

# Działanie przeciwbakteryjne i przeciwutleniające ekstraktów przypraw żywnościowych<sup>\*)</sup>

AGNIESZKA CZAPSKA, BOŻENA BAŁASIŃSKA\*, JACEK SZCZAWIŃSKI

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, \*Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-762 Warszawa

Czapska A., Bałasińska B., Szczawiński J.

## Antimicrobial and antioxidant properties of aqueous extracts from selected spice plants

### Summary

The aim of the experiment was to evaluate antibacterial and antioxidative properties of commercial water extracts prepared from horseradish, mustard, garlic and thyme. Microbial analysis concerned the estimation and comparison of antibacterial activity in the investigated extracts in relation to the *Staphylococcus aureus* strain, including the effect of various concentrations of each extract, temperature and incubation times. In order to estimate antioxidative properties of the investigated extracts, the power reducing iron was determined, as well as scavenging effect of DPPH radical and total antioxidative power by the FRAP method. Our data indicate that the investigated extracts possess different antibacterial and antioxidative properties. A higher biological activity in relation to the test strain *Staphylococcus aureus* was observed in extracts from horseradish and garlic, whereas the least effective was the mustard extract, which in turn had the most powerful antioxidative properties.

**Keywords:** plant extracts, antibacterial properties, antioxidants

W ostatnich latach w rozwiniętych ekonomicznie krajach świata, takich jak USA i kraje Unii Europejskiej, dużo uwagi poświęca się problemowi bezpieczeństwa żywności (4-6, 15, 16). Nasilające się dyskusje i krytyka dotycząca nadmiernej chemizacji żywności powodują, że w przemyśle spożywczym dąży się do uzyskania produktów bezpiecznych i trwałych, a równocześnie smacznych i posiadających wysokie wartości odżywcze. Pociąga to za sobą konieczność poszukiwania nowych substancji przede wszystkim pochodzenia naturalnego, zwłaszcza roślinnego, wykazujących działanie hamujące rozwój drobnoustrojów w żywności lub/i przeciwdziałające jej utlenianiu. W przemyśle spożywczym ogranicza się również stosowanie przypraw w sposób tradycyjny, tj. w postaci wysuszonych, całych lub rozdrobnionych surowców, z uwagi na ich wysokie skażenie mikrobiologiczne oraz trudności ze standaryzacją i dozowaniem (9). Znacznie większym zainteresowaniem nowoczesnego przemysłu cieszą się ekstrakty. Ich zastosowanie jako dodatków do żywności mogłoby przynieść różnorakie korzyści:

- ograniczenie liczby zatruc pokarmowych w wyniku hamowania wzrostu bakterii chorobotwórczych,
- zmniejszenie strat finansowych związanych z psuciem się żywności spowodowanym działalnością drobnoustrojów,

– poprawę wartości żywieniowej, sensorycznej i zdrowotnej żywności w wyniku ograniczenia procesu utleniania lipidów,

– zmniejszenie ogólnej „chemizacji” żywności w wyniku ograniczenia stosowania syntetycznych konserwantów i przeciwutleniaczy.

Badania dotyczące tej grupy związków koncentrują się nie tylko na sprawdzeniu ich działania przeciwdrobnoustrojowego i przeciwutleniającego (8), ale również na poszukiwaniu optymalnej metody ich izolacji z materiału roślinnego, co wynika z różnorodności związków biologicznie aktywnych zawartych w roślinach. Najbardziej rozpowszechnioną i najczęściej badaną grupą związków są polifenole, ale również związki siarkowe, takie jak np. izotiocjaniany obecne w roślinach kapustnych, chrzanie, gorczycy lub allicyna obecna w czosnku wykazują silne działanie biologiczne. Ponieważ związki te różnią się od siebie budową chemiczną, lotnością, stabilnością, stosuje się różne techniki ich izolacji. Najczęściej używaną techniką jest ekstrakcja z użyciem wody lub alkoholu jako rozpuszczalnika lub destylacja. W ekstraktach można bowiem znaleźć znaczną część związków biologicznie aktywnych obecnych w roślinach, a dodatkowo zastosowanie ich pozwala wyeliminować lub w znacznym stopniu ograniczyć drobnoustroje naturalnie występujące na roślinie.

W większości krajów największa liczba zachorowań spowodowana jest zatruciami pokarmowymi wy-

<sup>\*)</sup> Badania wykonane w ramach grantu KBN nr 3 P06K 022 25.

wołanymi przez pałeczki *Salmonella*, a w dalszej kolejności przez *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*. W USA zatrucia *Staphylococcus aureus* sklasyfikowano na piątym miejscu bakteryjnych zatruc pokarmowych (1). Stosunkowo wysoko klasyfikują się zatrucia gronkowcowe również we Francji, Hiszpanii i Niemczech, zajmując drugie miejsce oraz w Wielkiej Brytanii – trzecie miejsce (2, 14).

Sytuacja epidemiologiczna Polski odnośnie do 20 bakteryjnych zatruc pokarmowych przedstawia się podobnie, przy czym w 2002 r. zaobserwowano spadek udziału odzwierzęcych pałeczek *Salmonella* (77%) w porównaniu do roku 2001 (81,1%) i dwukrotny wzrost udziału gronkowców koagulazododatnich (12, 13).

Celem badań było określenie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwutleniających handlowych ekstraktów z powszechnie używanych roślin przyprawowych, takich jak czosnek, gorczyca, tymianek, chrzan, które są dodawane do żywności pochodzenia zwierzęcego głównie do produktów mięsnych.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono z użyciem handlowych ekstraktów wodnych (w formie sproszkowanej), z wybranych roślin przyprawowych: chrzanu (Krenaroma; Almi Gewürzindustrie Wien; Austria), gorzycy (Senfaroma; Rüther Gewürze GmbH – Natorper; Niemcy), czosnku (Knoblauchöl; Rüther Gewürze GmbH – Natorper; Niemcy) i tymianku (Thyme Oil On Carrier Dextrose; RAPS GmbH & Co.KG; Niemcy).

Do badania właściwości przeciwbakteryjnych użyto koagulazododatniego i enterotoksycznego szczepu *Staphylococcus aureus* nr 22/01, wyizolowanego z mięsa wieprzowego (Zakład Higieny Weterynaryjnej w Łomży). Kultury bakteryjne odnawiano okresowo i przechowywano na skosach agarowych w temp. 4°C. Czystość kultur sprawdzano metodą płytkową i mikroskopową. Do badań używano 24-godzinnej hodowli *S. aureus* w bulionie wzbogaconym (POCH, Gliwice) o pH 6,8 i stężeniu chlorku sodu 0,7%.

**Właściwości przeciwbakteryjne.** Badania przeprowadzono metodą konwencjonalną próbkowo-płytkową. Do badań użyto jałowych roztworów ekstraktów o stężeniach 0,2% (zalecane przez producentów) oraz 1,0% i 2,0%, które zakażano 0,1 ml szczepu testowego *Staphylococcus aureus* (inoculum  $1,0-3,5 \times 10^1$  jtk/g). W każdej serii badań sprawdzano czystość mikrobiologiczną stosowanych ekstraktów. Równolegle wykonywano próbę kontrolną. Próbkę poddawano inkubacji w temp. 13°C i 20°C, aż do osiągnięcia maksymalnej gęstości hodowli w próbkach kontrolnych, tj.  $1,2-6,7 \times 10^8$  jtk/g. W zależności od zastosowanej temperatury intensywność wzrostu drobnoustrojów określano co 24 lub 48 godz.

Ilościowe badania mikrobiologiczne przeprowadzono metodą płytkową, wykonując posiewy powierzchniowe (10). Z wybranych rozcieńczeń wysiewano po 0,5 ml badanego materiału na 2 równorzędne płytki Petriego z agarem odżywczym (11), a następnie inkubowano w temp. 37°C przez 24 godziny. Liczbę drobnoustrojów zawartą w 1 ml pożywki wyliczono ze średniej liczby bakterii wy-

rosłych na 2 płytkach. Wpływ każdego stężenia ekstraktów na drobnoustroje oznaczano w trzech powtórzeniach przy zachowaniu tych samych warunków.

**Właściwości przeciwutleniające.** Efekt znoszenia rodnika DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) oznaczano następująco: 100 µl próbki ekstraktów o różnym stężeniu (0,1; 1 mg/ml) zmieszano z 1 ml odczynnika DPPH (0,2 mM) (Sigma). Absorbancję przy długości fali 517 nm mierzono po 30 minutach (17).

$$\% \text{ hamowania} = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{próbki badanej}})}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \%$$

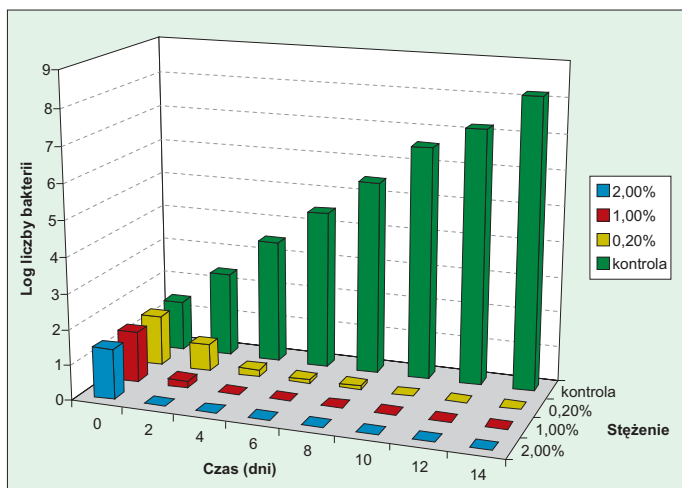
Siłę redukującą ekstraktów określano zgodnie z metodą Oyaizu (18). Pobrano 100 µl roztworu sporządzonego z handlowych ekstraktów wodnych o różnym stężeniu (0,1; 1 mg/ml) i zmieszano z 2,5 ml 200 mM buforu fosforanowego (pH 6,6) oraz z 2,5 ml 1% roztworu żelazicyjanku potasowego (Sigma). Po wymieszaniu inkubowano w łaźni wodnej o temp. 50°C przez 20 minut. Następnie dodano 2,5 ml 10% kwasu trichlorooctowego, wymieszano, po czym z górnej warstwy pobrano 2,5 ml roztworu i zmieszano z 2,5 ml wody dejonizowanej. Następnie dodano 1 ml 0,1% chlorku żelazowego. Absorbancję mierzono przy pomocy spektrofotometru UV-VIS Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech przy długości fali 700 nm. Siłę redukującą wyrażano wartością absorbancji – wysoka absorbancja wskazuje na wysoką siłę redukującą.

Oznaczenie ogólnej siły przeciwutleniającej wykonano metodą FRAP opisaną przez Benzie i wsp. (3). 100 µl próbki ekstraktów o różnym stężeniu (0,1; 1 mg/ml) dodawano do 2,5 ml roztworu buforu octanowego (pH – 3,6) zawierającego 20 mM TPTZ i 20 mM FeCl<sub>3</sub>. Wynik przedstawiono jako zmianę absorbancji (A<sub>593 nm</sub>) próbki w czasie 4 min. dla stężenia 1 mg/ml.

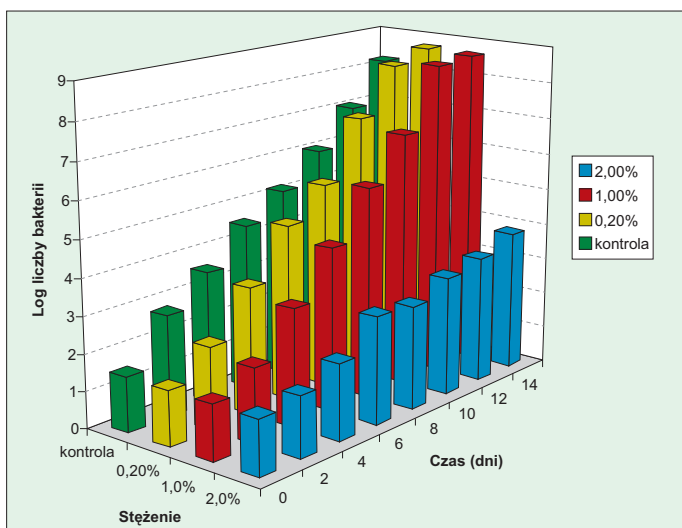
### Wyniki i omówienie

Rośliny zawierają bardzo wiele związków biologicznie aktywnych różniących się zarówno budową chemiczną, jak i obecnością heteroatomów. W niniejszych badaniach użyto wodnych ekstraktów handlowych z roślin zawierających związki o budowie polifenolowej (tymianek) oraz związki zawierające atomy siarki – izotiocjaniany (gorczyca, chrzan) i allicynę oraz jej pochodne (czosnek).

Spośród badanych handlowych ekstraktów wodnych chrzanu, gorzycy, czosnku i tymianku największą aktywnością biologiczną w stosunku do szczepu testowego *S. aureus* w temp. 13°C odznaczały się ekstrakty czosnku i chrzanu. Ekstrakty te wykazywały właściwości bakteriobójcze w stężeniach 1,0% i 2,0% oraz w stężeniu 0,2%, począwszy od 8. dnia inkubacji w przypadku czosnku i 10 dnia inkubacji w przypadku chrzanu. W ciągu pierwszych 7 dni inkubacji próbek z dodatkiem 0,2% powyższych ekstraktów obserwowano silne działanie bakteriostatyczne, dające redukcję wzrostu drobnoustroju testowego na poziomie 1-3 cykli logarytmicznych (ryc. 1 i 3).



Ryc. 1. Wpływ ekstraktu wodnego chrzanu na wzrost *Staphylococcus aureus* w temp. 13°C



Ryc. 2. Wpływ ekstraktu wodnego gorczycy na wzrost *Staphylococcus aureus* w temp. 13°C

Podwyższenie temperatury inkubacji do 20°C nie wpłynęło na działanie ekstraktów z chrzanu i czosnku.

W przypadku ekstraktu wodnego tymianku, w temp. 13°C zaobserwowano jedynie właściwości bakteriostatyczne w stężeniach 1,0% i 2,0% oraz brak aktywności biologicznej w najniższym stężeniu. W czasie inkubacji próbek z dodatkiem 1,0% ekstraktu tymianku stwierdzono redukcję wzrostu *S. aureus* na poziomie dwóch rzędów wielkości (przez cały okres inkubacji), podczas gdy przy 2,0% dodatku ekstraktu obserwowano narastającą (pierwsze 8 dni inkubacji), a następnie utrzymującą się na podobnym poziomie – około 4 cykli logarytmicznych redukcję wzrostu drobnoustroju testowego (ryc. 4).

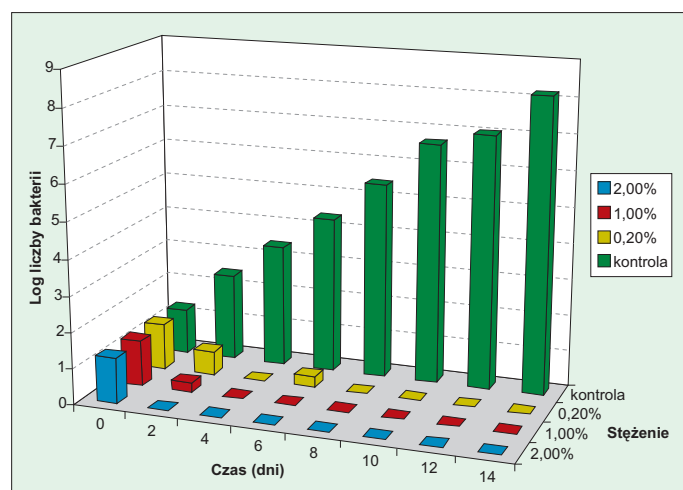
Stosunkowo niewielkie zmiany w zachowaniu się szczepu testowego obserwowano w temperaturze 20°C. Podobnie jak poprzednio, dodatek 0,2% ekstraktu pozostał bez wpływu na wzrost *S. aureus*, natomiast w przypadku dwóch pozostałych stężeń nastąpiło nieznaczne osłabienie aktywności bakteriostatycznej badanego ekstraktu. Ekstrakt 1,0% powodował redukcję

wzrostu drobnoustroju o 1 cykl logarytmiczny, zaś 2,0% o 2 cykle logarytmiczne, niezależnie od dnia inkubacji.

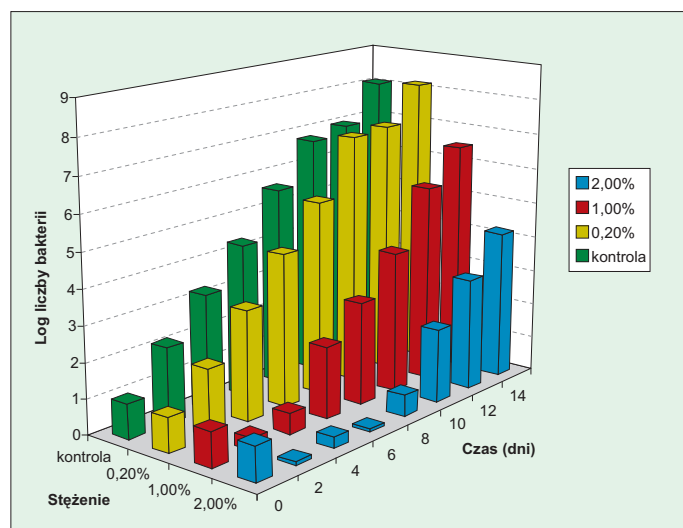
Najmniej efektywny okazał się ekstrakt wodny gorczycy, w przypadku którego nie zaobserwowano właściwości bakteriobójczych, a jedynie nasilające się w czasie wraz ze wzrostem stężenia działanie bakteriostatyczne. W ostatnim dniu inkubacji maksymalna redukcja wzrostu *S. aureus* sięgała rzędu 4 cykli logarytmicznych (ryc. 2).

W związku z uzyskaniem rezultatów niezadowolających w temperaturze 13°C, nie kontynuowano badań w temperaturze 20°C.

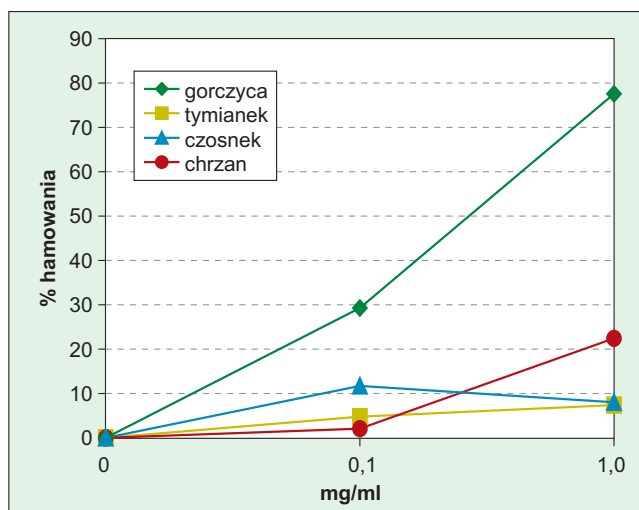
DPPH jest stabilnym wolnym rodnikiem. Przeciwutleniacze mogą z nim reagować, dostarczając elektronów lub atomów wodoru. Wodne ekstrakty gorczycy reagowały z DPPH najlepiej, a procent hamowania był proporcjonalny do użytego stężenia (80% dla 1,0 mg/ml i 30% dla 0,1 mg/ml). Tymianek, czosnek i chrzan wykazywały podobne właściwości, a procent hamowania DPPH był niski i wynosił nie więcej niż 20



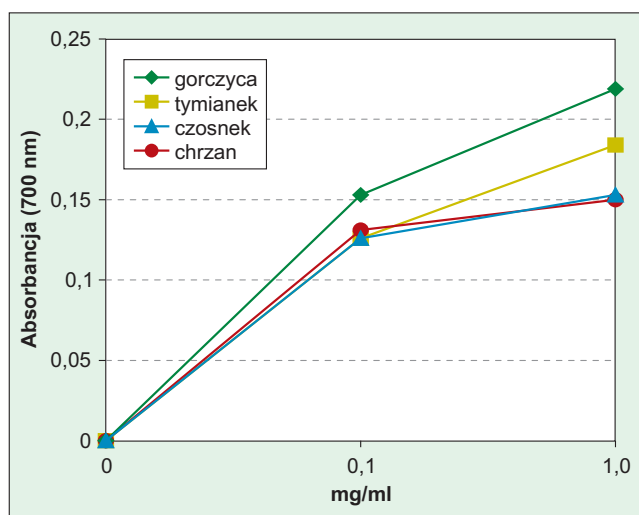
Ryc. 3. Wpływ ekstraktu wodnego czosnku na wzrost *Staphylococcus aureus* w temp. 13°C



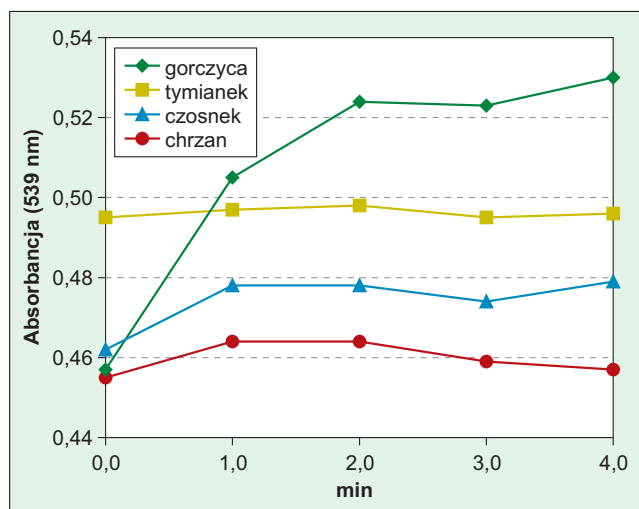
Ryc. 4. Wpływ ekstraktu wodnego tymianku na wzrost *Staphylococcus aureus* w temp. 13°C



Ryc. 5. Procent hamowania rodnika DPPH przez handlowe ekstrakty wodne z gorczycy, tymianku, czosnku i chrzanu



Ryc. 6. Zdolność redukująca jony żelaza handlowych ekstraktów wodnych gorczycy, tymianku, czosnku i chrzanu



Ryc. 7. Ogólna zdolność przeciwutleniająca handlowych ekstraktów wodnych gorczycy, tymianku, czosnku i chrzanu wyrażona jako zmiana absorbancji przy długości fali 593 nm

dla stężeń 1,0 mg/ml (ryc. 5). Podobne wyniki uzyskano przeprowadzając reakcję redukcji jonów żelaza (ryc. 6). Całkowitą zdolność przeciwutleniającą badanych ekstraktów oceniano przy użyciu metody FRAP. Również w tej reakcji gorczyca wykazała najsilniejsze właściwości przeciwutleniające (ryc. 7). Wszystkie handlowe ekstrakty wodne nie wykazywały jednak silnych właściwości przeciwutleniających. Na przykład, ekstrakt z herbaty o stężeniu 22,7 µg/ml znosi DPPH w 50% (18). Może to być związane ze zmianami w budowie chemicznej związków zawartych w ekstraktach podczas przechowywania.

## Podsumowanie

Aktywność biologiczna ekstraktów wodnych chrzanu, gorczycy, czosnku i tymianku w stosunku do szczepu testowego *S. aureus* jest zależna od składu chemicznego ekstraktów. Najsilniejszymi właściwościami charakteryzowały się ekstrakty czosnku i chrzanu zawierające w swoim składzie związki siarkowe. Istotny wpływ na rozwój mikroorganizmów ma również stężenie ekstraktu i czas inkubacji. Temperatura inkubacji nie miała istotnego wpływu na rozwój *S. aureus*. Ekstrakty wodne wymienionych roślin przyprawowych nie mają jednak silnych właściwości przeciwutleniających.

## Piśmiennictwo

1. Anon.: CDC. Surveillance for foodborne-disease outbreaks – United States 1993–1997. MMWR 2000, 49 (SSO1), 1–51.
2. Anon.: WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Seventh Report 1993–1998. Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV), Berlin 2001.
3. Benzie I. F. F., Strain J. J.: Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay. Methods Enzymol. 1999, 299, 15–27.
4. Berdowski J. B., Turlejska H.: HACCP – system zapewnienia bezpieczeństwa i jakości zdrowotnej żywności. Biblioteczka Jakości Europejskiego Instytutu Jakości, Warszawa 2003.
5. Dillon M., Griffith C.: How to HACCP. Mike Dillon Associates Ltd., Grimsby 1996.
6. Dyrektywa Rady 93/43/EEC z 14 czerwca 1993 r. w sprawie higieny środków spożywczych.
7. Hazard Analysis Critical Control Point system. Concept and Application. Report of a WHO Consultation with the participation of FAO. 29–31 May 1995.
8. Kalemba D.: Przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze właściwości olejków eterycznych. Post. Mikrobiol. 1999, 38, 191–192, 198–199.
9. Kostrzewa E.: Przyprawy ziołowe stosowane w przemyśle spożywczym. Przem. Spoż. 1999, 3, 14–16.
10. Polska Norma: PN–93/A–86034/02. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólne zasady badań.
11. Polska Norma: PN–A–82055–8: 1994. Mięso i przetwory mięsne. Badania bakteriologiczne. Wykrywanie obecności pałeczek z rodzaju Salmonella.
12. Przybylska A.: Zakażenia i zatrucia pokarmowe w Polsce w 2001 roku. Przegl. Epid. 2003, 57, 85–98.
13. Przybylska A.: Zakażenia i zatrucia pokarmowe w Polsce w 2002 roku. Przegl. Epidemiol. 2004, 58, 85–101.
14. Rosec J. P., Guiraud J. P., Dalet C., Richard N.: Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. Internat. J. Food Microbiol. 1997, 35, 213–221.
15. Turlejska H.: Zasady GHP/GMP oraz system HACCP jako narzędzia zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. Fundacja Programów Pomocy dla Rolnictwa, Warszawa 2003.
16. Ustawa z dnia 30 października 2003 r. o zmianie ustawy o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia oraz niektórych innych ustaw (Dz. U. z 8 grudnia 2003 r. Nr 208, poz. 2020).
17. Yamaguchi, T., Takamura H., Matoba T.: Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Biosci. Biotech. Biochem. 1998, 62, 1201–1204.
18. Yen G. C., Chen H. Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 27–32.

Adres autora: prof. dr hab. Jacek Szczawiński, ul. Nowoursynowska 159, 02-787 Warszawa; e-mail: szczawinski@alpha.sggw.waw.pl