badali ole-

olejek eteryczny uzyskany z szałwi i stwierdzili w nim wysoką zawartość 1,8-cineolu, α - i β -tujonu oraz kamfory. Wysoką aktywność antymikrobową wykazywały przede wszystkim tujon i cineol. Olejek szałwiowy posiadał silne właściwości bakteriobójcze w rozcieńczeniu 1:4 000, a w niższym stężeniu (1: 10 000) powodował jeszcze istotny spadek szybkości wzrostu badanych bakterii.



Rys. 1. Ogólna liczba komórek bakterii i grzybów w 1 g suszu ziołowego.

Fig. 1. Total number of bacterial and fungal cells in 1 g of dried herbst.

W naszych doświadczeniach wyciąg z tymianku ograniczał wzrost drożdży browarniczych (rozmiary kolonii mniejsze od 40 do 50%) oraz drożdży piekarskich (redukcja wielkości kolonii w granicach 13–19%). Uzyskane wyniki, dotyczące właściwości tymianku, znajdują potwierdzenie w badaniach Grzybowskiiego i in. [3], które wykazały, że ekstrakt tymianku w stężeniu 0,25% prawie całkowicie eliminował wzrost *Hansenula anomala* i *Saccharomyces cerevisiae*. Bakteriobójcze i bakteriostatyczne właściwości tymianku wynikają głównie z obecności olejku eterycznego, zawierającego tymol. Zambonelli i wsp. [17] stwierdzili, że z trzech różnych olejków (tymianku, lawendy i mięty) najsilniejsze właściwości antybiotyczne w stosunku do fitopatogennych grzybów *Rizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum lindemuthamum*, posiadał olejek uzyskany z tymianku. Obserwacje mikroskopowe (technika skaningu) pokazały, że olejek ten powodował degenerację strzępek grzybni, polegającą na niszczeniu zewnętrznych struktur komórki oraz cytoplazmy.

Tabela 1

Wielkość kolonii drożdży wyrosłych na podłożu z dodatkiem wyciągów ziołowych [mm].
The size of yeast colonies on the media supplemented with herbal extracts.

Gatunek drożdży Yeast strain	Kontrola Control	Aloes Aloe		Szałwia Salvia		Rdest Polygonum		Tatarak Calamus		Tymianek Thyme	
		Stężenie ekstraktu Extract concentration									
		1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4
Gorzelnicze Distillery	3,4	2,6 (-23)	2,5 (-26)	2,4 (-29)	3,1 (-9)	2,7 (-21)	2,1 (-38)	2,1 (-38)	1,3 (-62)	2,7 (-21)	2,3 (-32)
Browarnicze Brewery	2,0	2,3 (+15)	2,0 (0)	3,2 (+60)	3,3 (+65)	3,5 (+75)	2,9 (+45)	2,4 (+20)	2,3 (+15)	1,0 (-50)	1,2 (-40)
Piekarskie Bakery	3,1	2,2 (-29)	3,2 (+3)	3,2 (+3)	4,0 (+29)	3,1 (0)	2,9 (-6)	2,9 (-6)	4,0 (+29)	2,7 (-13)	2,5 (-19)

() - Zmiana średnicy kolonii w stosunku do kontroli [%]. Czcionką pogrubioną oznaczono wartości istotne statystycznie.

() - Change of colony diameter to control value [%]. The means printed in bold were significantly different from respective control values.

Podobne doświadczenia dotyczące wpływu tymianku na różne szczepy drobnoustrojów rozwijających się w żywności, podjęli Smith-Palmer, Steward i Fyfe [14]. Spośród 23 badanych olejków eterycznych najsilniejszym działaniem antybakteryjnym, głównie na bakterie Gram dodatnie, charakteryzowały się ekstrakty i olejki z tymianku, cynamonu, wawrzynu i czosnku.

Dla drożdży browarniczych, w przypadku wyciągów z szałwi i rdestu, wykazano istotne zwiększenie rozmiarów wyrosłych kolonii (45–75%) w stosunku do próby kontrolnej. Zastosowanie ekstraktów z aloesu (1:1) i tataraku (1:1 oraz 1:4) prowadziło również do powiększenia wymiarów kolonii w granicach 15–20%, jednak efekt ten nie był istotny statystycznie (Tab. 1, 2). Jak się wydaje zaistniałe różnice wpływu badanych wyciągów na wzrost drożdży gorzelnicznych i browarniczych mogą wynikać z wykształconej tolerancji tych ostatnich na zwiększoną zawartość substancji gorzkich oraz garbników w podłożu hodowlanym. Można dokonać porównania z procesem produkcji piwa, w którym głównym źródłem wymienionych związków jest chmiel (substancje goryczkowe, garbnikowe, olejki eteryczne). Pożądaną gorycz kształtują przede wszystkim dobrze rozpuszczalne w brzeczce α - i β - kwasy goryczkowe. Tak więc drożdże browarnicze w takim środowisku z natury mogą się intensywniej rozmnażać niż pozostałe badane szczepy.

Tabela 2

Statystyczna istotność wyników (Test t-Studenta dla różnic między średnimi).
The results of statistical analysis (t - Student test for differences between means).

Gatunek drożdży Yeast strain	Dane statystyczne Statistic data	Kontrola Control		Aloes Aloe		Szalwia Salvia		Rdest Polygonium		Tatarak Calamus		Tymianek Thyme	
		1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4	1:1	1:4
Gorzelnicze Distillery	s	0,999	0,710	0,725	0,600	1,338	0,723	0,568	0,521	0,825	0,678		
	S \bar{x}	0,35	0,35	0,37	0,36	0,43	0,37	0,34	0,29	0,37	0,35		
	t	2,286	2,286	2,703	0,833	1,628	3,514	3,824	7,241	5,676	3,143		
	P	0,02<P<0,05	0,02<P<0,05	0,01<P<0,02			0,001<P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	0,001<P<0,01	
Browarnicze Brewery	s	0,671	1,096	0,819	1,196	1,354	0,600	0,520	0,693	0,738	0,994		
	S \bar{x}	0,400	0,311	0,421	0,291	0,462	0,274	0,245	0,310	0,289	0,360		
	t	0,75	0,00	2,86	4,48	3,26	3,33	1,6	0,97	3,793	2,500		
	P			0,001<P<0,01	0,001<P<0,01	0,001<P<0,01	0,02<P<0,05			P<0,001	P=0,02		
Piekarskie Bakery	s	1,00	0,825	0,424	1,034	1,100	0,640	0,564	0,663	0,949	0,707		
	S \bar{x}	0,37	0,33	0,39	0,31	0,41	0,39	0,34	0,31	0,38	0,35		
	t	2,432	0,303	0,256	2,903	0,00	0,513	0,588	2,903	1,053	1,714		
	P	0,02<P<0,05			0,001<P<0,01				0,001<P<0,01				

s - odchylenie standardowe (SD); S \bar{x} - błąd standardowy (SE); P - błąd I rodzaju, 1-st type error,

t - statystyka (czcionką pogrubioną oznaczono wartości istotne statystycznie), the means printed in bold were significantly different from respective control values.

W przypadku drożdży piekarskich nie odnotowano jednoznacznego wpływu stosowanych ekstraktów ziołowych na ich wzrost. Wyciąg z aloesu w stężeniu 1:1 istotnie ograniczał rozwój kolonii – zmniejszenie o 29% w stosunku do prób kontrolnych. Natomiast szałwia, rdest i tatarak, również w stężeniu 1:4, wyraźnie pobudzały rozmnażanie drożdży piwowskich (Tab. 1). W pozostałych przypadkach uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie (Tab. 2). Należy wskazać na stosunkowo dużą wrażliwość badanego szczepu drożdży gorzelniczych (Jaa) na wszystkie stosowane w doświadczeniach wyciągi ziołowe. Interesujące jest także, z punktu widzenia technologicznego, korzystne oddziaływanie ekstraktów z szałwi i tataraku na wzrost drożdży piekarskich. Przeprowadzone badania wskazują na możliwość stymulowania lub hamowania wzrostu niektórych ras drożdży przez odpowiednie dodatki wyciągów ziołowych do pożywek hodowlanych.

Wnioski

1. Wyciągi z tataraku, aloesu i tymianku wykazywały statystycznie istotny wpływ hamujący na wzrost drożdży gorzelniczych – zmniejszenie średnicy kolonii od 21 do 62%. Podobny efekt z użyciem wyciągów z tymianku stwierdzono dla drożdży browarniczych – zmniejszenie kolonii w granicach 40-50%.
2. Stwierdzono dodatni wpływ ekstraktu z szałwi i rdestu na wzrost badanych szczepów drożdży browarniczych – zwiększenie średnicy kolonii w granicach 45–75%, w stosunku do próby kontrolnej.
3. Stosowane w doświadczeniach handlowe susze ziołowe, szczególnie mięty pieprzowej, rdestu, rumianku i arcydzięgla były w znacznym stopniu skażone mikrobiologicznie, głównie florą bakteryjną.

LITERATURA

- [1] Dworschak E., Hovari J.: Free radical scavenging activity of methanolic extract of some culinary herbs, *Acta Aliment.*, **25**, 1996, 227-236.
- [2] Florkiewicz A.: Próby wykorzystania propolisu jako dodatku do wódek, Praca magisterska, Akademia Rolnicza, Kraków, 1997.
- [3] Grzybowski R., Duszkiewicz-Reinhard W., Bugajewska A., Karwowska K.: Wpływ ekstraktu tymianku na niektóre grupy drobnoustrojów, *Przem. Spoż.*, **35**, 1991, 24-26.
- [4] Kim J., Marshall M.R., Wei C.: Antibacterial activity of some essential components against five foodborne pathogens, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2839-2845.
- [5] Krześniak L.: *Apteczka ziołowa*, Wyd. Sport i Turystyka, Warszawa 1988.
- [6] Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A., Coventry M.J.: The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum L.*) against acid-tolerant food microflora, *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 1998, 209-214.
- [7] Łomnicki A.: *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*, PWN, Warszawa, 1995.

- [8] Mei-Chin-Yin, Wen-Shen-Cheng: Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices, *J. Food Prot.*, **61**, 1998, 123-125.
- [9] Melchior H., Kastner H.: Przyprawy - badania botaniczne i chemiczne, WN-T, Warszawa, 1978.
- [10] Ramarathnam N., Osawa T., Ochi H., Kawakishi S.: The contribution of plant food antioxidants to human health, *Trends in Food Sci. & Technol.*, **6**, 1995, 75-82.
- [11] Schwarz K., Ternes W.: Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, *Z. Lebensm. Untersuch. und Forsch.*, **195**, 1992, 95-98.
- [12] Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M.: Antimicrobial activity of Mint essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2384-2388.
- [13] Sivropoulou A., Niklaou C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M.: Antimicrobial, cytotoxic antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3197-3201.
- [14] Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L.: Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important foodborne pathogens, *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 1998, 118-122.
- [15] Thyagaraja N., Hosono A.: Effect of spice extract on fungal inhibition, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **29**, 1996, 286-288.
- [16] Trojanowska K., Giebel H., Gołębiowska B.: *Mikrobiologia żywności*; Wyd. AR w Poznaniu, Poznań 1996.
- [17] Zambonelli A., Zechini D'Aulerio A., Bianchi A., Albasini A.: Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro, *J. Phytopathology*, **144**, 1996, 491-494.

EFFECT OF HERBAL EXTRACTS ON THE GROWTH OF SELECTED YEAST (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*) STRAINS

S u m m a r y

The studies were conducted to determine the effect of water extracts of selected herbs on the growth of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) colonies. The medium was brewery wort solidified with agar and enriched with 1 cm³ of herbal extract. The growth of colonies was measured after incubation at 30°C for 48 h.

The salvia and polygonum extracts had positive effect on the growth of colonies of brewery yeast, increasing their diameter by 45–75%. The same was true for the effects of salvia and calamus extracts on the growth of bakery yeast. In contrast, the extracts obtained from aloe, calamus, and thyme, had strong and statistically significant inhibitory effect on the growth of distillery yeast, reducing the diameter of colonies by 21–62%. The commercially available dry herbs (mint, polygonum, camomile and angelica) showed microbial contamination, mainly with bacterial microflora (39–93·10⁴ colonies / I g). ☒