

Инхибираща активност на щамове *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus brevis* спрямо сапрофитни микроорганизми

Росица Денкова, Светла Илиева, Запряна Денкова, Величка Янакиева

Inhibitory activity of strains of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus brevis* against saprophytic microorganisms. The inhibitory activity of strains of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus brevis* against saprophytic microorganisms that cause roping and mold spoilage of bread – bacteria: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*; molds: *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*; yeasts: *Saccharomyces cerevisiae* is examined. It is shown that the strain *Lactobacillus fermentum* Z14 exhibits the highest inhibitory activity against molds and *Lactobacillus brevis* LBRZ8 inhibits the growth of spore-forming bacteria, both strains do not affect the growth of yeasts. It has been shown that the inhibitory activity is a result of the competition for substrates and the formed acids and other substances with antimicrobial activity. All strains of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus brevis* are resistant to the most frequently used preservatives in bread production - potassium sorbate and calcium propionate.

Key words: *Lactobacillus*, Saprophyte, Mold Spoilage, Bread, Roping, Functional Food.

ВЪВЕДЕНИЕ

Хлябът е един от основните продукти в храненето на съвременния българин. Той се счита за бързо разваляща се храна, като най-често се наблюдава микробна развала. Растежът на плесените гъби води до огромни икономически загуби и до намаляване на безопасността на хляба поради продуцирането на микотоксини. Гъбната развала на пшеничния хляб се дължи основно на плесените гъби от род *Penicillium* (около 90%) [3]. Други плесени, които често предизвикват развала на хляба принадлежат към родовете *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* или *Rhizopus* [3].

С влошаване на екологичната обстановка произвежданите брашна носят значими количества спори на *Bacillus*, които са устойчиви на топлинните въздействия и причиняват „картофена болест” на хляба.

В момента за предотвратяване на микробната развала на хляба се прилагат различни подходи, като опаковане в модифицирана газова среда, облъчване, пастеризиране на пакетирани хляб и/или добавяне на пропионова киселина и нейни соли (калциев пропионат) [9]. Доказано е, че пропионовата киселина инхибира плесените спори и спорите на *Bacillus*, но не и на дрождите, и затова е химично вещество, което се използва за да се постигне запазване на хляба [18]. Законодателството, което се прилага в рамките на Европейския парламент, и Директивата на Съвета № 95/2/ЕО изискват пропионовата киселина да се добавя в хляба в концентрация не повече от 3000 ppm [1]. Последните проучвания показват, че при тези условия пропионовата киселина е неефективна срещу обичайните микроорганизми, причиняващи развала на хляба [2]. Намаляването на консервиращите агенти до суб-инхибиращи нива може да стимулира растежа на плесените гъби, предизвикващи микробна развала [4] и/или продукцията на микотоксини [15].

Тенденциите в производството на хляб и хлебни продукти са те да бъдат минимално обработени и да не съдържат химични консерванти. Това на свой ред разкрива пътя за биологичното консервиране (чрез природни средства) на хляба [13].

Сред природните средства за запазване на хляба е използването на щамове млечнокисели бактерии, които се внасят под формата на кисело тесто [5], като осигурява бърза и надеждна стабилност на доминираща микрофлора в производствения цикъл. Като компоненти на закваските се прилагат селектирани щамове хомо- и хетероферментативни млечнокисели бактерии.

Освен слабите органични киселини, т.е. млечна и оцетна киселина [10, 11, 12], МКБ продуцират и широк диапазон от нискомолекулни вещества [6], пептиди [14] и белтъци [7, 8] с антигъбна активност.

Целта на настоящето изследване е определяне на инхибиращата активност на щамове лактобацили, изолирани от различни източници, спрямо бактерии и плесенни гъби, причиняващи развала на хляба, както и изследване на резистентността на лактобацилите към най-често използваните в хлебопроизводството консерванти – калциев пропионат и калиев сорбат.

ИЗЛОЖЕНИЕ

В серия от опити е изследвана антимикробната активност на 5 щамове от род *Lactobacillus*, изолирани от различни източници - *Lactobacillus fermentum* LBRH9, *Lactobacillus fermentum* LBRH10, *Lactobacillus fermentum* Z14, *Lactobacillus brevis* LBRZ7, *Lactobacillus brevis* LBRZ8 - по метода на дифузия в агар. За целта се използва културална течност, получена след 24 h култивиране на среда LAPTg10, за да се определи инхибиращия ефект на клетките на щамове лактобацили върху тест-микроорганизмите; безклетъчна супернатанта без корекция на рН (с кисело рН). Паралелно е отчетена активността след неутрализиране на супернатанта до рН 6,5, за да бъде елиминиран инхибиращия ефект на продуцираните от лактобацилите млечна и други органични киселини. Инкубирането се извършва за 24 до 48 h при 30°C и/или 37°C. Резултатите от четирикратно повторените опити са обобщени в Табл. 1 и Табл. 2.

Таблица 1.

Антимикробна активност на щамове, принадлежащи към вида *Lactobacillus fermentum* - *Lactobacillus fermentum* LBRH9, *Lactobacillus fermentum* LBRH10, *Lactobacillus fermentum* Z14 - спрямо сапрофитни микроорганизми. Посочените стойности са в mm. Диаметър на ямка - 7 mm. КТ – културална течност; БСН - безклетъчна супернатанта без корекция на рН и НБСН - неутрализирана безклетъчна супернатанта (рН=6,5)

d зона, [mm] <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 1,9x10 ⁵ cfu/cm ³		<i>Bacillus mesentericus</i> 4x10 ⁴ cfu/cm ³		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9,2x10 ³ cfu/cm ³		<i>Aspergillus niger</i> 1,2x10 ⁷ cfu/cm ³		<i>Rhizopus sp.</i> 1,8x10 ⁵ cfu/cm ³		<i>Penicillium sp.</i> 5,2x10 ⁵ cfu/cm ³	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	30°C		
LBRH10	КТ	10	12	-	10,5	-	-	11,5	10	12	-	-
	БСН	-	10	-	10	-	-	10	-	9,5	-	-
	НБСН	-	10	-	9,5	-	-	10,5	-	-	-	-
LBRH9	КТ	13	10,5	-	10	-	-	9	10	11	-	-
	БСН	-	10	-	10	-	-	9	9	11	-	-
	НБСН	-	10	-	10	-	-	9	9	11	-	-
Z14	КТ	10	9	9,5	10	-	+ единични колонии в зоната на просветляване	12	10	13,5	10	-
	БСН	9	-	9	9	-	-	10	9	12	9	-
	НБСН	8	-	9	-	-	-	10	-	9	8	-

Щамове *Lactobacillus fermentum* LBRH10 и *Lactobacillus fermentum* LBRH9 от човешки произход и *Lactobacillus fermentum* Z14, изолиран от естествено ферментирало кисело тесто, потискат растежа на плесенните гъби *Rhizopus sp.* и *Aspergillus niger*, както и бактериите *Bacillus subtilis* при 30°C и при 37°C. *Lactobacillus fermentum* Z14 проявява антимикробна активност и спрямо *Penicillium sp.*, както и спрямо *Bacillus mesentericus* при 30°C и при 37°C, докато *Lactobacillus fermentum* LBRH10 и *Lactobacillus fermentum* LBRH9 потискат *Bacillus mesentericus* само при температура 37°C. *Lactobacillus fermentum* Z14 проявява антимикробно действие

спрямо *Saccharomyces cerevisiae* при 37°C, като само при културалната течност са наблюдавани единични колонии в зоната на просветляване.

При изследването на антимикробната активност на всеки щам *Lactobacillus fermentum* спрямо всеки включен в експеримента сапрофит културалната течност има по-голяма антимикробна активност в сравнение със супернатантата, което означава, че лактобацилите потискат сапрофита, не само поради образуването на млечна и други органични киселини, в резултат на което се понижава рН, но е налице и конкуренция за хранителни вещества между тях. Щам *Lactobacillus fermentum* Z14 е с най-висока инхибираща активност срещу спрямо *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* и *Bacillus mesentericus*, следван от *Lactobacillus fermentum* LBRH10 и *Lactobacillus fermentum* LBRH9. По отношение на *Bacillus subtilis* с най-висока антимикробна активност е *Lactobacillus fermentum* LBRH10, следван от *Lactobacillus fermentum* LBRH9 и *Lactobacillus fermentum* Z14.

Наблюдаваните различия при щамовете от вида *Lactobacillus fermentum* потвърждават необходимостта от задължителна оценка на антимикробната активност на културите, предназначени за включване в състава на закваски за хлебопроизводството.

Таблица 2.

Антимикробна активност на щамовете, принадлежащи към *Lactobacillus brevis* - *Lactobacillus brevis* LBRZ7, *Lactobacillus brevis* LBRZ8 - спрямо сапрофитни микроорганизми. Посочените стойности са в mm. Диаметър на ямка - 7 mm. КТ – културална течност; БСН - безклетъчна супернатанта без корекция на рН и НБСН - неутрализирана безклетъчна супернатанта (рН=6,5)

[mm] <i>Lactobacillus brevis</i>	d зона,		<i>Bacillus subtilis</i> 1,9x10 ⁵ cfu/cm ³		<i>Bacillus mesentericus</i> 4x10 ⁵ cfu/cm ³		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9,2x10 ⁵ cfu/cm ³		<i>Aspergillus niger</i> 1,2x10 ⁵ cfu/cm ³		<i>Rhizopus</i> sp. 1,8x10 ⁵ cfu/cm ³	<i>Penicillium</i> sp. 5,2x10 ⁵ cfu/cm ³
	Температура на култивиране		30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	30°C
LBRZ7	КТ	11	-	13	9	-	-	10	13	14,5	8	
	БСН	10	-	9	-	-	-	10	10	12	8	
	НБСН	10	-	9	-	-	-	10	9	12	-	
LBRZ8	КТ	-	10	-	10,5	-	-	9	11	10	8	
	БСН	-	10	-	9	-	-	8	9	9	8	
	НБСН	-	9	-	9	-	-	-	-	-	-	

Щамове *Lactobacillus brevis* LBRZ7 и *Lactobacillus brevis* LBRZ8 притежават слаба антимикробна активност срещу *Penicillium* sp. за разлика от силното инхибиращо действие срещу *Aspergillus niger* и *Rhizopus* sp., като *Lactobacillus brevis* LBRZ7 е с по-висока активност. Щам *Lactobacillus brevis* LBRZ7 проявява антимикробна активност и срещу *Bacillus mesentericus* и *Bacillus subtilis* при 30°C, но не и при 37°C, докато щам *Lactobacillus brevis* LBRZ8 е активен срещу *Bacillus mesentericus* и *Bacillus subtilis* при 37°C, но не и при 30°C. Двата щама не потискат *Saccharomyces cerevisiae* нито при 30°C, нито при 37°C.

В серия от опити е определена чувствителността на петте щама лактобацили към най-често прилаганите в хлебопроизводството консерванти – калиев сорбат и калиев пропионат. Резултатите от това изследване са отразени на Табл. 3.

Таблица 3.

Влияние на различни концентрации на калиев сорбат и калциев пропионат върху жизнеспособността на *Lactobacillus fermentum* LBRH9, *Lactobacillus fermentum* LBRH10, *Lactobacillus fermentum* Z14, *Lactobacillus brevis* LBRZ7, *Lactobacillus brevis* LBRZ8.

Тест-МО рН=6	Т [°C] на култивиране	Калциев пропионат [24 h]				Калиев сорбат [24 h]			
		К (рН=6)	0,1%	0,2%	0,3%	К (рН=6)	0,1%	0,2%	0,3%
<i>Lactobacillus brevis</i> LBRZ7 2.2x10 ¹¹	30°C	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i> LBRZ8 5x10 ¹¹	30°C	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> LBRH9 1.2x10 ¹²	37°C	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> LBRH10 4.4x10 ¹⁰	37°C	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> Z14 5x10 ⁵	37°C	-	-	-	-	-	-	-	-

Опитните данни показват, че петте щама са нечувствителни към различните концентрации на калиев сорбат и калциев пропионат в средата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Щамовете от видовете *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus brevis* са с висока антимикробна активност спрямо сапрофитни микроорганизми. Сред представителите на *Lactobacillus fermentum* щам *Lactobacillus fermentum* Z14 е с най-висока инхибираща активност срещу спрямо *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* и *Bacillus mesentericus*, следван от *Lactobacillus fermentum* LBRH10 и *Lactobacillus fermentum* LBRH9. По отношение на *Bacillus subtilis* с най-висока антимикробна активност е *Lactobacillus fermentum* LBRH10, следван от *Lactobacillus fermentum* LBRH9 и *Lactobacillus fermentum* Z14. А щамовете от вида *Lactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis* LBRZ7 и *Lactobacillus brevis* LBRZ8) притежават антимикробна активност срещу *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* и *Rhizopus* sp., като *Lactobacillus brevis* LBRZ7 е с по-висока активност. *Lactobacillus brevis* LBRZ7 проявява антимикробна активност и срещу *Bacillus mesentericus* и *Bacillus subtilis* при 30°C, но не и при 37°C, докато *Lactobacillus brevis* LBRZ8 е активен срещу *Bacillus mesentericus* и *Bacillus subtilis* при 37°C, но не и при 30°C.

Прилаганите в хлебопроизводството консерванти (калиев сорбат и калциев пропионат) не потискат растежа на петте щама лактобацили, което наред с проявената инхибираща активност ги прави перспективни за влагане в състава на закваски за кисело тесто за хляб.

ЛИТЕРАТУРА

[1] European Union (1995). European Parliament and Council Directive No. 95/2/EC of 20February 1995 on food additives other than colours and sweeteners, p. 53. http://europa.eu.int/eur-lex/en/ consleg/pdf/1995/en_1995L0002_do_001.pdf.

[2] Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Applied and Environmental Microbiology 66, 4084–4090.

- [3] Legan J. D., Voysey P.A., (1991). Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 361–371.
- [4] Marin S., Sanchis V., Sanz D., Castel I., Ramos A.J., Canela R., Magan N. (1999). Control of growth and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* isolates in moist maize with propionate preservatives. *Food Additives and Contaminants* 16, 555–563.
- [5] Messens W., De Vuyst L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. *International Journal of Food Microbiology* 72, 31–43.
- [6] 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* 86, 29–35.
- [7] Okkers D. J., Dicks L. M. T., Silvester M., Joubert J. J., Odendaal H. J. (1999). Characterisation of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology* 87, 726–734.
- [8] Paramithiotis S., Chouliaras Y., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G. (2005). Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure, *Process Biochemistry* 40, 2813–2819.
- [9] Pateras I. M. C. (1998). Bread spoilage and staling. In: Cauvain, S.P., Young, L.S. (Eds.), *Technology of Breadmaking*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 240–261.
- [10] Ponte J. G., Tsen C. C. (1987). Bakery products, In: Beuchat, L. (Ed.), *Food and Beverage Mycology*, 2nd ed. AVI, New York, N.Y., pp. 233–268.
- [11] Rocken W. (1996). Applied aspects of sourdough fermentation. *Advances in Food Science* 18, 212–216.
- [12] Rocken W., Voysey P.A. (1995). Sourdough fermentation in bread making. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 38S–48S.
- [13] Ryan L. A. M., Dal Bello F., Arendt E.K. (2008). The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread, *International Journal of Food Microbiology* 125, 274–278.
- [14] Stiles M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- [15] Yousef A. E., Marth E. H. (1981). Growth and synthesis of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* in the presence of sorbic acid. *Journal of Food Protection* 44, 736–741.

За контакти:

Докторант Росица Стефанова Денкова, Катедра “Биотехнологии”, Софийски университет “Св. Климент Охридски”, тел.: 0899 085 525, e-mail: rositsa_denkova@mail.bg

Доц.д-р Светла Захариева Илиева, Катедра “Биотехнологии”, Софийски университет “Св. Климент Охридски”, e-mail: svetla.ilieva@mail.bg

Проф.д.т.н. Запряна Рангелова Денкова, Университет по хранителни технологии, Пловдив, e-mail: zdenkova@abv.bg

Гл. ас. д-р Величка Борисова Янакиева, Университет по хранителни технологии, Пловдив, e-mail: yanakieva_vili@abv.bg

Докладът е рецензиран.