

ANTIFUNGÁLNÝ ÚČINOK LAKTOBACILOV NA PLESNE RODU *FUSARIUM* A *ASPERGILLUS*

JAROSLAV HUDÁČEK^a, ZSOLT ZALÁN^b,
JANA CHUMCHALOVÁ^a a ANNA HALÁSZ^b

^a Ústav technologie mléka a tuků, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, ^b Central Food Research Institute, Herman O. str. 15, 1022 Budapest, Hungary
jaroslav.hudacek@vscht.cz

Došlo 28.11.06, přijaté 5.4.07.

Klíčové slová: *Lactobacillus*, antifungální aktivita, aflatoxin B1, *Fusarium*, *Aspergillus*

Úvod

Mikroskopické vláknité huby plnia v prírode nezastupiteľnú úlohu destruentov pri rozklade rastlinných a živočíšnych zbytkov, lebo sú schopné produkovať celú radu enzýmov (napr. celulózy, chitinázy a amylázy). Človekom sú niektoré z nich využívané v potravinárskom priemysle napr. pri výrobe syrov, kyseliny citrónovej, vo farmaceutickom priemysle pri výrobe antibiotík i iných liečiv a v ďalších biotechnológiách. Naproti tomu mnohé mikroskopické huby môžu pôsobiť z hľadiska človeka nepriaznivo, a to hlavne: rozkladom potravín a krmív uskladnených za nevhodných podmienok, produkciou mykotoxínov do týchto produktov a niektoré saprotrofné mikromycéty môžu byť príležitostne i patogénne ako pre živočíchov, vrátane človeka, tak i pre rastliny. Niektoré plesne sú schopné produkovať viac než jeden mykotoxín, niektorý mykotoxín je naopak produkovaný viacerými druhmi. Medzi najznámejšie toxínogénne druhy patria *Aspergillus* (*Asp.*), *Penicillium*, *Fusarium* (*F.*), *Alternaria*, *Cladosporium* a *Stachybotrys*.

Druhy rodu *Fusarium* sa vyskytujú v pôdnom ekosystéme, môžeme ich definovať ako toxínogénne „poľné“ mikromycéty. Tieto druhy parazitujú prevažne na obilninách, ale i na iných potravinách ako jablká, paradajky, zemiaky¹. V skladoch vyvolávajú plesnivenie kukurice a kazenie jadrového ovocia. Ich rast a produkcia mykotoxínov závisí na vlhkosti, teplote, zložení substrátu, prítomnosti kyslíku, mykologickom profile mikromycét, sporulácii a na mikrobiálnych interakciách. Za významné mykotoxíny rodu *Fusarium* považujeme tri skupiny mykotoxínov. Prvú skupinu tvoria trichothecény, ako deoxynivalenol (DON) a T-2 toxín. Ďalšia skupina zahŕňa zearalenon (ZEN) a jeho deriváty. Do tretej kategórie radíme fumonisíny (FB₁)^{1,2}. Rod *Aspergillus* patrí k najrozšírenejším sa vy-

skytujúcim rodom plesní, jednotlivé druhy môžu byť izolované z pôdy, zo vzduchu, z potravín, z organických zbytkov a z mnoho ďalších zdrojov. Veľmi často býva izolovaný hlavne z burských orieškov a cereálií. Za významné mykotoxíny rodu *Aspergillus* považujeme asperthecin, flavacol, ochratoxíny a hlavne aflatoxíny. Aflatoxín produkujúce plesne môžu rásť za rôznych okolitých podmienok³ a na mnohých poľnohospodárskych a potravinárskych komoditách^{4,5}. Produkcia aflatoxínov silne závisí na teplote, vlhkosti, prístupe vzduchu, štruktúre a chemickom zložení substrátu. Plesne sú na rozdiel od baktérií všeobecne prispôsobivejšie na určité extrémne podmienky prostredia; lepšie znášajú nižšie hodnoty pH, nižší obsah využiteľnej vody (nižšie hodnoty a_w) a nižšie teploty. V posledných rokoch sa odborníci sústreďujú na vplyv rôznych nižších mikroorganizmov na rast plesní a s nimi spätou produkciu mykotoxínov.

Baktérie mliečneho kysnutia koexistujú s vláknitými hubami a kvasinkami v mnohých ekosystémoch, napr. v rôznych fermentovaných potravinách, kde môžu inhibovať rast plesní a tým je možné ich využiť ako bioochranu⁶. Z baktérií mliečneho kysnutia sa najviac štúdií, na potlačenie rastu plesní, zabyva kmeňmi rodu *Lactobacillus* a rodu *Lactococcus* (*Lc.*). Taktiež, najvýznamnejší vplyv na mykotoxíny vykazovali druhy rodu *Lactobacillus* a *Lactococcus*, konkrétne *Lbc. rhamnosus* GG a *Lbc. rhamnosus* LC-705. Nedávno boli objavené nové antimikrobiálne aktivity vo filtráte kultúry *Lbc. plantarum* aktívne i proti plesniam ako *F. avenaceum*. *F. graminearum* bol inhibovaný ako pôsobením *Lbc. plantarum*, tak aj *Lbc. alimentarius*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lbc. brevis* a *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*⁷. Baktérie mliečneho kysnutia tiež produkujú nízkomolekulárne zlúčeniny⁸, peptidy⁹ a proteíny¹⁰ s antifungálnymi vlastnosťami. V súčasnosti sa mnoho nevie o tom, ako tieto látky pôsobia na rast plesní. Niektoré baktérie produkujú prchajúce metabolity, ktoré môžu pôsobiť na rast a sporuláciu plesní¹¹.

V rámci práce sa sledovala antifungálna aktivita desiatich kmeňov rodu *Lactobacillus* proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus*. Antifungálna aktivita živých buniek a neutralizovaného a tepelne ošetrovaného supernatantu sa testovala difúznou agarovou metódou. V ďalšej časti práce sa sledoval inhibičný účinok laktobacilov na rast a produkciu aflatoxínu B1 (AFB1) kmeňov rodu *Aspergillus* počas spoločnej kultivácie v tekutom médiu.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene

Bakteriálne kmene *Lbc. plantarum* 01, *Lbc. paracasei* 05, *Lbc. casei* 154, *Lbc. paracasei* SF1, *Lbc. rhamnosus* VT1 použité v práci pochádzajú zo Zbierky baktérií, plesní a kvasiniek z Ústavu technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha, Česká republika. Bakteriálne kmene *Lbc. plantarum*

2142, *Lbc. casei* 2750, *Lbc. curvatus* 2768, *Lbc. curvatus* 2775, *Lbc. casei* Shirota použité v práci pochádzajú z Central Food Research Institute, Budapešť, Maďarsko.

Kmene plesní

Kmene plesní *F. proliferatum* M 5689, *Asp. flavus* DMF 0802, *Asp. parasiticus* DMF 0805 použité v práci pochádzajú zo Zbierky baktérií, plesní a kvasiniek z Ústavu technológie mlieka a tuků, VŠCHT Praha, Česká republika. A kmene plesní *F. culmorum* 301, *F. culmorum* 302, *F. graminearum* 608 pochádzajú z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, Oddělení šlechtitelských metod, Praha, Česká republika.

Kultivácia bakteriálnych kultúr

Kmene laktobacilov boli kultivované v MRS bujóne, ktorý bol zaočkovaný 1 obj.% inokula, kultivácia prebiehala anaeróbne pri 37 °C po dobu 18 h. Pre udržanie životaschopnosti boli mikroorganizmy pravidelne preočkovávané raz týždenne. Pri pokuse boli vždy používané čerstvo pripravené kultúry.

Príprava supernatantov

Testované kmene (inokulum 1 obj.%) boli kultivované v 10 ml MRS bujóne pri teplote 37 °C po dobu 18 h za anaeróbných podmienok. Po kultivácii boli bunky odstredené za podmienok 1710 g/ 20 min/4 °C. U získaných supernatantov bolo upravené pH na hodnotu 6,5 použitím 10 hm.% a 1 hm.% NaOH. Následne sa supernatanty prefiltrovali cez mikrofilter (0,22 µm, Millipore, Írsko). Supernatanty boli tepelne ošetrované pri 90 °C po dobu 10 min a uchovávané pri teplote –20 °C.

Kultivácia plesní

Všetky použité kmene plesní boli kultivované a uchovávané na šikmom PDA agare. Kultivácia prebiehala pri izbovej teplote po dobu 5 až 10 dní, do dosiahnutia optimálneho mycélia a tvorby spór. Kmene boli preočkovávané raz za mesiac. Pri pokuse boli vždy použité čerstvo pripravené kultúry.

Príprava inokula o presnom počte spór

Čerstvo pripravená kultúra kmeňov plesní na PDA agare bola vytrepáním prevedená do 5–6 ml fyziologického roztoku s Tweenom 80 (cit.¹²) do sterilnej skúmavky. Počet spór suspenzie bol spočítaný pomocou Bürkerovej komôrky. Koncentrácia spór bola upravená na $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^7$ spór na ml fyziologického roztoku.

Stanovenie antifungálnej aktivity metódou dvojitého agarového platní použitím živých buniek

Do 5 ml vysterilovaného MRS bujóne sa zaočkovalo 100 µl suspenzie skúmaného kmeňa baktérie čerstvo nakultivovaného v MRS bujóne ($1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^9$ KTJ ml⁻¹). Na Petriho miskú sa nalial modifikovaný MRS agar (hmotnostný podiel octanu sodného bol vynechaný)¹³. Po zatuhnutí sa doprostred zaočkovalo 5 µl nariedenej sus-

penzie skúmaného bakteriálneho kmeňa. Misky boli kultivované anaeróbne pri 37 °C po dobu 18 h. Po kultivácii sa miska preliala 10 ml soft PDA agaru obsahujúceho výslednú koncentráciu $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ spór. Misky boli kultivované aeróbne pri teplote 30 °C po dobu 72 h.

Stanovenie antifungálnej aktivity metódou dvojitého agarového platní použitím supernatantu

Na Petriho miskú sa nalial modifikovaný MRS agar (hmotnostný podiel octanu sodného bol vynechaný)¹³. Po zatuhnutí sa doprostred korkovrtom vytvoril otvor, do ktorého sa naočkovalo 450 µl neutralizovaného a tepelne ošetrovaného supernatantu. Po difúzií supernatantu do agaru sa miska preliala 10 ml soft PDA agaru obsahujúceho upravenú koncentráciu spór ($1 \cdot 10^5$ spór na ml fyziologického roztoku). Misky boli kultivované aeróbne pri teplote 30 °C po dobu 72 h. Výsledky sa získali z dvoch nezávislých sledovaní.

Príprava laktobacilov a plesní rodu *Aspergillus* pre spoločnú kultiváciu v tekutom médiu

Príprava laktobacilov

Kmene laktobacilov boli kultivované v MRS bujóne, ktorý bol zaočkovaný 1 obj.% inokula, kultivácia prebiehala anaeróbne pri 30 °C po dobu 24 h. Po kultivácii sa kmene zriedili sterilnou destilovanou vodou na výslednú koncentráciu 10^6 KTJ ml⁻¹. Pre experiment sa použilo 500 µl takto pripravenej suspenzie laktobacilov.

Príprava plesní

Plesne *Asp. flavus* DMF 0802 a *Asp. parasiticus* DMF 0805 boli kultivované na šikmom PDA agare. Kultivácia prebiehala pri izbovej teplote po dobu 7 dní, do dosiahnutia optimálneho mycélia a tvorby spór. Čerstvo pripravená kultúra kmeňov plesní na PDA agare bola vytrepáním prevedená do 10 ml fyziologického roztoku s 0,1 obj.% Tween 80. Získaná suspenzia spór sa prefiltrovala cez sterilnú bavlnu a filtrát sa zriedil 100 násobne sterilným fyziologickým roztokom. Pre experiment sa použilo 500 µl takto pripravenej suspenzie plesní.

Spoločná inkubácia laktobacilov a plesní

Do 5 ml sterilného média, obsahujúceho glukózu, tryptofán, kvasničný extrakt, mäsový extrakt, NaCl, Na₂HPO₄ o pH 6,8; sa naočkovalo 500 µl laktobacilovej suspenzie a 500 µl suspenzie spór plesne. Taktiež sa naočkovalo do média 500 µl suspenzie spór plesne samotnej, ako kontrola. Spoločná kultivácia prebiehala pri 30 °C počas 0, 5, 8, 14, 20 dní.

Príprava vzoriek pre stanovenie hmotnosti mycélia

Po spoločnej kultivácii sa médium v príslušných dňoch sledovania prefiltrovalo cez sklenenú fritu S4. Zachytený tuhý podiel, mycélium, sa nechal dosušiť na filtračnom papieri v termostate pri 20 °C do ďalšieho dňa. Suché mycélium sa následne vážilo na analytických vá-

hach. Získané hodnoty hmotnosti mycélia sa prepočítali ako prírastok, resp. úbytok, hmotnosti mycélia vzhľadom ku kontrole v každom príslušnom dni sledovania.

Príprava vzoriek pre stanovenie koncentrácie aflatoxínu B1

Tekuté médium sa v príslušných dňoch sledovania, po odstránení mycélia (frita S4), prefiltrovalo cez 0,22 µm porézny mikrofilter (Millipore, Írsko) do sterilnej skúmavky. Vzorky sa zriedili vodou a naniesli sa na imunoafinitnú kolónu (IAC – AflaTest® WB from VICAM). Následne sa kolóna premyla 10 ml vody a použitím striekačky sa vzduchom vysušila. Zachytený toxín sa z imunoafinitnej kolóny vymyl 2 ml metanolu do sklenenej viálky. Koncentrácia aflatoxínu B1 v takto pripravenej vzorke sa stanovila pomocou HPLC s fluorescenčným detektorom^{14,15}.

Výsledky a diskusia

Stanovenie antifungálnej aktivity metódou dvojitéch agarových platní použitím živých buniek a supernatantu

V tejto práci sa sledovala antifungálna aktivita 10-tich kmeňov rodu *Lactobacillus* proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus*. Antifungálna aktivita sa stanovovala metódou dvojitéch agarových platní a to použitím živých bakteriálnych buniek alebo supernatantu po kultivácii laktobacilových kmeňov v MRS bujone. Najvyššia aktivita buniek bola zistená u kmeňov *Lbc. curvatus* 2775 a *Lbc. curvatus* 2768, ktoré inhibovali rast všetkých plesní (tab. I). V prípade aktivity supernatantu boli najúčinnější kmene *Lbc. paracasei* 05 a *Lbc. curvatus* 2768 (tab. I).

Antifungálna aktivita jednotlivých kmeňov rodu *Lactobacillus* sa prisudzuje tvorbe organických kyselín, peroxidu vodíka, tvorbe bakteriocínu a ďalších metabolitov. Zo získaných výsledkov (tab. I), ak bol inhibičný účinok len v prípade použitia živých buniek (+/-) usudzujeme, že antifungálny účinok bol spojený s tvorbou a následným pôsobením organických kyselín. Ak bola aktivita len v prípade použitia supernatantu (-/+) usudzujeme, že inhibičný účinok nenastáva vplyvom organických kyselín, keďže sa supernatant neutralizuje a tepelne ošetruje, ale pravdepodobne pôsobením naprodukovaných látok s antifungálnou aktivitou (nízko molekulárne a tepelne stabilné zlúčeniny, bakteriocíny), ktoré sú v dostatočnom množstve na začiatku rastu sledovanej plesne, a tým pádom dochádza k inhibičnému účinku. Inhibičný efekt sa na miskách prejavoval tvorbou inhibičnej zóny okolo kolónie živých buniek alebo okolo korkovrtu s difundovaným supernatantom, a to úplným potlačením rastu plesne alebo degradáciou mycélia a zamedzením sporulácie.

Medzi obligátne heterofermentatívne kmene laktobacilov, ktoré produkujú antifungálne látky, patrí *Lbc. sanfrancisco* CB1, ktorý bol izolovaný z kvásku. Tento kmeň produkoval široké spektrum organických kyselín s antifungálnou aktivitou. Medzi ne patrí kyselina octová a kapronová, ktoré inhibujú rast plesne *F. graminearum*¹⁶. Z *Lbc. plantarum* MiLAB 393 bola okrem cyklických dipeptidov vyizolovaná kyselina 3-fenylmléčná s pomerom L(+) a D(-) 9:1. Toto spektrum látok pôsobilo inhibične proti *F. sporotrichioides* a *Asp. fumigatus*¹⁷. Nové typy zlúčenín produkoval kmeň *Lbc. plantarum*. Konkrétne sa jednalo o kyselinu benzoovú a 5-metyl-2,4-imidazolidinedion. Tieto látky boli aktívne samostatne, ale hlavne s 1% prídavkom kyseliny mliečnej, kedy účinok vzrástol. Ich inhibičná aktivita bola hlavne proti *F. avenaceum*⁸.

Tabuľka I

Inhibičný účinok laktobacilov, použitím živých buniek a supernatantu, proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus* kultivovaných 72 h pri 30 °C

Kmeň	<i>F. culmorum</i> 301	<i>F. culmorum</i> 302	<i>F. proliferatum</i> M 5689	<i>F. graminearum</i> 608	<i>Asp. flavus</i> DMF 0802	<i>Asp. parasiticus</i> DMF 0805
01	+ / +	+ / -	- / -	+ / +	+ / +	- / -
05	+ / +	+ / +	- / +	- / +	+ / +	- / +
154	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +	- / +
SF1	- / +	+ / +	- / -	+ / +	+ / +	- / +
VT1	+ / +	+ / +	+ / -	- / +	+ / +	- / -
2142	+ / +	+ / +	+ / +	- / +	+ / +	- / -
2750	+ / +	+ / -	- / -	+ / +	+ / +	- / +
2768	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
2775	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -
Shirota	+ / +	+ / +	+ / -	- / +	+ / +	- / +

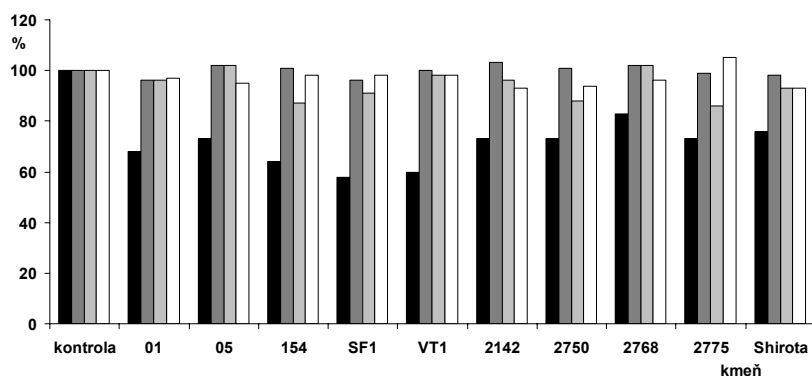
aktivita živých buniek / aktivita supernatantu, + ... inhibícia, - ... žiadna inhibícia

Existujú tiež laktobacily, ktoré produkujú organické kyseliny na báze mastných kyselín. Okrem mastných kyselín sú tiež niektorými kmeňmi produkované i estery mastných kyselín. Konkrétne z *Lbc. rhamnosus* VT1 sa izolovali metylestery a 2-metyl-5-hydroxyhexanová kyselina¹⁸. Nesmieme však zabudnúť zohľadniť vplyv okolitých podmienok, ako je doba a teplota inkubácie, pH a kmeň. Preukázalo sa, že inhibícia plesní nie je spôsobená iba produkciou organických kyselín, ale i okolitými podmienkami¹⁹. Lavermicocca a spol.⁷ referovali produkciu antifungálnych zlúčenín fenylmliečnej kyseliny a 4-hydroxyfenylmliečnej kyseliny z kmeňa *Lbc. plantarum* izolovaného z kysnutého cesta. Nedávno bolo objavené, že *Lbc. coryniformis* S13 môže produkovať antifungálne látky na základe bielkovín¹⁰. Taktiež boli identifikované antifungálne cyklické dipeptidy z *Lbc. plantarum* izolovaného zo siláže¹⁷.

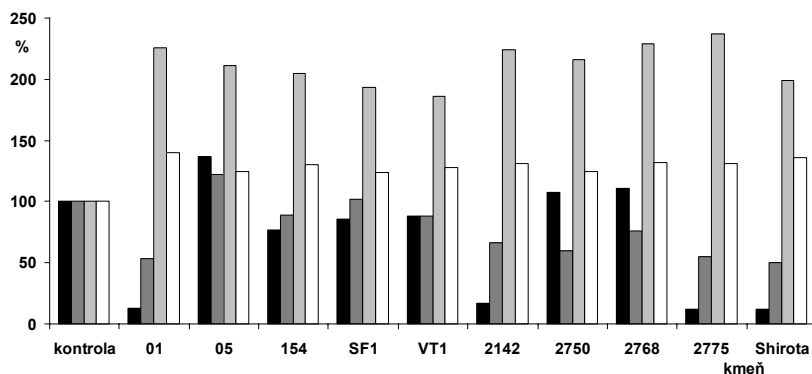
Sledovanie inhibície laktobacilov na rast plesní a produkciu aflatoxínu B1 počas spoločnej kultivácie v tekutom médiu

V ďalšej časti práce sme sledovali vplyv laktobacilov na rast plesní a tvorbu aflatoxínu B1 v tekutom médiu pri spoločnej kultivácii po dobu 20 dní pri 30 °C. Boli použité dva kmene plesní, *Asp. flavus* DMF 0802 a *Asp. parasiticus* DMF 0805. Rast plesní bol sledovaný metódou váženia mycélia. Výsledky sú znázornené graficky (obr. 1, 2).

Sledovaním rastu *Asp. flavus* DMF 0802 počas spoločnej kultivácie s laktobacilmi v priebehu 20 dní sa najvýraznejšia zmena hmotnosti mycélia vzhľadom ku kontrole zaznamenala v počiatočnej fáze rastu plesne, a to v 5. dni sledovania. V prítomnosti všetkých bakteriálnych kmeňov



Obr. 1. Hmotnosť mycélia *Asp. flavus* DMF 0802 v priebehu spoločnej kultivácie s laktobacilmi pri 30 °C v percentuálnom vyjadrení vzhľadom ku kontrole; ■ 5. deň, ■ 8. deň, ■ 14. deň, □ 20. deň



Obr. 2. Hmotnosť mycélia *Asp. parasiticus* DMF 0805 v priebehu spoločnej kultivácie s laktobacilmi pri 30 °C v percentuálnom vyjadrení vzhľadom ku kontrole; ■ 5. deň, ■ 8. deň, ■ 14. deň, □ 20. deň

Tabuľka II

Sledovanie rastu a produkcie aflatoxínu B1 kmeňa *Asp. flavus* DMF 0802 počas spoločnej kultivácie s laktobacilmi v tekutom médiu v priebehu 20 dní pri 30 °C

Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]	Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]
Kontrola	5	45,8 ± 0,6	nd	Kontrola	5	45,8 ± 0,6	nd
	8	48,5 ± 0,6	nd		8	48,5 ± 0,6	nd
	14	29,5 ± 0,4	nd		14	29,5 ± 0,4	nd
<i>Asp. flavus</i>	20	24,8 ± 0,3	nd	<i>Asp. flavus</i>	20	24,8 ± 0,3	nd
	5	31,2 ± 0,4	nd		5	33,3 ± 0,4	nd
<i>Asp. flavus</i>	8	46,7 ± 0,6	nd	<i>Asp. flavus</i>	8	49,8 ± 0,6	nd
	14	28,2 ± 0,3	nd		14	28,2 ± 0,3	nd
<i>Lbc. plantarum</i> O1	20	24,0 ± 0,3	nd	<i>Lbc. plantarum</i> 2142	20	23,1 ± 0,3	nd
	5	33,6 ± 0,4	nd		5	33,5 ± 0,4	nd
<i>Asp. flavus</i>	8	49,4 ± 0,6	nd	<i>Asp. flavus</i>	8	49,1 ± 0,6	nd
	14	30,2 ± 0,4	nd		14	26,1 ± 0,3	nd
<i>Lbc. paracasei</i> O5	20	23,6 ± 0,3	nd	<i>Lbc. casei</i> 2750	20	23,3 ± 0,3	nd
	5	29,3 ± 0,4	nd		5	37,8 ± 0,5	nd
<i>Asp. flavus</i>	8	48,9 ± 0,6	nd	<i>Asp. flavus</i>	8	49,3 ± 0,6	nd
	14	25,6 ± 0,3	nd		14	30,1 ± 0,4	nd
<i>Lbc. casei</i> 154	20	24,3 ± 0,3	nd	<i>Lbc. curvatus</i> 2768	20	23,9 ± 0,3	nd
	5	26,5 ± 0,3	nd		5	33,4 ± 0,4	nd
<i>Asp. flavus</i>	8	46,6 ± 0,6	nd	<i>Asp. flavus</i>	8	48,1 ± 0,6	nd
	14	26,7 ± 0,3	nd		14	25,3 ± 0,3	nd
<i>Lbc. paracasei</i> SF1	20	24,3 ± 0,3	nd	<i>Lbc. curvatus</i> 2775	20	26,0 ± 0,3	nd
	5	27,4 ± 0,3	nd		5	34,8 ± 0,4	nd
<i>Asp. flavus</i>	8	48,3 ± 0,6	nd	<i>Asp. flavus</i>	8	47,5 ± 0,6	nd
	14	28,8 ± 0,3	nd		14	27,4 ± 0,3	nd
<i>Lbc. rhamnosus</i> VT1	20	24,4 ± 0,3	nd	<i>Lbc. casei</i> Shiro-ta	20	23,0 ± 0,3	nd

AFB1 – aflatoxín B1, nd – pod detegovateľným limitom 5,0 ng ml⁻¹ AFB1

rodu *Lactobacillus* bol nárast plesne, oproti kontrole, výrazne menší (58–83 %).

Najvýraznejšia zmena sa zaznamenala v 14. dni kultivácie *Asp. parasiticus* DMF 0805, kde došlo k tomu, že v prítomnosti takmer všetkých kmeňov laktobacilov sa prudko zvýšil hmotnostný prírastok mycélia oproti kontrole (86–137 %).

Rast *Asp. parasiticus* sledovaný vážením suchého mycélia bol spočiatku veľmi rýchly v zmesnej kultúre, než keď plesň rástla samotná, ale nárast plesne na konci inkubácie bol porovnateľný v oboch kultivovaných kultúrach. Je to možné tým, že bakteriálne metabolity môžu stimulovať rast plesne v počiatočnej fáze inkubácie²⁰. *Asp. nidulans* bol spoločne kultivovaný s *Lbc. coryniformis* MiLAB 123, u ktorého bol preukázaný menší inhibičný efekt²¹. Spoločná kultivácia s *Lbc. coryniformis* MiLAB

123 nespôsobila zmenu morfológie mycélia v tej samej miere ako s *Lbc. plantarum* MiLAB 393 (cit.²²).

Z filtrátu získaného po kultivácii sa následne izoloval, pomocou imunoafinitnej kolóny, aflatoxín B1 a jeho koncentrácia sa stanovila metódou HPLC. Pri spoločnej kultivácii kmeňa *Asp. flavus* DMF 0802 s laktobacilmi nedochádzalo k tvorbe aflatoxínu na rozdiel od prípadu kultivácie *Asp. parasiticus* DMF 0805, kde sme stanovili príslušné koncentrácie aflatoxínu B1 v priebehu 20 dní sledovania (tab. II, III).

Zo zistených hodnôt koncentrácie AFB1 vzhľadom ku kontrole, kde nedochádzalo k produkcii AFB1 (tab. III), sa domnievame, že rast prítomných laktobacilov spôsobil tvorbu AFB1 vyvolaním stresových rastových podmienok využívaním nutričných zložiek média a produkciou určitých metabolitov. Avšak v ďalších dňoch sledovania sme

Tabuľka III

Sledovanie rastu a produkcie aflatoxínu B1 kmeňa *Asp. parasiticus* DMF 0805 počas spoločnej kultivácie s laktobacilmi v tekutom médiu v priebehu 20 dní pri 30 °C

Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]	Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]
Kontrola	5	33,7 ± 0,4	nd	Kontrola	5	33,7 ± 0,4	nd
	8	50,4 ± 0,6	nd		8	50,4 ± 0,6	nd
	14	27,5 ± 0,3	nd		14	27,5 ± 0,3	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	20	29,3 ± 0,4	nd	<i>Asp. parasiticus</i>	20	29,3 ± 0,4	nd
	5	4,4 ± 0,1	nd		5	5,6 ± 0,1	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	26,9 ± 0,3	166 ± 6,7	<i>Asp. parasiticus</i>	8	33,4 ± 0,4	170 ± 6,9
	14	62,1 ± 0,7	6 ± 0,2		14	61,5 ± 0,7	41 ± 1,7
<i>Lbc. plantarum</i> O1	20	40,9 ± 0,5	nd	<i>Lbc. plantarum</i> 2142	20	38,4 ± 0,5	18 ± 0,7
	5	46,1 ± 0,6	32 ± 1,3		5	36,4 ± 0,4	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	61,4 ± 0,7	169 ± 6,8	<i>Asp. parasiticus</i>	8	30,1 ± 0,4	84 ± 3,4
	14	57,9 ± 0,7	36 ± 1,5		14	59,3 ± 0,7	40 ± 1,6
<i>Lbc. paracasei</i> O5	20	36,7 ± 0,4	6 ± 0,2	<i>Lbc. casei</i> 2750	20	36,5 ± 0,4	167 ± 6,8
	5	25,9 ± 0,3	25 ± 1,0		5	37,4 ± 0,4	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	45,1 ± 0,5	103 ± 4,2	<i>Asp. parasiticus</i>	8	38,5 ± 0,5	16 ± 0,6
	14	56,4 ± 0,7	23 ± 0,9		14	63,1 ± 0,8	37 ± 1,5
<i>Lbc. casei</i> 154	20	38,2 ± 0,5	11 ± 0,4	<i>Lbc. curvatus</i> 2768	20	38,7 ± 0,5	18 ± 0,7
	5	29,1 ± 0,3	31 ± 1,3		5	3,9 ± 0,05	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	51,4 ± 0,6	23 ± 0,9	<i>Asp. parasiticus</i>	8	27,5 ± 0,3	196 ± 7,9
	14	53,2 ± 0,6	18 ± 0,7		14	65,3 ± 0,8	48 ± 1,9
<i>Lbc. paracasei</i> SF1	20	36,4 ± 0,4	7 ± 0,3	<i>Lbc. curvatus</i> 2775	20	38,3 ± 0,5	33 ± 1,3
	5	29,8 ± 0,4	10 ± 0,4		5	4,1 ± 0,05	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	44,3 ± 0,5	nd	<i>Asp. parasiticus</i>	8	25,1 ± 0,3	122 ± 4,9
	14	51,1 ± 0,6	33 ± 1,3		14	54,8 ± 0,7	15 ± 0,6
<i>Lbc. rhamnosus</i> VT1	20	37,4 ± 0,4	14 ± 0,6	<i>Lbc. casei</i> Shirota	20	39,9 ± 0,5	24 ± 1,0

AFB1 – aflatoxín B1, nd – pod detegovateľným limitom 5,0 ng ml⁻¹ AFB1

detegovali nižšie koncentrácie AFB1. Tento pokles koncentrácie AFB1 by mohol byť spôsobený práve prítomnosťou laktobacilov, kedy mohlo dochádzať k degradácii AFB1 na netoxické látky, poprípade naviazanie AFB1 na bunkovú stenu baktérií, alebo absorpcia AFB1 bakteriálnymi bunkami. V prípade spoločnej kultivácie *Asp. parasiticus* DMF 0805 s kmeňom *Lbc. casei* 2750 sme zaznamenali v 20. dni sledovania zvýšenie koncentrácie AFB1, čo mohlo byť spôsobené následnou autolýzou bakteriálnych buniek a uvoľnením AFB1, v nezmenenej forme, do tekutého média (tab. III).

Existujú dve teórie, ako dochádza k odstráneniu mykotoxínov z vodného média v prítomnosti baktérií mliečného kysnutia (BMK). Prvou je vplyv štruktúr v bunkovej stene, kedy dôjde k naviazaniu mykotoxínu na bunkovú stenu a tým dôjde k jeho inaktivácii. Druhý prístup pred-

pokladá, že k odstráneniu dôjde produkciou niektorých antimikrobiálnych metabolitov BMK. Haskard a spol.²³ vo svojej práci uvádza, že väzba je fyzikálnej povahy, nekovalentná a k väzbe dochádza s hydrofobnými miestami v bakteriálnej bunkovej stene. V poslednej dobe sa pozornosť sústreďuje na 3 hlavné body: a) väzba lactobacillus–mykotoxín; b) stabilita vzniknutého komplexu; c) vplyv inkubačného času na väzbu toxínu²⁴. Plesne *Asp. flavus* a *Asp. parasiticus* produkujú zmes mykotoxínov, hlavne aflatoxíny B1, B2, G1 a G2. Aflatoxín B1 je najznámejší mykotoxín z obavy pred jeho vysokou toxicitou a karcinogenicitou. Aflatoxín B1 sa vyskytuje prevažne na podzemnici olejnej, kukurici a na ďalších obilninách, ako sú ryža, pšenica, cirok a proso. Ak sú kravy kŕmené krmivom obsahujúce aflatoxín B1, toxický metabolit aflatoxín M1 sa vyskytuje v ich mlieku a následne v ďalších mliečnych

produktach²⁵. Produkcia aflatoxínu plesňou *Asp. parasiticus* bola značne menšia, hlavne po 3. dni inkubácie, keď *Lbc. casei* bol prítomný na rozdiel od samotného rastu plesne bez prítomnosti *Lbc. casei*²⁰. Viac ako 2 hm.% kyseliny mliečnej prítomnej v médiu nepodporoval len rast *Asp. parasiticus*, ale určitá koncentrácia stimulovala biosyntézu aflatoxínu²⁶. Redukcia aflatoxínu bola dosiahnutá v kontaminovaných arašidových orieškoch za kyslých podmienok po 60 min vo vriacom vodnom kúpeli s 10% roztokom peroxidu vodíka²⁷. Kinetika redukcie AFB1 na AFB2 a AFG1 na AFG2 kyselinou mliečnou bola skúmaná v zriedenom kyslom vodnom roztoku (pH 3,35–4,50) pri 37 °C. Rýchlosť reakcie prebiehala podľa prvého poriadku s ohľadom na koncentrácie kyseliny mliečnej a aflatoxínov, a nezávisle na koncentrácii vodíkových iónov²⁸. Efekt mliečnanu sodného na produkciu aflatoxínu je funkciou počiatočného pH. Nedisociované organické karboxylové kyseliny, než ich ionizovaná forma, majú sklon byť transportované cez bunkové membrány a spomaliť alebo zvýšiť metabolizmus bunky. Preto pH blízke neutrálnemu je nepriaznivé pre kyselinu mliečnu transportujúcu sa cez membránu, a to môže byť dôvod, prečo tieto zložky stimulujú produkciu aflatoxínu, keď médium malo počiatočnú hodnotu pH 4,2 (cit.²⁹).

Záver

Cieľom celého projektu je príprava doplnkových zmesných laktobacilových kultúr pri výrobe výrobkov obsahujúcich mliečnu a cereálnu zložku. Snaha je vyrobiť výrobok obsahujúci protektívnu kultúru, ktorá by inhibovala účinok možných vyskytujúcich sa plesní, najväčšie uplatnenie tejto technológie by mohlo byť pri výrobe dojčenskej a detskej výživy s cereálnou zložkou. V tejto práci sme sa zamerali na antifungálnu aktivitu príslušných laktobacilov proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus*, a to použitím živých buniek a supernatantu. V súvislosti s produkciou mykotoxínov sme sledovali vplyv prítomnosti laktobacilov, počas spoločnej kultivácie s *Asp. parasiticus* 0805 v tekutom médiu, na koncentráciu aflatoxínu B1 v priebehu 20 dní spoločnej kultivácie. Z uskutočnených pokusov boli získané pozitívne výsledky, ktoré sa dajú v budúcnosti zohľadniť pri príprave doplnkových zmesných laktobacilových kultúr. Taktiež vlastnosti laktobacilov by sa dali v budúcnosti použiť v technológii výroby cereálnych výrobkov, kde by sa dali použiť ako ochrana proti výskytu plesní a produkcii mykotoxínov. Samozrejme pri výbere vhodných kmeňov baktérií mliečneho kysnutia ako bioochrany je potrebná určitá opatrnosť, lebo sú známe i výsledky pokusov dokazujúcich stimuláciu rastu plesní i produkciu toxínov.

Táto práca vznikla s podporou výskumného zámeru CEZ: MSM 6046137305 a projektu CZ – HU 5/2004. Autor ďalej ďakuje Mgr. Světlane Sýkorovej CSc. za poskytnutie kmeňov plesní rodu *Fusarium*.

LITERATÚRA

- Pitt J. I., Hocking A. D.: *Fungi and Food Spoilage*. London 1997.
- Frisvad J. C., Thrane U.: *Mycotoxin Production by Common Filamentous Fungi*. Utrecht 2002.
- Holmquist G. U., Walker H. W., Stahr H. M.: *J. Food Sci.* 43, 778 (1983).
- Bullerman L. B.: *Food Technol.* 40, 714 (1986).
- Hesseltine C. W., Shotwell O. L., Ellis J. J., Stubblefield R. D.: *Bacteriol. Rev.* 30, 795 (1966).
- Schnürer J., Magnusson J.: *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70 (2005).
- Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4084 (2000).
- Niku-Paavola M. L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A.: *J. Appl. Microbiol.* 86, 29 (1999).
- Okkers D. J., Dicks L. M. T., Silvester M., Joubert J. J., Odendaal H. J.: *J. Appl. Microbiol.* 87, 726 (1999).
- Magnusson J., Schnürer J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1 (2001).
- Wiseman D. W., Marth E. H.: *Mycopathologia* 73, 49 (1981).
- Suzuki I., Nomura M., Morichi T.: *Milchwissenschaft* 46, 635 (1991).
- Stiles J., Penkar S., Plocková M., Chumchalová J., Bullerman L. B.: *J. Food Prot.* 65, 1188 (2002).
- Stroka J., Anklam E.: *EUR 19027 EN*, (1999).
- Sobolev V. S., Dörner J. W.: *Food Chem. Contam.* 85, 641 (2002).
- Corsetti A., Gobetti M., Rossi J., Daminiani P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 253 (1998).
- Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4322 (2002).
- Petráková H.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2002.
- Gourama H., Bullerman L. B.: *Int. J. Food Microbiol.* 34, 131 (1997).
- El-Gendy S. M., Marth E. H.: *J. Food Prot.* 44, 211 (1980).
- Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J.: *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129 (2003).
- Ström K., Schnürer J., Melin P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 119 (2005).
- Haskard C., Binnion CH., Ahokas J.: *Chem.-Biol. Interact.* 128, 39 (2000).
- Peltonen K., El-Nezami H. S., Haskard C. A., Ahokas J., Salminen S.: *J. Dairy Sci.* 10, 2152 (2001).
- Van Egmond H. P. (ed.): *Mycotoxins in Dairy Products*. Bilthoven, Netherlands 1989.
- El-Gazzar F. E., Rusul G., Marth E. H.: *J. Food Prot.* 50, 940 (1987).
- Conzane R. S., Stenzel W. R., Kroh L. W.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch* 98, 321 (2002).
- Shukla R. S., Verma R. J., Mehta D. N.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 2737 (2002).
- Luchese R. H., Harrigan W. F.: *J. Appl. Bacteriol.* 69, 512 (1990).

J. Hudáček^a, Z. Zalán^b, J. Chumchalová^a, and A. Halász^b (^a*Department of milk and fat technology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Central Food Research Institute, Budapest, Hungary*): **Antifungal Effect of Lactobacilli on *Fusarium* and *Aspergillus* Molds**

The aim of this project is selection of Lactobacilli cultures for production of fermented products which include both milk and cereal components. Antifungal activity of ten Lactobacilli strains from two culture collections against *Fusarium spp.* and *Aspergillus spp.* was tested by the agar diffusion method. In the following step the inhibitory effect of Lactobacilli on growth and mycotoxin production of *Asp. flavus* DMF 0802 and *Asp. parasiticus* DMF 0805 was determined by common cultivation in liquid media using the method of mycelium weight and aflatoxin B1 detection by HPLC. The highest activity of Lac-

tobacilli cells against molds was detected for strains *Lbc. curvatus* 2775 and *Lbc. curvatus* 2768. The supernatants of strains *Lbc. paracasei* 05 and *Lbc. curvatus* 2768 were the most active. The most significant weight change of the mycelia of *Asp. flavus* DMF 0802 compared with control was observed in the initial growth period of the mould on day 5 (58–83 %). An important change was detected on day 14 in cultivation of *Asp. parasiticus* DMF 0805, when the mycelium weight increased rapidly in the presence of almost all Lactobacilli strains compared with control (86–137 %). The production of aflatoxin B1 by *Asp. flavus* DMF 0802 strain was inhibited. The production of aflatoxin B1 by *Asp. parasiticus* DMF 0805 strain was detected on day 5 of joint cultivation with Lactobacilli, and the maximum concentration was detected on day 8 (20–200 ng ml⁻¹). In the next days of cultivation, the concentration of aflatoxin B1 decreased.