

PRETHODNO PRIPOČENJE / PRELIMINARY COMMUNICATION

Antifungalni učinak bakterije *Lactobacillus plantarum* K1 na rast plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318

Antifungal Effect of the Bacterium *Lactobacillus plantarum* K1 on Growth of Mold *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318

Domagoj Čvek*, Jadranka Frece, Ksenija Markov, Maja Friganović, Frane Delaš

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Većina namirnica i krmiva osjetljiva je na kontaminaciju plijesnima u različitim fazama proizvodnje, prerade, transporta i uskladištenja. Tako klimatski uvjeti i uvjeti prilikom procesa proizvodnje, transporta i uskladištenja mogu pospješiti porast plijesni, kao i sintezu mikotoksina. Suvremena proizvodnja zahtijeva što manju upotrebu kemijskih spojeva za očuvanje i zaštitu prehrambenih proizvoda i krmiva pa se koriste bakterije mliječne kiseline koje proizvode metabolite koji imaju antifungalni učinak, te sprečavaju kvarenje hrane i krmiva uzrokovano nepoželjnim vrstama plijesni. Stoga je u ovom radu istraživano antifungalno djelovanje izolata bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1 na rast plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 u tekućoj hranjivoj podlozi (kvašćev ekstrakt) pri 28 °C tijekom 28 dana. Istraživanja rasta ove plijesni su provedena u podlozi uz dodatak supernatanta fermentirane hranjive podloge u kojoj je porasla bakterija *Lactobacillus plantarum* K1 i u prisutnosti suspenzije stanica ove bakterije. Rezultati su pokazali da suspenzija stanica bakterije *Lactobacillus plantarum* K1 značajno inhibira rast plijesni tijekom prvih 14 dana inkubacije, dok supernatant pokazuje dobar inhibitorski utjecaj na rast plijesni kroz duži period inkubacije.

Ključne riječi: *Aspergillus ochraceus*, *Lactobacillus plantarum*, plijesni, antifungalni učinak, biomasa

Summary

Most of the food and feed are contamination sensitive to molds in various stages of production, processing, transportation and storage. Thus, climate conditions and conditions during the production process, transport and storage can enhance the growth of molds and mycotoxin synthesis. Reduced utilization of chemical compounds added in order to preserve and protect food and animal feed is required in modern production. So, lactic acid bacteria which produce metabolites with antifungal effect and prevent spoilage of food and feed by undesirable molds have been used. Therefore, in this paper antifungal activity of isolate of lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* K1 on the growth of mold *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 in broth (yeast extract) at 28 °C for 28 days was investigated. Investigation of the growth of the mold was carried out in the broth with addition of supernatant of fermented broth in which bacterium *Lactobacillus plantarum* K1 grew and in the presence of the bacterial cell suspension. The results show that during first 14 days of incubation the mold growth was significantly inhibited by cell suspension of bacterium *Lactobacillus plantarum* K1, while good inhibitory effect of the supernatant on the growth of the mold was obtained with longer incubation time.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*, *Lactobacillus plantarum*, molds, antifungal effect, biomass

Uvod

Plijesni su velika skupina gljiva široko rasprostranjena u prirodi, bilo u obliku aktivno živućih vegetativnih tijela ili u obliku latentnih spora. Tijelo im je građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila, obično bezbojnih. Nitaste su građe, a niti (hife) rastu kao isprepletana masa koja se naziva micelij. Micelij se, kao prašnjava ili paučinasta (pahuljasta) prevlaka, rasprostire po podlozi (Markov, 2005).

Svojim metabolizmom plijesni proizvode različite kemijske spojeve, od jednostavnih organskih kiselina do velikih i složenih molekula. Jedna od važnijih skupina metabolita plijesni su mikotoksini koji uzrokuju mnoga oboljenja nazvana mikotoksikoze.

Mikotoksini (mykes – grč. gljiva, toxikon – grč. otrov) su toksični sekundarni metaboliti plijesni. Niske su molekularne mase, ne sudjeluju u primarnom metabolizmu plijesni i nemaju

određenu metaboličku funkciju pri njihovom rastu i razvoju (Delaš i sur., 1995). Biosinteza sekundarnih metabolita plijesni (mikotoksina) nastaje kao odgovor na okolišne uvjete, odnosno fizikalno-kemijske parametre (količina slobodne vode – a_w , temperatura, koncentracija kisika i pH supstrata) (Yiannikouris i Jouany, 2002).

Da bi se spriječila kontaminacija namirnica i krmiva toksigenim plijesnima, kako u polju tako i tijekom uskladištenja, te umanjio utjecaj toksičnih tvari na ljudsko zdravlje provodi se kontrola okoline ili se istražuje inhibicija rasta plijesni i sinteza toksina pomoću fungicida, insekticida i/ili konzervansa.

Aspergillus ochraceus vrlo je raširena plijesan u osušenim namirnicama kao što su kikiriki, orasi, grah, osušeno voće, osušena riba i meso osušeno na suncu (Duraković i Duraković, 2003). Ova plijesan česti je kontaminant hrane jer je prisutna u tlu i na žitaricama koje se obrađuju za konzumaciju ako je u okolini prisutno više od 16 % vlage.

Corresponding author: dcvek@pbf.hr



Plijesan *Aspergillus ochraceus* ima sposobnost sinteze mikotoksina pod nazivom okratoksin A koji uzrokuje toksikoinfekcije (mikotoksikoze) pri konzumiranju hrane u kojoj je prisutan. Također u ljudi i životinja uzrokuje nefropatiju, teško oboljenje bubrega.

Kako se danas zahtijeva što manja upotreba kemijskih spojeva u čuvanju i zaštiti hrane, sve se više provode istraživanja koja uključuju bakterije mliječne kiseline (BMK) u svrhu zaštite hrane od nepoželjnih mikroorganizama.

Antifungalnim svojstvima bakterija mliječne kiseline pridavalo se malo pozornosti. Batish je 1989. godine istraživao antifungalnu aktivnost različitih mliječnih starter kultura s ciljem komercijalizacije antifungalnog potencijala. Izolirao je nekoliko sojeva roda *Streptococcus* koji inhibiraju različite plijesni. Istraživani sojevi koji su proizveli antifungalne tvari nisu identificirani, no najveći prinos tih tvari zabilježen je pri pH 6,8 i temperaturi od 30 °C. Primarni zaštitni efekt postiže se zbog proizvodnje mliječne kiseline što snižava pH te direktno inhibira mnoge mikroorganizme (Brul i Coote, 1999).

Za nekoliko metabolita bakterija mliječne kiseline dokazano je da posjeduju antifungalnu aktivnost, a to su: diacetil, ruterin, vodikov peroksid, ciklički dipeptidi, organske kiseline (mliječna, octena, propionska), fenil-laktatna kiselina te 3-hidroksi masne kiseline (Lindgren i Dobrogosz, 1990; Frece i sur., 2005; Frece, 2007; Frece i sur., 2009). Neke od njih (npr. mliječna kiselina i reuterin) inhibiraju bakterije, kvasce i nitaste gljive, dok drugi, kao što su bakteriocini, utječu samo na usko povezane bakterije. Istraživanja o antifungalnim osobinama BMK otkrila su brojne komponente s inhibitornim učincima na različite plijesni i kvasce (Sjögren i sur., 2003). *Lavermicocca* i suradnici pronašli su fenil-laktatnu kiselinu i 4-hidroksi fenil-laktatnu kiselinu kao bitne sastojke antifungalnog djelovanja kod bakterija mliječne kiseline (*Lavermicocca*, i sur., 2000). Također su dokazali da ti spojevi mogu utjecati na produljenje roka trajanja namirnica. Corsetti i suradnici dokazali su da mješavina organskih kiselina je sinergistički odgovorna za inhibitorni učinak (Corsetti i sur., 1998). Sve te tvari su male molekularne mase. Također su otkrili nedefinirane proteinske sastojke sa širokom antifungalnom aktivnošću (Magnusson i Schnürer, 2001). No, sam mehanizam antimikrobne aktivnosti bakterija mliječne kiseline je teško objasniti zbog kompleksnih i međusobno povezanih interakcija različitih spojeva (Šušković, 1996; Niku-Paavola i sur., 1999).

BMK se zbog svojih antifungalnih aktivnosti uspješno mogu koristiti kao biokonzervansi u hrani ili krmivu za poboljšanje kvalitete, čime se smanjuje uporaba kemijskih aditiva i sprječava rast kvasaca koji uzrokuju kvarenje i rast mikotoksikogenih plijesni.

Materijali i metode rada

Mikroorganizmi

Pri izradi ovog rada za istraživanje antifungalnog učinka upotrijebljena je bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1 (izolirana iz domaćeg slavonskog kulena), a kao test-mikroorganizam upotrijebljena je plijesan *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 (izolirana iz domaće kobasice) iz

Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZMPBF).

Hranjive podloge

Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline: MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) – agar (pepton 10 %, mesni ekstrakt 10 %, kvašćev ekstrakt 5 %, glukoza 20 %), MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) – bujon (istog sastava kao podloga MRS-agar, samo bez dodanog agara). Korištene su i podloga za sporulaciju plijesni (vodeni ekstrakt krumpira, agar, glukoza), Czapekova podloga za uzgoj plijesni, podloga za rast plijesni - kvašćev ekstrakt (kvašćev ekstrakt 2 %, saharoza 20 %).

Uzgoj inokuluma

Kultura istraživane plijesni nacijspljena je na kosi krumpirov glukozni agar te je inkubirana sedam dana pri 28 °C. Nakon inkubacije u epruvetu je dodano 5 mL sterilne vodene otopine TRITON X-100 5 mg x L⁻¹. Konidiospore plijesni su lagano skinute s mikrobiološkom ušicom. Time je dobivena suspenzija spora koja je homogenizirana u Poterovu homogenizatoru. Na osnovi izbrojanih spora u Thoma-ovoj komorici dobivena suspenzija je razrijeđena do koncentracije 10⁵ spora x mL⁻¹ suspenzije.

Kao podloga za uzgoj upotrijebljen je kvašćev ekstrakt (YES-podloga). Tikvice s podlogom su sterilizirane 20 minuta pri 121 °C. Ohlađena podloga nacijspljena je s 10⁵ spora x mL⁻¹ suspenzije plijesni, a potom s 10⁸ st. x mL⁻¹ bakterija mliječne kiseline i s po 10 mL supernatanta bakterija mliječne kiseline. Tako pripremljene podloge inkubirane su pri 28 °C tijekom 28 dana.

Supernatant fermentirane podloge u kojoj je uzgojena BMK *Lactobacillus plantarum* K1 dobiven je centrifugiranjem podloge te je 5 mL tako dobivenog supernatanta dodan u podlogu u kojoj je inkubirana plijesan.

Određivanje količine biomase plijesni u kvašćevom ekstraktu

Iz podloge u kojoj je uzgajana plijesan *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 biomasa je izdvojena filtracijom pomoću Büchnerovog lijevka preko Whatman No.1 filter papira, prethodno osušenog na 105 °C i izvaganog. Nakon sušenja filter papira s biomasom plijesni pri 105 °C u sušioniku do konstantne mase vaganjem je određena masa biomase kao pokazatelj rasta istraživane plijesni. Inhibicija rasta plijesni izračunata je u postotku prema izrazu (Duraković, 1991):

$$\% \text{ inhibicije} = (1 - (m_1/m_2)) \times 100$$

m_1 = suha tvar biomase u uzorku koji sadrži inhibitor (g)

m_2 = suha tvar biomase u kontrolnom uzorku (g)

Rezultati i rasprava

Utjecaj bakterija mliječne kiseline, i stanica i supernatanta, na rast plijesni praćen je tijekom 28 dana pri temperaturi od 28 °C u tekućoj YES podlozi.

Tablica 1. Utjecaj suspenzije stanica bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1 na rast plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 tijekom 28 dana pri temperaturi inkubacije od 28 °C
Table 1. Effect of cell suspension of lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* K1 on the growth of mold *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 during 28 days at a incubation temperature of 28 °C

BMK/LAB	Dani uzgoja/ Days of cultivation	% inhibicije/ % of inhibition
Suspenzija stanica bakterije/ Cell suspension of bacterium <i>Lactobacillus plantarum</i> K1	7	97,88
	14	85,52
	21	45,51
	28	11,67
Supernatant/Supernatant	7	38,78
	14	66,87
	21	77,89
	28	55,77

Rezultati rada prikazani su u tablici 1 i na slici 1. U tablici 1 prikazana je inhibicija rasta (%) plijesni, a na slici 1 odnos mase suhe tvari biomase plijesni u kontrolnom uzorku, u uzorcima u koje je dodana suspenzija bakterijskih stanica i u uzorcima u koje je dodan supernatant.

Na osnovi dokaza o osjetljivosti mnogobrojnih životinjskih vrsta na različite učinke mikotoksina postoji sumnja o uključenju mikotoksina u bolesti u ljudi koji žive u regijama gdje je onečišćenje hrane mikotoksinima česta pojava. Stoga je najvažnije da se onemogući kontaminacija namirnica i krmiva mikotoksikogenim vrstama plijesni jer već vrlo male količine biomase plijesni sintetiziraju mjerljive količine toksina. Zato prevencija sinteze toksina može biti provedena na najmanje dva načina, kontrolom okoliša ili upotrebom antifungalnih agenasa.

Praćenje promjene mase suhe tvari biomase tijekom rasta mikroorganizama je od izuzetne važnosti jer količina biomase u hranjivoj podlozi utječe na sintezu produkata metabolizma. U ovom je radu količina biomase u tekućem supstratu određena gravimetrijski.

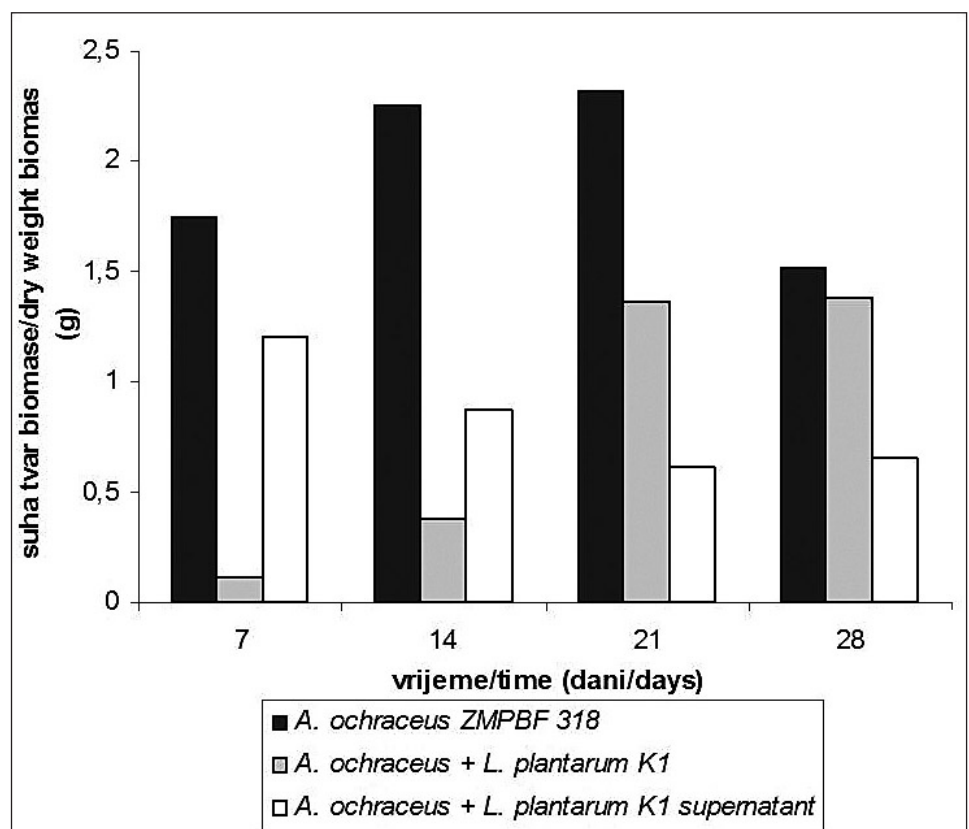
Dosadašnja istraživanja utjecaja različitih vrsta bakterija mliječne kiseline na rast različitih vrsta plijesni pokazala su značajno antifungalno djelovanje. Ta činjenica

potakla je i ovo istraživanje radi pronalaženja uvjeta za primjenu bakterija mliječne kiseline u sprječavanju rasta istraživane plijesni.

Najveća količina biomase plijesni dokazana je nakon 21. dana uzgoja i iznosila je 2,32g. Kao što prikazuje slika 1, stanice BMK pokazuju značajnu inhibiciju rasta plijesni u prvih 14 dana uzgoja, u odnosu na pokuse sa supernatantom BMK koji pokazuje svoje inhibitorno djelovanje s dužim vremenom inkubacije. U pokusima sa stanicama bakterija mliječne kiseline uočava se inhibitorni utjecaj na rast plijesni, od 98 % do 87 %, tijekom prvih 14 dana uzgoja, dok u ostalim vremenima inkubacije dolazi do smanjenja inhibicije,

odnosno od 21 do 28 dana kada je maksimalan rast plijesni bio oko 87 % u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnim uzorcima (tablica 1).

Dobiveni rezultati podudaraju se sa rezultatima Ströma i sur. (2002) koji navode da njihov soj *Lactobacillus plantarum*



Slika 1. Usporedba mase biomase određene tijekom rasta plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 u prisutnosti suspenzije stanica bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1 i supernatanta tijekom 28 dana inkubacije pri 28 °C u YES-podlozi

Figure 1. Comparison of the mass of the biomass during growth of mold *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 in the presence of cell suspension of lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* K1 and supernatant during 28 days of incubation at 28 °C in YES-medium



MiLAB393 iskazuje snažnu antifungalnu aktivnost prema mikotoksikotvornim plijesnima iz roda *Aspergillus* i *Penicillium*. U istim uvjetima uzgoja provedeni su pokusi kojima se pratio rast biomase plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 u tekućoj podlozi u prisutnosti supernatanta bakterije mliječne kiseline. U pokusima sa supernatantom BMK smanjen je prirast biomase plijesni za 38 % tijekom prvih 7 dana uzgoja. Od 14. dana očituje se pad količine biomase za 67 %, dok je maksimalna inhibicija rasta dobivena nakon 21 dana uzgoja i iznosila je 78 %. Rezultati istraživanja rasta plijesni u pokusima s dužim vremenom inkubacije (28 dana), pokazuju da utjecaj supernatanta bakterija mliječne kiseline postepeno slabi te je zabilježen porast biomase od 40 % u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnom uzorku.

Do nedavno se većina istraživanja antifungalnog učinka bakterija mliječne kiseline bazirala na njihovim inhibitornim efektima, ali ne i na aktivnim sastojcima, proizvedenim njihovim metabolizmom, kao i drugim razlozima odgovornim za tu inhibitornu aktivnost. Samo je nekoliko istraživanja dokazalo da BMK osim organskih kiselina proizvode i antifungalne peptide, odnosno proteine.

Lavermicocca i sur. (2000) identificirali su antifungalne spojeve fenil-mliječnu kiselinu i 4-hidroksi mliječnu kiselinu iz *Lactobacillus plantarum* izolirane iz kiselog tijesta.

Corsetti i sur. (1998) su također iz kiselog tijesta izolirali bakteriju mliječne kiseline, *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, koja ima inhibitorni učinak na rast plijesni. Dokazali su da je za inhibiciju odgovorno djelovanje različitih organskih kiselina pronađenih u supernatantu dobivenog od navedene bakterije mliječne kiseline.

Ström i sur. (2002) identificirali su tri antifungalna spoja u supernatantu dobivenog od *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393; 3-fenil mliječnu kiselinu te cikličke dipeptide ciklo(L-Phe-L-Pro) i ciklo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro). Njihova istraživanja su pokazala da su na te spojeve najosjetljivije plijesni bile *Fusarium sporotrichioides* i *Aspergillus fumigatus*.

Zaključci

Područje istraživanja antifungalnog djelovanja bakterija mliječne kiseline još je uvijek novo i zahtijeva dodatna istraživanja. Iz dobivenih rezultata istraživanja utjecaja bakterija mliječne kiseline na rast plijesni *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 može se zaključiti da i stanice i supernatant bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1 pri 28 °C u tekućoj podlozi kvašičev ekstrakt mogu inhibirati rast plijesni *Aspergillus ochraceus*, no točan način njihova djelovanja još nije poznat.

Također spojevi proizvedeni metabolizmom bakterija mliječne kiseline, koji vjerojatno djeluju sinergijski, imaju veliki udio u ukupnom inhibitornom učinku.

U budućnosti će istraživanja na ovom polju vjerojatno objasniti točan način djelovanja tih spojeva što bi uvelike moglo koristiti u određivanju najboljeg mogućeg načina primijene bakterija mliječne kiseline u sprječavanju rasta plijesni opasnih po zdravlje u ljudi.

Literatura

Brul S., Coote P., (1999): Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms, *International Journal of Food Microbiology*, br. 50, str. 1-17.

Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P. (1998): Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1, *Applied Microbiology and Biotechnology*, br. 50, str. 253-256.

Delaš F., Duraković S., Delaš I., Radić B., Markov K. (1995): The influence of temperature on the growth of mould *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 and ochratoxin A biosynthesis in pure and mixed culture, *PBN Revija*, br. 33 (4), str. 139-143.

Duraković S. (1991): *Prehrambena mikrobiologija*, Medicinska naklada, Zagreb.

Duraković S., Duraković L. (2003): *Mikologija u biotehnologiji*, Kugler, Zagreb.

Frece J., Kos B., Beganović J., Vuković S., Šušćković J. (2005): In vivo testing of functional properties of three selected probiotic strains, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, br. 21, str. 1401-1408.

Frece J. (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Frece J., Kos B., Svetec I. K., Zgaga Z., Beganović J., Leboš A., Šušćković J. (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice, *Journal of Dairy Research*, br. 76, str. 98-104.

Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M. (2000): Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sour dough *Lactobacillus plantarum* strain 21B, *Applied and Environmental Microbiology*, br. 66, str. 4084-4090.

Lindgren S.E., Dobrogosz W.J. (1990): Antagonistic Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentations, *FEMS Microbiology Reviews*, br. 87, str. 149-163.

Magnusson J., Schnürer J. (2001): *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound, *Applied and Environmental Microbiology*, br. 67, str. 1-5.

Markov K. (2005): Utjecaj odabranih parametara na rast plijesni u mješovitim kulturama i biosintezi patulina i zealalenona, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Niku-Paavola M.L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A. (1999): New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*, *Journal of Applied Microbiology*, br. 86, str. 29-35.

Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer J., Kenne L. (2003): Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14, *Applied and Environmental Microbiology*, br. 69, str. 7554-7557.



Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. (2002): *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid, *Applied and Environmental Microbiology*, br. 68, str. 4322-4327.

Šušković J. (1996): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Yiannikouris A., Jouany J. P. (2002): Mycotoxines in feeds and their fate in animals: a review, *Animal Research*, br. 51, str. 81-99.

Autori / Authors

Domagoj Čvek, dipl.ing.
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Doc.dr.sc. Jadranka Frece
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Doc.dr.sc. Ksenija Markov
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Maja Friganović
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6

Prof.dr.sc. Frane Delaš
Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6