

\*Magdalena Woźniak<sup>1</sup>, Izabela Ratajczak<sup>1</sup>, Patrycja Kwaśniewska<sup>2</sup>, Grzegorz Cofta<sup>2</sup>,  
Elżbieta Hołderna-Kędzia<sup>3</sup>, Bogdan Kędzia<sup>3</sup>, Bartłomiej Mazela<sup>2</sup>

## Badanie aktywności ekstraktów propolisowych wobec wybranych gatunków grzybów pleśniowych

<sup>1</sup>Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Piotr Goliński

<sup>2</sup>Instytut Chemicznej Technologii Drewna, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Bartłomiej Mazela

<sup>3</sup>Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Grzegorz Sychalski

### THE ACTIVITY OF PROPOLIS EXTRACTS AGAINST SELECTED MOULDS

#### SUMMARY

The aim of the study was to examine activity of propolis extracts against moulds. There were six strains of moulds examined in the study: *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Trichoderma virens*, *Aspergillus versicolor*, *Paecilomyces variotii* and *Chaetomium globosum*. The antifungal test was performed by methods of serial dilutions on fluid media – Sabouraud Broth. The MIC and MFC of the selected propolis extracts were determined in relation to *A. niger* in the preliminary research. *A. niger* and the other five moulds species were used in the second step of study, where the acetone and ethanolic extracts were already selected. The acetone extract showed the highest antifungal activity. Other propolis extracts showed lower activity against examined moulds. It has been proved that propolis extracts are potential antifungal substances for eco-friendly wood protection.

KEYWORDS: PROPOLIS – ANTIFUNGAL ACTIVITY – MOULDS

### Wprowadzenie

Propolis jako substancja pochodzenia naturalnego ze względu na swoje liczne korzystne właściwości znajduje szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach przemysłu. Jest on składnikiem suplementów diety, kosmetyków i zdrowej żywności (1). Ponadto doniesienia piśmiennictwa wskazują na możliwości zastosowania propolisu w optoelektronice oraz ochronie drewna (2, 3). Takie liczne zastosowanie i popularność tego surowca wynika z faktu, iż jego ekstrakty wykazują aktywność biologiczną, m.in. właściwości prze-

ciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwtleniające, przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe (1, 4, 5). Aktywność przeciwgrzybicza propolisu jest jedną z najczęściej badanych właściwości tego produktu. Ekstrakty propolisowe wykazują zdolność hamowania wzrostu grzybów powodujących choroby skóry u ludzi czy choroby roślin. Doniesienia piśmiennictwa wskazują również na możliwości wykorzystania ekstraktów propolisu w ochronie drewna przed korozją biologiczną (2, 6-8). Wykazano aktywność ekstraktów propolisowych wobec takich gatunków grzybów, jak *Candida albicans*, *Trichophyton cutaneum*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium italicum* oraz *Gloeophyllum trabeum* (1, 2, 6-8).

Mimo że właściwości przeciwgrzybicze propolisu są jednymi z najczęściej opisywanych właściwości biologicznych tego surowca, dotyczą one zazwyczaj grzybów powodujących stany chorobowe u ludzi, jak np. drożdżoidalne grzyby z rodzaju *Candida* spp., znacznie mniej jest doniesień wykazujących aktywność propolisu wobec gatunków grzybów występujących na owocach, roślinach czy drewnie. Niewiele jest również dostępnych danych piśmiennictwa na temat aktywności ekstraktów propolisu wobec gatunków grzybów pleśniowych zastosowanych w niniejszej pracy. Doniesienia naukowe wykazują, że ekstrakty propolisu hamują rozwój grzyba *A. niger* (13, 14) oraz innych gatunków z tego rodzaju (13, 15). Ponadto z licznych prac wynika, że propolis skutecznie zapobiega rozwojowi grzybów pleśniowych z rodzaju *Penicillium* spp. (6, 15) oraz *Trichoderma* spp. (7). Doniesienia piśmiennictwa wskazują również

na fakt, że grzyby pleśniowe wykazują znacznie większą oporność wobec aktywnych składników propolisu niż np. bakterie Gram-dodatnie (8, 15).

Do określania właściwości przeciwgrzybiczych propolisu stosowane są ekstrakty uzyskane przy wykorzystaniu takich rozpuszczalników, jak alkohol metylowy, chlorek metylenu, octan etylu, alkohol etylowy, alkohol n-butyłowy oraz aceton. Stwierdzono, że w zależności od zastosowanego do ekstrakcji rozpuszczalnika, zdolność hamowania rozwoju badanych drobnoustrojów przez ekstrakty propolisowe jest różna (6, 9-11). Jednakże w większości przypadków prace te dotyczą ekstrakcji wieloetapowych, gdzie z jednej porcji surowca pozyskiwane są kolejne frakcje wykorzystywane do badań. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki oznaczania aktywności ekstraktów propolisu uzyskanych w wyniku jednoetapowej ekstrakcji surowca.

### Cel pracy

Celem pracy było określenie działania ekstraktów propolisu otrzymanych w wyniku ekstrakcji surowca różnymi rozpuszczalnikami wobec wybranych gatunków grzybów pleśniowych.

### Materiały i metody

#### Ekstrakty propolisu

W pierwszym etapie badań wykorzystano 10 różnych ekstraktów propolisu. Otrzymano je na drodze ekstrakcji 10 g surowca za pomocą 100 ml rozpuszczalnika (1:10, m/v). Do ekstrakcji zastosowano następujące rozpuszczalniki: heksan, chloroform, octan etylu, chlorek metylenu, alkohol n-butyłowy, wodę dejonizowaną, 96% alkohol etylowy, 70% alkohol etylowy, alkohol metylowy i aceton (6, 9-11). Ekstrakcję prowadzono przez 5 dni z wykorzystaniem wytrząsarki, bez dostępu światła, w temperaturze pokojowej. Po tym czasie ekstrakty sączone i zagęszczano do suchej masy pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie suchą pozostałość rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (DMSO), w stężeniu 100 mg/ml.

W drugim etapie wykorzystano ekstrakty propolisu uzyskane za pomocą acetonu oraz 70 i 96% alkoholu etylowego (1:10, m/v). Sposób otrzymywania opisano powyżej. Następnie ekstrakty rozpuszczano w 70% alkoholu etylowym w stężeniu 100 mg/ml.

#### Grzyby pleśniowe stosowane w badaniach

W badaniach wykorzystano 6 szczepów wzorcowych grzybów pleśniowych: *Aspergillus niger* Tieghem (ATCC 6275), *Aspergillus versicolor*, *Penicillium pinophilum* Thom (CMI 114933), *Paecilomyces variotii* Bainire (ATCC 9645), *Trichoderma virens* Miller

i in. (ATCC 9645) oraz *Chaetomium globosum* Kunze: Fries (ATCC 6205). Szczepy przechowywano na pożywkach stałych Sabouraud Agar (Sigma-Aldrich) w temperaturze 4-6°C, przeszczepiając je raz w miesiącu na świeże podłoże agarowe, w celu zachowania czystości hodowli.

#### Określenie właściwości przeciwgrzybiczej

Z roztworów wyjściowych ekstraktów propolisowych w DMSO (100 mg/ml) przygotowano rozcieńczenia w płynnym podłożu Sabouraud Dextrose Broth (Sigma-Aldrich) w granicach 0,5-10 mg/ml. Następnie do każdego rozcieńczenia ekstraktu propolisu w podłożu o objętości 1 ml dodawano po 0,1 ml zawiesiny badanego szczepu *A. niger*. Zawiesinę odpowiednio rozcieńczano w tym samym podłożu płynnym co ekstrakty propolisu. Liczba dodawanych strząpek mieściła się w zakresie  $10^4$ - $10^5$  w 1 ml. Inkubację prowadzono w temperaturze 28°C przez okres 7 dni. Po tym czasie określano najmniejsze stężenia ekstraktów propolisu hamujące rozwój badanego szczepu MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) oraz minimalne stężenia grzybobójcze MFC (ang. *Minimal Fungicidal Concentration*).

Podobnie postępowano z roztworami wyjściowymi ekstraktów propolisowych w 70% alkoholu etylowym. Do każdego rozcieńczenia tych ekstraktów dodawano odpowiednio rozcieńczone zawiesiny wszystkich 6 badanych szczepów grzybów pleśniowych. Jako substancję referencyjną zastosowano przeciwgrzybiczy, syntetyczny związek chemiczny: 4,5-dichloro-2-oktylo-2H-izotiazol-3-on.

### Wyniki i ich omówienie

W tabeli 1 przedstawiono wydajność ekstrakcji składników propolisu z wykorzystaniem wybranych do badań rozpuszczalników. Największą wydajność ekstrakcji uzyskano stosując jako rozpuszczalnik chloroform oraz n-butanol, najmniejszą wydajnością natomiast odznaczał się ekstrakt wodny. Wydajność ekstrakcyjną w procentach wagowych obliczono według wzoru przedstawionego przez Merestę (12):

$$\frac{B \times 100\%}{A} = \% \text{ wagowy procesu ekstrakcji}$$

A – masa propolisu użyta do ekstrakcji,

B – masa suchego ekstraktu po zagęszczeniu.

Tabela 1 przedstawia charakterystykę ekstraktów propolisu pod względem ich działania hamującego rozwój szczepu testowego *Aspergillus niger* (MIC)

**Tabela 1.** Wydajność ekstrakcji składników propolisu z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników oraz charakterystyka ich oddziaływania na szczep *A. niger*.

Rozpuszczalnik	Wydajność ekstrakcji [%]	MIC [mg/ml]	MFC [mg/ml]
Heksan	12,2	7,5	7,5
Chloroform	93,1	2	5
Octan etylu	69,8	2,5	5
Chlorek metylenu	62,7	5	5
Alkohol n-butyłowy	87,0	5	7,5
Woda dejonizowana	1,8	5	5
Alkohol etylowy 96%	66,4	5	7,5
Alkohol metylowy	56,8	5	5
Alkohol etylowy 70%	56,1	5	7,5
Aceton	68,5	1	1

oraz działania grzybobójczego (MFC). Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że największą aktywność przeciwgrzybiczą wykazywał ekstrakt acetonowy. Wartości MIC i MFC wyniosły w obydwu przypadkach 1 mg/ml. Nieco niższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazał ekstrakt sporządzony przy użyciu chloroformu i octanu etylu. Wartości MIC i MFC dla tych ekstraktów wyniosły odpowiednio 2 i 5 oraz 2,5 i 5 mg/ml. Pozostałe ekstrakty wykazywały zbliżoną aktywność przeciwgrzybiczą wobec *A. niger*, dla których, poza ekstraktem heksanowym, MIC wynosiło 5 mg/ml. Wszystkie badane ekstrakty wykazywały taką samą lub wyższą aktywność przeciwgrzybiczą w porównaniu do etanolowego ekstraktu

propolisu opisanego w pracy przeglądowej autorstwa Kędzi i wsp. (8).

Na podstawie przedstawionych badań wstępnych do dalszych testów wytypowano ekstrakt acetonowy i ekstrakty etanolowe (uzyskane w wyniku ekstrakcji 70 i 96% alkoholem etylowym). Wyboru dokonano w oparciu o uzyskane wyniki dotyczące aktywności biologicznej (aceton) oraz uwzględniając aspekt ekologiczny i ekonomiczny (alkohol etylowy).

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badania aktywności przeciwgrzybiczej ekstraktów propolisowych wobec wybranych gatunków grzybów pleśniowych. Najbardziej podatny na działanie wszystkich badanych ekstraktów był szczep *C. globosum*, dla którego MIC

**Tabela 2.** Charakterystyka wytypowanych ekstraktów propolisu pod względem działania hamującego rozwój grzybów testowych oraz działania grzybobójczego.

Szczepy testowe grzybów pleśniowych	Ekstrakty propolisowe						4,5-dichloro-2-oktylo-2H-izotiazol-3-on	
	Aceton		Alkohol etylowy 70%		Alkohol etylowy 96%			
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
	[mg/ml]							
<i>A. niger</i>	7,5	10,0	7,5	10,0	7,5	10,0	0,75	1,0
<i>A. versicolor</i>	7,5	7,5	7,5	10,0	7,5	7,5	0,75	1,0
<i>C. globosum</i>	0,75	2,0	2,0	5,0	1,0	1,5	0,5	0,75
<i>P. variotii</i>	2,0	5,0	5,0	5,0	7,5	7,5	0,75	1,0
<i>P. pinophilum</i>	7,5	7,5	5,0	7,5	5,0	7,5	0,75	1,0
<i>T. vires</i>	5,0	5,0	5,0	7,5	5,0	7,5	1,0	1,0

wynosiło od 0,75 mg/ml dla ekstraktu uzyskanego w wyniku ekstrakcji acetonem do 2,0 mg/ml dla ekstraktu propolisowego uzyskanego za pomocą 70% alkoholu etylowego (MFC w zakresie 1,5-5,0 mg/ml). *A. niger* i *A. versicolor* wykazywały największą oporność wobec analizowanych ekstraktów propolisu ( $MIC \geq 7,5$  mg/ml). Wartości MIC i MFC dla badanych ekstraktów były znacznie wyższe niż dla 4,5-dichloro-2-oktylo-2H-izotiazol-3-on.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że nie ma znacznych różnic w aktywności przeciwgrzybiczej ekstraktów etanolowych (uzyskanych w wyniku ekstrakcji alkoholem etylowym 70 i 96%) wobec badanych gatunków grzybów, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Mavri i wsp. (15). Autorzy stwierdzili, że ekstrakty propolisu otrzymane w wyniku ekstrakcji alkoholem etylowym 70 i 96% wykazują taką samą aktywność wobec badanych szczepów bakterii i grzybów (15). Również Meresta (12) stwierdził, że przy użyciu roztworów alkoholu etylowego w stężeniu od 70 do 96% otrzymuje się ekstrakty propolisu o identycznej aktywności przeciwbakteryjnej. Autor nie wspomina jednak, czy podobną zależność otrzymał on także w odniesieniu do grzybów. Natomiast Kacaniova i wsp. (13) w swoich badaniach wykazali, że ekstrakt propolisu uzyskany w wyniku ekstrakcji alkoholem etylowym 70% wykazywał wyższą aktywność przeciwgrzybiczą i przeciwbakteryjną, niż ekstrakt uzyskany za pomocą alkoholu etylowego 96%.

Na podstawie przedstawionych w pracy wyników badań można stwierdzić, że aktywność przeciwgrzybicza ekstraktów propolisu jest różna w zależności od zastosowanego do ekstrakcji rozpuszczalnika. Najlepszą aktywnością przeciwgrzybiczą wobec badanych szczepów grzybów pleśniowych charakteryzował się ekstrakt acetonowy. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują również, że aktywność przeciwgrzybicza ekstraktów propolisu uzyskanych z zastosowaniem alkoholu etylowego 70 i 96% jest bardzo zbliżona.

Warto wiedzieć, że gatunki grzybów pleśniowych wykorzystane w badaniach są gatunkami rozwijającymi się na owocach, roślinach uprawnych oraz elementach wykonanych z drewna. Dlatego uzyskane wyniki aktywności przeciwgrzybiczej wszystkich badanych ekstraktów propolisowych wskazują na ich potencjalną możliwość wykorzystania w nietoksycznych i bezpiecznych dla środowiska preparatach impregnacyjnych, zabezpieczających drewno (np. opakowania mające kontakt z żywnością) przed szkodliwym działaniem grzybów pleśniowych powodujących jego rozkład.

Podjęta tematyka badań wychodzi naprzeciw obecnym trendom poszukiwań bezbiocydowych, przyja-

nych dla środowiska preparatów impregnacyjnych, opartych na substancjach pochodzenia naturalnego. Ponadto jest konsekwencją licznych ograniczeń w stosowaniu substancji biologicznie czynnych w środkach ochrony drewna wprowadzonych przez Unię Europejską (m.in. Dyrektywy: 1998/8/WE, 2004/42/WE) oraz rozporządzenia krajowe. Należy podkreślić, że w wielu przypadkach produkty naturalne charakteryzują się mniejszą aktywnością przeciwgrzybiczą niż syntetyczne związki chemiczne, natomiast ich zaleta jest niska toksyczność dla ludzi i środowiska.

## Wnioski

1. Spośród 10 badanych ekstraktów propolisu, największą zdolność hamowania rozwoju grzybów pleśniowych wykazał ekstrakt acetonowy.
2. Aktywność przeciwgrzybicza etanolowych ekstraktów propolisu (70 i 96%) jest bardzo zbliżona.
3. Powyższe badania wskazują na potencjalne zastosowanie ekstraktów propolisu jako składników nietoksycznych i przyjaznych dla środowiska impregnatów ochronnych do drewna.

*Badania zostały współfinansowane ze środków z dotacji na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Technologii Drewna (nr zadania badawczego: 507.472.40) oraz ze środków funduszy norweskich, w ramach programu Polsko-Norweska Współpraca Badawcza realizowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr Pol-Nor/203119/32).*

## Piśmiennictwo

1. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002; suppl. 1:1-6.
2. Budija F, Humar M, Kricej B i wsp. Propolis for wood finishing. *IRG/WP* 2008; 08-30464.
3. Drapak SI, Bakhtinov AP, Gavrylyuk SV i wsp. Structural and optical characterization of the propolis films. *Appl Surf Sci* 2006; 253:279-82.
4. Kujungiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y i wsp. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64:235-40.
5. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15:561-71.
6. Yang SZ, Peng LT, Su XJ i wsp. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Chem* 2011; 127:210-5.
7. Curifuta M, Vidal J, Sanchez-Venegas J. The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Cien Inv Agr* 2012; 39(2):347-59.
8. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Aktywność antybiotyczna propolisu krajowego i europejskiego. *Post Fitoter* 2013; 2:97-107.
9. Meneses EA, Durango DL, Garcia CM. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. *Quim Nova* 2009; 32(8):2011-7.
10. Aguero MB, Svetaz L, Sanchez M i wsp. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (*Zygophyllaceae*). HPLC-MS and GC-MS characterization and antifungal activity. *Food Chem Toxicol*

- 2011; 49:1970-8. **11.** Prytyk E, Dantas AP, Salomao K i wsp. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J Ethnopharmacol* 2003; 88:189-93. **12.** Meresta T. Ekstrahowanie propolisu. *Pszczelnictwo* 1997; 3:5-6. **13.** Kacaniova M, Vukovic N, Chlebo R i wsp. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Arch Biol Sci* 2012; 64(3):1545-57. **14.** Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M i wsp. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chem* 2007; 103:1097-103. **15.** Mavri A, Abramovic H, Polak T i wsp. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. *Chem Biodivers* 2012; 9:1545-58.

otrzymano/received: 08.09.2015  
zaakceptowano/accepted: 14.10.2015

Adres/address:  
\*mgr Magdalena Woźniak  
Katedra Chemii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań  
tel. +48 (61) 848-78-38  
e-mail: magdalena.wozniak@up.poznan.pl