

Joanna Roman, Edyta Lipińska

## WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWPLEŚNIOWE SUPERNATANTÓW Z HODOWLI BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydziału Nauk o Żywności  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: dr hab. S. Błażej prof. SGGW

*W pracy badano przeciwplesniowe właściwości supernatantów uzyskanych po hodowli *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus fermentum*. Supernatanty wykazały działanie hamujące wobec pleśni *Aspergillus niger* ATCC 9142; *Aspergillus oryzae* F IX; *Aspergillus flavus*; *Fusarium* sp. FVII; *Penicillium notatum* E 30; *Trichoderma harzianum* KKP534. W zależności od użytego szczepu bakterii fermentacji mlekowej, supernatanty hamowały rozwój pleśni w różnym stopniu. Najbardziej wrażliwe na działanie substancji zawartych w supernatancie bakterii fermentacji mlekowej okazały się pleśnie z rodzaju *Fusarium* i *Penicillium*. Największą skuteczność w hamowaniu wzrostu badanych pleśni posiadał supernatant *Lb. plantarum* ATCC 4080.*

Hasła kluczowe: bakterie fermentacji mlekowej, właściwości przeciwplesniowe  
Key words: lactic acid bacteria, antifungal activity

Pleśnie znajdujące się w żywności, powodują duże straty ekonomiczne jak również są groźne ze względu na produkowane przez nie alergizujących zarodników i mykotoksyn - substancji toksycznych dla człowieka (1). Najczęściej występujące pleśnie np. w zbożach w Polsce należą do rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* oraz *Fusarium* (2).

Bakterie fermentacji mlekowej (w skrócie LAB- z ang. Lactic Acid Bacteria) wykazują właściwości antagonistyczne w stosunku do wielu szkodliwych drobnoustrojów. Mają zdolność hamowania wzrostu pleśni i usuwania wytwarzanych przez nie mykotoksyn (3). Jedną z fungistycznych substancji produkowanych przez bakterie fermentacji mlekowej, jest mieszanina kwasu mlekowego i octowego. Kwas mlekowy nie wykazuje właściwości przeciwplesniowych, jedynie kwas octowy. Działanie kwasu octowego zależy od niskiego pH, obniżonego przez kwas mlekowy. Heterofermentujące bakterie fermentacji mlekowej wytwarzają również w niewielkich ilościach kwas propionowy, który hamuje wzrost pleśni szczególnie przy niskim pH (4). Kwas fenylomlekowy i 4-hydroksy-mlekowy to również silne substancje mające właściwości fungistyczne, produkowane przez bakterie fermentacji mlekowej. Kwas fenylomlekowy wykazuje inhibujące właściwości wobec pleśni *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium* na poziomie ok.

3,75-7,7 mg/cm<sup>3</sup>. Największą aktywność wobec pleśni kwas fenylo mlekowy wykazuje w niskim pH, dlatego niezwykle ważna jest rola kwasu mlekowego, który obniża kwasowość środowiska. Związki te nie tracą swoich właściwości podczas obróbki cieplnej produktu spożywczego (5, 6). W podłożach pochodzących bakterii fermentacji mlekowej, zidentyfikowano również nowe substancje - cykliczne dipeptydy - hamujące przede wszystkim rozwój pleśni. W supernatantach dwóch szczepów *Lb. plantarum* stwierdzono występowanie cyklicznej L-feniloalaniny-L-proliny [cyklo(L-Phe-L-Pro)] cyklicznej L-feniloalaniny-4hydroksy-L-proliny [cyklo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro)] i cyklicznej L-leucyno-L-proliny [cyklo(L-Leu-L-Pro)] (4, 7).

Celem niniejszej pracy było określenie aktywności przeciwpleśniowej trzech supernatantów otrzymanych po 24 godzinnej hodowli *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus fermentum* wobec siedmiu wybranych pleśni.

## MATERIAŁ I METODY

W celu uzyskania supernatantów najpierw przeprowadzano trzy oddzielne hodowle *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus fermentum* w podłożu MRS w temperaturze 28°C. Po 24 godzinach, w celu oddzielenia biomasy od supernatantu próbki wirowano przez 15 minut przy 2000 x g. Po odwirowaniu biomasy zlewano supernatant, który następnie filtrowano przez filtr celulozowy o wielkości porów 0,22µm. Tak otrzymany jałowy supernatant był dodatkowo neutralizowany do pH 6,5.

Badaniami zostały objęte następujące szczepy pleśni: *Aspergillus niger* ATCC 9142; *Aspergillus oryzae* F IX; *Aspergillus flavus*; *Fusarium* sp. FVII; *Penicillium notatum* E 30; *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145; *Trichoderma harzianum* KKP534. Do badań wykorzystywano zarodniki pleśni zawieszony w soli fizjologicznej w stężeniu 10<sup>5</sup> jtk/cm<sup>3</sup>.

Wrażliwość pleśni na działanie supernatantów wykonano metodą płytkowo dyfuzyjną. Posiewano wgłębnie 1cm<sup>3</sup> zarodników pleśni na podłoże brzeżkowe. Na powierzchni podłoża nakładano jałowe krążki o średnicy 7 mm, następnie nakrapiano na nie 20µl supernatantu. Płytki pozostawiano na 1 h w temperaturze pokojowej w celu wystąpienia dyfuzji supernatantu do podłoża, następnie inkubowano w temperaturze 28°C przez 48 godzin. Po inkubacji dokonano pomiaru średnicy uzyskanych stref zahamowania wzrostu wokół krążków. Wynik podawano w mm po odjęciu średnicy krążka.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W tabeli I zestawiono wielkość stref zahamowania wzrostu pleśni wynikającą z działania supernatantów bakterii fermentacji mlekowej.

W zależności od zastosowanego szczepu bakterii fermentacji mlekowej uzyskane supernatanty hamowały w różnym stopniu wzrost pleśni z rodzaju *Aspergillus*. Najbardziej z nich wrażliwą pleśnią na działanie metabolitów znajdujących się

w supernatantach okazał się *Aspergillus oryzae* F IX. Nie stwierdzono stref zahamowania wzrostu *Aspergillus niger* ATCC 9142 wokół krążków z supernatantem *L. brevis*. *Trichoderma harzianum* KKP534 była hamowana na porównywalnym poziomie, co pleśnie z rodzaju *Aspergillus*. Pleśnie *Fusarium sp.* FVII i *Penicillium notatum* E 30 były najbardziej wrażliwe na działanie supernatantów LAB. W badaniach *Valerio i wsp.* (8) również obserwowano większą wrażliwość pleśni z rodzaju *Penicillium* niż z rodzaju *Aspergillus*, na działanie bakterii fermentacji mlekowej. W badaniach przeprowadzonych przez *Diowks* (2) w ogóle nie obserwowano zahamowania wzrostu *Aspergillus niger*, wzrost pleśni z rodzaju *Fusarium* i *Penicillium* hamowany był na tym samym poziomie. Wzrost większości badanych pleśni najlepiej hamował supernatant uzyskany z hodowli *Lb. plantarum* ATCC 4080. Większość doniesień literaturowych dotyczących właściwości przeciwplesniowych LAB opisuje ten właśnie gatunek bakterii fermentacji mlekowej jako najlepiej hamujący rozwój pleśni.

Tabela 1. Aktywność przeciwplesniowa supernatantów z hodowli bakterii fermentacji mlekowej

Table 1. Antifungal properties of cell-free supernatant of lactic acid bacteria

Szczepy antagonistyczne / Szczepy wskaźnikowe	Supernatant <i>Lb. brevis</i>	Supernatant <i>Lb. fermentum</i>	Supernatant <i>Lb. plantarum</i> ATCC 4080
Średnica stref zahamowania wzrostu [mm] (±SD)			
<i>Aspergillus flavus</i>	5,7 (±0,4)	6,3 (±0,5)	6,6 (±1,0)
<i>Aspergillus oryzae</i> F IX	7,5 (±0,4)	7,1 (±0,6)	9,1 (±0,5)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	0	6,0 (±0,4)	8,3 (±0,8)
<i>Fusarium sp.</i> FVII	11,1 (±0,6)	8,5 (±1,0)	10,9 (±0,8)
<i>Penicillium notatum</i> E 30	10,2 (±1,0)	7,7 (±0,8)	9,8 (±0,4)
<i>Trichoderma harzianum</i> KKP534	5,0 (±0,8)	6,2 (±1,0)	6,9 (±0,8)
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	0	0	0

[mm] (±SD) – średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe

W przypadku wszystkich badanych supernatantów nie obserwowano zahamowania wzrostu *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145. *Soccol i wsp.* (9), po przebadaniu trzech szczepów *Rhizopus arrhizus* stwierdzili, że wytwarzały znaczące ilości

kwasu L-mlekowego. Z tego względu, *Rhizopus arrhizus* mógł nie być hamowany przez wszystkie badane supernatanty.

### WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki wykazały, że supernatanty uzyskane po hodowli LAB wykazują właściwości przeciwplesniowe.
2. Plesnie z rodzaju *Fusarium*, *Penicillium* okazały się najbardziej wrażliwe na działanie substancji zawartych w supernatancie bakterii fermentacji mlekowej.
3. Największą skuteczność w hamowaniu wzrostu badanych pleśni posiadał supernatant *Lb. plantarum* ATCC 4080.
4. Badane supernatanty nie hamowały wzrostu *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145.

J. Roman, E. Lipińska

### ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CELL-FREE SUPERNATANT OF LACTIC ACID BACTERIA

#### Summary

The present work examines antifungal properties of cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus fermentum*. The cell-free supernatant have shown inhibiting activity against *Aspergillus niger* ATCC 9142; *Aspergillus oryzae* F IX; *Aspergillus flavus*; *Fusarium sp.* FVII; *Penicillium notatum* E 30; *Trichoderma harzianum* KKP534. *Penicillium notatum* E 30 and *Fusarium sp.* FVII were the most sensitive organisms. *L. plantarum* showed a broad spectrum of antifungal activity.

### PIŚMIENNICTWO

1. Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J.: Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 2003; 219 (1): 129-135. - 2. Diowska A.: Biokonserwacja pieczywa dzięki zastosowaniu zakwasu. Przeg. Piek. Cukiern., 2004; 51 (4): 6-10. - 3. Zinedine A., Faid M., Benlemlih M.: In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. Intern. J. of Agric. Biol., 2005; 7 (1): 67-70. - 4. Schnürer J., Magnusson J.: Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends Food Sci. Technol., 2005; 16 (2): 70-78. - 5. Messens W., De Vuyst L.: Inhibitory substances produced by *Lactobacillus* isolated from sourdoughs – a review. Int. J. Food Microbiol., 2002; 72 (1-2): 31-43. - 6. Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A.: Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl. Environ. Microbiol., 2003; 69 (1): 634-640. - 7. Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J.: *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Appl. Environ. Microbiol., 2002; 68 (9): 4322-4327. - 8. Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M., Visconti A.: Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. FEMS Microbiol. Lett., 2004; 233 (2): 289-295. - 9. Soccol C.R., Stonoga V.I., Raimbault M.: Production of l-lactic acid by *Rhizopus* species. World J. Microbiol. Biotechnol., 1994; 10: 434-435.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159c