

ELŻBIETA KLEWICKA, LIDIA LIPIŃSKA

AKTYWNOŚĆ PRZECIWGRZYBOWA BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ Z RODZAJU *LACTOBACILLUS*

Streszczenie

Jedną z metod ochrony żywności fermentowanej przed bytującymi w niej niepożądanymi mikroorganizmami jest zastosowanie bakterii mlekowych jako naturalnych biokonserwantów. Szczególnie korzystna jest obecność bakterii fermentacji mlekowej (LAB) w żywności. Oprócz spodziewanej aktywności antibakteryjnej i przeciwgrzybowej LAB cechują się korzystnym wpływem na organizm człowieka poprzez stymulowanie przewodu pokarmowego do zapobiegania zakażeniom pokarmowym i poprawę ogólnego stanu zdrowia. Spektrum aktywności przeciwgrzybowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, która jest głównym przedmiotem niniejszej publikacji, wynika z syntezy metabolitów o właściwościach przeciwgrzybowych: pierwotnych – kwas mlekowy i kwas octowy oraz wtórnych – inne kwasy organiczne, cykliczne dipeptydy, kwasy tłuszczowe i ich hydroksylowane pochodne, związki niskocząsteczkowe, bakteriocyny, nadtlenek wodoru. Zdolność do syntezy powyższych związków nie jest cechą wszystkich bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a jedynie cechą szczepową pojedynczych kultur. Z tego względu poszukuje się szczepów bakterii mlekowych o szerokim spektrum aktywności antagonistycznej wobec grzybów, a także sposobów rozszerzenia tej aktywności, np. przez dobór optymalnych warunków fermentacji czy modyfikację składu podłoża i tym samym zmianę metabolizmu bakterii.

Słowa kluczowe: aktywność przeciwgrzybowa, antagonizm, *Lactobacillus* sp., metabolity LAB

Wprowadzenie

Fermentacja mlekowa jest jedną z najstarszych metod ochrony żywności przed niepożądaną mikroflorą. Bakterie mlekowe z rodzaju *Lactobacillus* stosowane są podczas spontanicznego i/lub kontrolowanego procesu fermentacji. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* należą do typu *Firmicutes*, rzędu *Lactobacillales* i ze względu na wytwarzanie kwasu mlekowego w procesie fermentacji są zaliczane do bakterii mlekowych. Występują w glebie, na roślinach, należą do komensalnej mikroflory człowieka i zwie-

Dr hab. inż. E. Klewicka, mgr inż. L. Lipińska, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź. Kontakt: elzbieta.klewicka@p.lodz.pl

rząt oraz są składnikiem żywności fermentowanej, a ich obecność wywiera wpływ na cechy żywności, takie jak: konsystencja, zapach i smak [28]. Pod względem morfologicznym bakterie z rodzaju *Lactobacillus* to Gram dodatnie pałeczki o wymiarach $0,5 \div 1,2/1,0 \div 10,0 \mu\text{m}$. Występują w środowisku bogatym w składniki odżywcze o niewielkim stężeniu tlenu.

Dane literaturowe wskazują, że zakres hamowania wzrostu mikroorganizmów przez szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* obejmuje zarówno bakterie tego samego i innego gatunku, jak i grzyby, także gatunki patogenne i toksynotwórcze [2, 20]. Spektrum aktywności antagonistycznej bakterii mlekowych jest zróżnicowane i związane z obecnością takich metabolitów, jak kwas mlekowy i kwas octowy, nadtlenek wodoru, diacetyl czy bakteriocyny. Związki te powodują hamowanie wzrostu przede wszystkim mikroorganizmów spokrewnionych, głównie tego samego rodzaju oraz innych bakterii. W przypadku drożdży i pleśni aktywność antagonistyczna bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest ograniczona, jednak w ostatnich latach prowadzonych jest coraz więcej badań w tym zakresie. Do kluczowych metabolitów o aktywności przeciwgrzybowej, produkowanych przez bakterie mlekowe, zaliczane są m.in. związki o małej masie molekularnej, hydroksylowane kwasy tłuszczowe, kwas fenylomlekowy, cykliczne dipeptydy.

Aktywność antagonistyczna bakterii z rodzaju *Lactobacillus*

Mechanizm aktywności antagonistycznej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest ściśle związany z syntezą specyficznych produktów hamujących wzrost niepożądaną mikroflory, dlatego istotne jest poznanie zakresu właściwości przeciwgrzybowych poszczególnych szczepów bakterii mlekowych. Zakres ten przedstawiono w tab. 1. Na podstawie zestawienia można stwierdzić, że aktywność przeciwgrzybowa bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest cechą szczepową [21], wynikającą ze specyficznej interakcji między szczepem bakteryjnym a szczepem wskaźnikowym. Niektóre bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mają szerokie spektrum hamowania wzrostu grzybów. Szczególnie odporne na działanie związków produkowanych przez bakterie mlekowe są drożdże, w szczególności chorobotwórcze szczepy *Candida* sp. [17]. Niemniej niektóre szczepy bakterii mlekowych (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GR-1 i *L. fermentum* RC-14) hamują wzrost drożdży *Candida albicans* oraz ograniczają ich adherencję do nabłonka pochwy [17]. Zróżnicowanie aktywności przeciwgrzybowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zaobserwowali Fhoula i wsp. [18], którzy badali aktywność przeciwgrzybową 119 szczepów bakterii mlekowych, spośród których szczep *Lactobacillus plantarum* AB755639 wykazał silną inhibicję grzybów *Botrytis cinerea* oraz *Penicillium expansum*, natomiast słabo hamował wzrost *Verticillium dahliae* i nie wykazał aktywności przeciwgrzybowej w stosunku do pleśni *Aspergillus niger*.

Mechanizm aktywności antagonistycznej bakterii *Lactobacillus*

Mechanizm aktywności antagonistycznej bakterii *Lactobacillus* nie jest dokładnie poznany. Przypuszcza się, że polega on na zmianie warunków środowiska pod wpływem wytwarzania kwasów organicznych i innych metabolitów niekorzystnych dla wzrostu grzybów. Do takich czynników środowiskowych należą: temperatura, pH, skład podłoża, przy których bakterie mlekowe wytwarzają produkty o aktywności przeciwrzybowej i przeciwbakteryjnej.

Produkty metabolizmu bakterii *Lactobacillus* sp. o aktywności przeciwrzybowej

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wytwarzają podczas fermentacji mlekowej metabolity pierwotne oraz wtórne. Niektóre z nich wykazują właściwości przeciwbakteryjne i przeciwrzybowe, zwykle skierowane wobec specyficznej grupy mikroorganizmów. Przykładem jest *Lactobacillus casei* AST18 wytwarzający kwasy: mlekowy (93,70 g·l⁻¹), winowy (9,59 g·l⁻¹), cytrynowy (1,29 g·l⁻¹), octowy (2,42 g·l⁻¹) oraz związki potencjalnie przeciwrzybowe: cyklo-(Leu-Pro), 2,6-difenylopiperydyna oraz 5,10-dietoksy-2,3,7,8-tetrahydro-1*H*,6*H*-dipirolo[1,2-*a*;1',2'-*d*]pirazyna [32]. Powyższe metabolity, działając synergistycznie (razem), są zdolne do hamowania wzrostu pleśni *Penicillium* sp. Kolejnym przykładem szczepu o aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest *Lactobacillus curvatus* A61, który wytwarza bakteriocyny ograniczające wzrost grzybów *Cladosporium* sp. i *Fusarium* sp. oraz bakterii *Bacillus cereus* i *Listeria monocytogenes* [1].

Tabela 1. Spektrum aktywności przeciwrzybowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus*
Table 1. Spectrum of antagonistic activity of bacteria of the genus *Lactobacillus*

Gatunek bakterii Species of bacteria	Szczep hamowany / Inhibited strain
<i>L. casei</i>	<i>P. expansum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> [9], <i>F. oxysporum</i> [58], <i>C. albicans</i> [40], <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19], <i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16], <i>Penicillium</i> sp. [32, 33], <i>P. chrysogenum</i> [34], <i>F. latenicum</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>C. mycoderma</i> , <i>A. alternata</i> , <i>G. candidum</i> [29], <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>P. commune</i> , <i>R. oryzae</i> [25], <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. canis</i> [21]
<i>L. fermentum</i>	<i>P. expansum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> [9], <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19], <i>A. terreus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. corymbifera</i> , <i>P. lilacinus</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>S. brevicaulis</i> , <i>C. lunata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Penicillium</i> sp. [24]
<i>L. rhamnosus</i>	<i>P. expansum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> [9], <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19], <i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16], <i>D. hansenii</i> , <i>R. mucilaginosus</i> , <i>P. brevicompactum</i> [15], <i>C. albicans</i> [30, 40]

Gatunek bakterii Species of bacteria	Szczep hamowany / Inhibited strain
<i>L. reuteri</i>	<i>P. expansum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> [9], <i>C. albicans</i> [30], <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19], <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. canis</i> [21]
<i>L. sakei</i>	<i>P. expansum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> [9] <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>P. commune</i> , <i>R. oryzae</i> [25] <i>A. fumigatus</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>R. mucilaginosa</i> [36]
<i>L. acidophilus</i>	<i>P. expansum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> [9], <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19], <i>F. sporotrichioides</i> [36], <i>Penicillium</i> sp. [13], <i>C. albicans</i> [40], <i>F. latenicum</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>C. mycoderma</i> , <i>A. alternata</i> , <i>G. candidum</i> [26]
<i>L. harbinensis</i>	<i>P. expansum</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. Roquefortii</i> [6], <i>Y. lipolytica</i> [14] <i>R. mucilaginosa</i> , <i>P. brevicompactum</i> [15]
<i>L. brevis</i>	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>Geotrichum citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19], <i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. graminearum</i> [37] <i>A. fumigatus</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. canis</i> [21], <i>A. awamori</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>F. graminearum</i> [56]
<i>L. curvatus</i>	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19] <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>P. commune</i> , <i>R. oryzae</i> [25]
<i>L. bulgaricus</i>	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19]
<i>L. collinoides</i>	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19]
<i>L. paracasei</i>	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>A. candidus</i> [23]
<i>L. pentosus</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>P. commune</i> [25]
<i>L. arizonensis</i>	<i>M. gypseum</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>M. canis</i> [21]
<i>L. zaeae</i>	<i>R. mucilaginosa</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. expansum</i> [15]
<i>L. helveticus</i>	<i>C. albicans</i> [36]
<i>L. hammesii</i>	<i>A. niger</i> , <i>M. plumbeus</i> [7]
<i>L. lactis</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>P. commune</i> , <i>R. oryzae</i> [25], <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Penicillium</i> sp. [42]
<i>L. plantarum</i>	<i>P. expansum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. gloeosporioides</i> [9] <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>F. oxysporum</i> [51], <i>F. oxysporum</i> [58] <i>P. expansum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>R. mucilaginosa</i> [10, 11], <i>P. notatum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>R. glutinis</i> [46], <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19], <i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16], <i>G. boninense</i> , <i>C. albicans</i> [31], <i>Borytis</i> sp, <i>A. niger</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>P. roqueforti</i> [64], <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> [51], <i>P. digitatum</i> , <i>P. citrinum</i> [59], <i>A. flavus</i> [62] <i>A. fumigatus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>E. nigrum</i> , <i>C. gossypicola</i> , <i>P. roquefort</i> [61], <i>A. niger</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> [12], <i>A. nidulans</i> [61], <i>Penicillium</i> sp. [52] <i>A. clavatus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>B. elliptica</i> , <i>S. vaccinii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>S. fusca</i> [57] <i>P. expansum</i> , <i>B. cinerea</i> [20], <i>P. commune</i> , <i>P. solitum</i> , <i>A. versicolour</i> , <i>C. herbarum</i> [8], <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>P. commune</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> [36], <i>P. roqueforti</i> , <i>P. commune</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>P. anomala</i> [51], <i>F. sporotrichioides</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>K. marxianus</i> [54], <i>B. cinerea</i> , <i>G. cingulata</i> , <i>P. drechsleri</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>F. oxysporum</i> [60], <i>A. terreus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. corymbifera</i> , <i>P. lilacinus</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>S. brevicaulis</i> , <i>C. lunata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Penicillium</i> sp. [24]

Gatunek bakterii Species of bacteria	Szczep hamowany / Inhibited strain
<i>L. mali</i>	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19]
<i>L. paracasei</i>	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19]
<i>L. coryniformis</i>	<i>A. niger</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>G. citri-aurantii</i> , <i>P. digitatum</i> [19] <i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16], <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>P. commune</i> , <i>R. mucilaginosa</i> [36], <i>Cerinosterus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>A. flavus</i> , <i>E. fibuliger</i> [13]
<i>L. buchneri</i>	<i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16]
<i>L. perolens</i>	<i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16]
<i>L. delbrueckii</i>	<i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16]
<i>L. salivarius</i>	<i>P. expansum</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. anomala</i> [16], <i>A. nidulans</i> , <i>F. spo-</i> <i>rottrichioides</i> , <i>P. commune</i> , <i>R. mucilaginosa</i> [36]
<i>L. amylovorus</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. roqueforti</i> [4, 35, 47], <i>P.</i> <i>expansum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>A. niger</i> [6], <i>Cerinosterus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>E.</i> <i>fibuliger</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>R. oryzae</i> [13]

Kwasy organiczne

Wszystkie szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wytwarzają kwasy będące metabolitami pierwszorzędowymi (kwas mlekowy i octowy), natomiast niektóre z nich dodatkowo wytwarzają inne kwasy organiczne, oddziałujące specyficznie z obcą mikroflorą, takie jak: propionowy, heksanowy, salicylowy, bursztynowy, mrówkowy, 2-pirolidono-5-karboksyłowy, 3-fenylomlekowy, 4-hydroksyfenylomlekowy (metabolity wtórne, II-rzędowe) [5, 36, 38]. Wiadomo, że aktywność biologiczna kwasów organicznych jest związana z obniżeniem pH medium. Niezdysocjowana, bardziej hydrofobowa forma kwasu dyfunduje przez membranę komórkową i wewnątrz komórki ulega dysocjacji, uwalniając jony wodorowe, które zwiększają kwasowość cytoplazmy. Co więcej, niezdisocjowane kwasy zmniejszają elektrochemiczny gradient protonów w komórce, wywołując efekt bakteriostatyczny [49]. Kwasy octowy i propionowy są wytwarzane przez heterofermentatywne szczepy bakterii mlekowych w obecności zewnętrznych akceptorów elektronów. Kwas octowy wytwarzany jest zwykle w znacznie większej ilości niż propionowy, natomiast kwas propionowy oraz jego sole wykazują efekt przeciwrzybowy w środowisku o niskim pH, często w obecności kwasu mlekowego [49].

Produktem wytwarzanym przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, któremu przypisuje się wysoką aktywność przeciwrzybową, jest kwas 3-fenylomlekowy (PLA). PLA jest produkowany przez liczne szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, m.in. *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. sakei* [36, 39]. Hamowanie wzrostu grzybów związane z obecnością kwasów organicznych potwierdzili Cortés-Zavaleta i wsp. [9], którzy zidentyfikowali w supernatancie po fermentacji mlekowej kwasy: octowy,

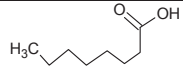
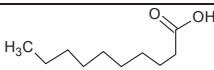
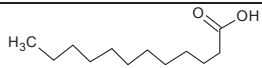
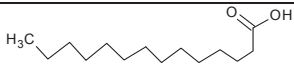
heksanowy i PLA. Minimalne stężenie hamujące (MIC) PLA wobec badanych grzybów wskaźnikowych wynosiło od $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (*Colletotrichum gleosporoides*) do $6,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (*Aspergillus flavus*) i wzrastało w szeregu: *C. gleosporoides* < *B. cinerea* < *P. expansum* < *A. flavus*. Przeciwwgrzybowe właściwości PLA potwierdzono także w badaniach antagonizmu *L. plantarum* IMAU10014 [60]. PLA wykazał inhibicję wobec grzybów: *P. drechsleri* Tucker, *G. cingulate*, *B. cinerea*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, przy czym najbardziej wrażliwe na jego obecność okazały się *F. oxysporum* oraz *P. drechsleri* Tucker, natomiast najmniej wrażliwy – *P. citrinum*. Podobne oddziaływanie wobec badanych grzybów wykazał kwas benzenoowy, drugi związek przeciwwgrzybowy wyizolowany z *L. plantarum* IMAU10014 [60]. Mu i wsp. [38] zaobserwowali, że bakterie *Lactobacillus* sp. SK007 oprócz PLA wytwarzają także kwas 4-hydroksyfenylomlekowy, wykazujący potencjalny efekt przeciwwgrzybowy wobec *A. niger* i *P. roqueforti*. Belguesmia i wsp. [5] badali aktywność przeciwwgrzybową kwasów organicznych wytwarzanych przez *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np. Wykazali oni, że ilość wytwarzanych kwasów organicznych była zależna od czasu trwania fermentacji, prowadzonej przez 3, 7 bądź 9 dni. Oszacowali, że wybrany szczep produkuje kwasy: octowy i heksanowy (po 7 i 9 dniach), mlekowy, L-(-)-fenylomlekowy, 2-pirolidyno-5-karboksyloxy i bursztynowy (po 3, 7 i 9 dniach). Aktywność antagonisticzna mieszanin wymienionych kwasów wskazała, że obecność kwasu heksanowego była czynnikiem determinującym aktywność antagonistyczną wszystkich badanych mieszanin kwasów wobec grzybów: *D. hansenii* UBOCC-A-211003, *P. expansum* CBS 325 45 NT oraz *P. roqueforti* UBOCC-A-112138 [5]. Podobne doświadczenie przeprowadzili Guo i wsp. [21], którzy zidentyfikowali metabolity wytwarzane przez *L. reuteri* i hamujące wzrost grzybów *M. canis*, *M. gypseum* i *E. floccosum*, wykorzystując metodę LC-FTMS (ang. *Liquid Chromatography Fourier Transform Mass Spectrometry*). Oprócz kwasu mlekowego wyizolowali bardziej złożone kwasy organiczne o aktywności przeciwwgrzybowej: (S)-(-)-2-hydroksyizokaprynowy, hydrocynamonowy, fenylomlekowy, azelainowy, 4-hydroksybezoesowy, p-kumarynowy, wanilinowy, DL-P-hydroksyfenylomlekowy oraz 3-hydroksydekanowy.

Kwasy tłuszczowe i ich pochodne

Kwasy tłuszczowe oraz hydroksylowane kwasy tłuszczowe, produkowane przez niektóre szczepy bakterii mlekowych, są związkami o silnej aktywności antagonistycznej wobec drożdży i pleśni [36]. Kwasom tłuszczowym przypisuje się mniejszą rolę w hamowaniu wzrostu grzybów niż hydroksylowanym kwasom tłuszczowym, co może mieć związek z potencjalnymi właściwościami cytotoksycznymi kwasów tłuszczowych wobec komórek nabłonka [3, 43, 53]. Kwasy: kaprylowy, kaprynowy, laurynowy, mirystynowy (tab. 2) hamują wzrost niektórych szczepów drożdży *Candida* sp. (gatunki: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis*).

lis) [53]. Minimalne stężenie hamujące badanych kwasów tłuszczowych znajduje się w zakresie od 0,3 g·l⁻¹ (kwas kaprynowy) do powyżej 2,5 g·l⁻¹ (kwas mirystynowy).

Tabela 2. Kwasy tłuszczowe o właściwościach przeciwgrzybowych
Table 2. Fatty acids having antifungal properties

Nazwa / Name	Wzór chemiczny Chemical formula	Struktura / Structure
Kwas kaprylowy / Caprylic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	
Kwas kaprynowy / Capric acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	
Kwas laurynowy / Lauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	
Kwas mirystynowy / Miristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	

Źródło: / Source: [53]

Pierwszym opisanym w literaturze przykładem przeciwgrzybowych właściwości hydroksylowanych kwasów tłuszczowych były produkty fermentacji mlekowej szczepu *L. plantarum* MiLAB 14 [51]. Zaobserwowano, że aktywność biologiczna kwasów tłuszczowych wzrasta wraz z długością łańcucha, jednak po osiągnięciu długości 10 - 11 węgli zostaje ograniczona ze względu na małą rozpuszczalność długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w wodzie. Najsilniejsze właściwości przeciwgrzybowe wykazują 3-hydroksylowane kwasy tłuszczowe, zawierające 12 atomów węgla w łańcuchu [51]. Minimalne stężenie hamujące (MIC) badanych 3-hydroksylowanych kwasów tłuszczowych: 3-(R)-hydroksydekanowego, 3-hydroksy-5-cis-dodecenowego, 3-(R)-hydroksydodekanowego i 3-(R)-hydroksytetradekanowego wyniosło od 0,01 g·l⁻¹ do powyżej 0,1 g·l⁻¹. Było ono porównywalne z MIC amfoterycyny B, antybiotyku przeciwgrzybowego wytwarzanego naturalnie przez bakterie *Streptomyces* sp. Zaobserwowano, że drożdże wykazują większą wrażliwość na obecność hydroksylowanych kwasów tłuszczowych niż pleśń [36, 51].

W badaniach szczepów *L. sanfranciscensis* oraz *L. hammesii* wykazano, że wytwarzają one izomery 18-węglowych kwasów tłuszczowych, zawierające od 0 do 3 grup hydroksylowych oraz od 0 do 3 wiązań podwójnych. Przeważającą część stanowiły monohydroksylowe kwasy tłuszczowe, z których największe znaczenie miał izomer o wzorze C₁₈H₃₃O₃ [7]. Minimalne stężenie hamujące dihydroksylowanych oraz trihydroksylowanych kwasów tłuszczowych wyniosło powyżej 20 g·l⁻¹, natomiast MIC najbardziej efektywnej frakcji monohydroksylowych kwasów tłuszczowych wyizolowanych z *L. hammesii* oraz kwasu (R)-13-hydroksy-cis-9,trans-11-oktadecadienowego

oszacowano jako $0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ – *A. niger* oraz $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ – *P. roqueforti*. MIC kwasu rycynolowego w stosunku do *A. niger* wyniosło $2,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, a kwasy: oleinowy, stearynowy oraz nasycone tłuszczowe nie wykazały aktywności przeciwgrzybowej [7].

Bakteriocyny

Bakteriocyny są peptydami syntetyzowanymi rybosomalnie, wykazującymi aktywność przeciwdrobnoustrojową [65]. Są związkami o właściwościach kationowych, zbudowanymi z 20 ÷ 50 aminokwasów i składającymi się z dwóch części: hydrofobowej oraz hydrofilowej [49]. Cechują się znaczną aktywnością przeciwbakteryjną oraz ograniczonymi właściwościami przeciwgrzybowymi względem wąskiej grupy drożdży i pleśni. Oprócz bakteriocyn wyizolowanych ze szczepu *Lactobacillus curvatus* A61, ograniczających wzrost *Cladosporium* sp. i *Fusarium* sp. [1], niewiele jest doniesień literaturowych na temat inhibicji wzrostu grzybów przez inne bakteriocyny wytwarzane przez bakterie *Lactobacillus* sp. Bakteriocyny wykazują najsilniejsze działanie antagonistyczne wobec gatunków spokrewnionych, czego przykładem jest plantarycyna ZJ008, związek wytwarzany przez *L. plantarum* ZJ008 i charakteryzujący się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną, także wobec drobnoustrojów patogennych. Mechanizm aktywności antagonistycznej bakteriocyn może być związany z zahamowaniem syntezy DNA, RNA i ATP, ograniczeniem syntezy białek, zaburzeniem potencjału membranowego, zakłóceniem równowagi jonowej czy gradientu pH [64]. Bakteriocyny są wykorzystywane jako naturalne konserwanty żywności, czego przykładem jest nizyna, policykliczny peptyd złożony z 34 aminokwasów i wytwarzany przez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nizyna ma status GRAS (ang. *generally recognized as safe*) i jest stosowana do produkcji serów dojrzewających, bitej śmietany, deserów czy sera Mascarpone oraz jako stabilizator aktywny wobec bakterii Gram-dodatnich.

Niskocząsteczkowe metabolity

Metabolity o masie cząsteczkowej mniejszej niż $10\cdot 10^3$ Da są postrzegane jako związki o silnych właściwościach przeciwgrzybowych [19, 22, 45]. Przykładem niskocząsteczkowych związków o działaniu przeciwgrzybowym jest pentocin TV35b, bakteriocynopodobny peptyd o masie cząsteczkowej $(2,35 \div 3,40)\cdot 10^3$ Da, produkowany przez *Lactobacillus pentosus* i powodujący inhibicję grzybów *Candida albicans* [41].

Innym związkiem niskocząsteczkowym o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest reuteryna (aldehyd 3-hydroksypropionowy), która hamuje wzrost niektórych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także drożdży i pleśni. Niektóre szczepy bakterii mlekowych *Lactococcus lactis* są zdolne do jej wytwarzania w obecności glicerolu [36].

Voulgari i wsp. [59] wyizolowali z jogurtów oraz serów niestarterowe heterofermentatywne szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, które wytwarzały niskocząstecz-

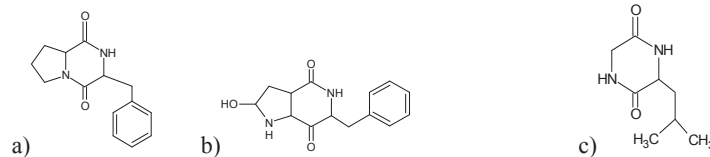
kowe substancje białkowe. Budowa tych związków nie została opisana w literaturze, jednak potwierdzono ich aktywność przeciwgrzybową wobec pleśni *Penicillium* sp. oraz drożdży *D. hansenii* i *S. cerevisiae*.

Inne produkty *Lactobacillus* o aktywności przeciwgrzybowej

Istotnym związkiem o aktywności przeciwgrzybowej jest nadtlenek wodoru, wytwarzany przez niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Wykazuje on silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, także przeciwgrzybowe, które zostały zaobserwowane wobec wybranych szczepów wskaźnikowych drożdży zasiedlających żeński układ rozrodczy: *C. albicans*, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis* [41]. Zaobserwowano, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, wyizolowane zarówno od zdrowych, jak i chorych pacjentek, wytwarzały najwięcej nadtlenu wodoru między 48. a 72. godziną hodowli. Po tym czasie niektóre szczepy rozpoczęły zwiększoną produkcję kwasu mlekowego. Szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, które mają enzym oksydazę flawoproteinową, są zdolne do wytwarzania nadtlenu wodoru w warunkach tlenowych [49].

Wysoką aktywność przeciwgrzybową, zwłaszcza w środowisku o pH poniżej 7,0, przypisuje się także diacetylowi (butanodiolowi). Ogunshe i wsp. [41] zbadali zdolność szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wyizolowanych z układu rozrodczego kobiet zdrowych oraz chorych na kandydozę, do produkcji diacetylu. Zaobserwowano, że cztery szczepy *Lactobacillus* sp. pochodzące od zdrowych pacjentek wykazały dużą zdolność wytwarzania diacetylu od 24. do nawet 120. godziny hodowli, natomiast w przypadku bakterii mlekowych wyizolowanych od kobiet zakażonych drożdżami *Candida* sp. zaobserwowano znaczne zróżnicowanie w zakresie produkcji tego związku.

Inną grupę metabolitów przeciwgrzybowych stanowią cykliczne dipeptydy (2,5-diketopiperazyny), związki niskocząsteczkowe produkowane przez szczepy bakterii mlekowych, takie jak *L. brevis* oraz *L. plantarum*. Ze względu na wysoką aktywność biologiczną cykliczne dipeptydy mają zastosowanie zarówno przemysłowe, jak i kliniczne [4, 31]. Wykazują one aktywność przeciwgrzybową przy stężeniach od 0,5 mg do kilku gramów w litrze medium [4, 36]. Przykładami związków o budowie cyklicznej wytwarzanymi przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, które hamują wzrost drożdży *Candida* sp. oraz *Cryptococcus neoformans* są: cyklo(Phe-Pro), cyklo(Gly-Leu), cyklo(Leu-Pro) oraz cyklo(Phe-4-OH-Pro) (rys. 1) [34, 40]. Silną aktywność przeciwdrożdżową przypisuje się także *cis*-cyklo(L-Val-L-Pro) i *cis*-cyklo(L-Phe-L-Pro), produkowanym przez szczep *L. plantarum* LBK-K10 [31].



Rys. 1. Cykliczne dipeptydy: a) cyklo(Phe-Pro), b) cyklo(Phe-OH-Pro), c) cyklo(Gly-Leu)

Fig. 1. Cyclic dipeptides: a) cyclo(Phe-Pro), b) cyclo(Phe-OH-Pro), c) cyclo(Gly-Leu)

Źródło: / Source: [36]

Projektowanie aktywności antagonisticznej bakterii mlekowych

Modulowanie metabolizmu bakterii *Lactobacillus* sp. jest mało poznany kierunkiem badań. Opublikowano dotąd niewiele prac na ten temat, jednak wskazuje się, że jest to obiecująca metoda syntezy metabolitów hamujących wzrost grzybów zanieczyszczających żywność. Rolę związków stymulujących aktywność przeciwwgrzybową bakterii z rodzaju *Lactobacillus* mogą pełnić poliole (polihydroksyalkohole) oraz ich galaktozydowe pochodne [26, 27, 29]. Dodanie do podłoża polioli takich, jak: glicerol, laktitol, erytritrol, sorbitol i mannitol powoduje zwiększenie stref zahamowania wzrostu grzybów wskaźnikowych: *F. latericum*, *M. hiemalis*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *C. vini*, *A. alternata* oraz *G. candidum* [26]. Co więcej, zaobserwowano, że spektrum aktywności antagonisticznej bakterii *Lactobacillus* jest cechą szczepową, natomiast dodanie polioli do podłoża wykazuje zróżnicowany wpływ na badane szczepy pleśni i drożdży [26]. Może to świadczyć o ukierunkowaniu metabolizmu badanych szczepów bakterii na wytwarzanie specyficznych produktów przeciwwgrzybowych. Podobną zależność zbadano po dodaniu do podłoża hodowlanego galaktozydowych pochodnych polioli, galksylitolu, gal-sorbitolu oraz gal-erytritrolu [27]. Badane szczepy *L. casei* (ŁOCK 0908, ŁOCK 0910), *L. paracasei* (ŁOCK 0919, ŁOCK 0922), *L. acidophilus* (ŁOCK 0927, ŁOCK 0933) wykazały znaczną rozbieżność kinetyki wzrostu oraz ilości wytwarzanych kwasów mlekowego i octowego w zależności od zastosowanego podłoża [27]. Co więcej, modyfikacja podłoża fermentacyjnego spowodowała zmianę pH medium MRS. Medium, do którego dodano galaktozydowe pochodne polioli (gal-sorbitol, gal-erytritrol i gal-ksylitol), wykazało niższe pH po fermentacji wybranych szczepów *L. acidophilus* (18 szczepów), *L. casei* (15 szczepów) oraz *L. paracasei/casei* (13 szczepów) niż w obecności polioli (sorbitolu, erytritrolu i ksylitolu) [29].

Ważnym czynnikiem determinującym aktywność przeciwwgrzybową *Lactobacillus* sp. jest temperatura. Crowley i wsp. [11] zaobserwowali, że badane szczepy *L. plantarum* (62 i 16) wykazują najsilniejszą aktywność przeciwwgrzybową podczas wzrostu w temp. 25 ÷ 30 °C oraz przy pH w zakresie 4,0 ÷ 6,0. Dane literaturowe wskazują, że temperaturę wzrostu należy dobierać nie tylko względem wybranego szczepu bakterii,

lecz także względem szczepu wskaźnikowego [21]. Przykładem jest szczep *L. reuteri* ee1p, który powoduje inhibicję wzrostu pleśni *A. niger* najsilniej w temp. 30 °C, natomiast słabiej w temp. 37 °C. Ten sam szczep wykazuje silny efekt hamujący wobec pleśni *A. fumigatus* w temp. 37 °C, a w temp. 30 °C nie wykazuje aktywności antagonistycznej wobec *A. fumigatus* [21].

Podsumowanie

Odpowiednio wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej, zdolne do ograniczania zanieczyszczeń grzybowych są stosowane do produkcji żywności fermentowanej na świecie. Przykładem jest produkt o nazwie Bio Profit (Danisco Niebüll GmbH, Niemcy), w którym zastosowano kultury starterowe *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (DSM 7061) oraz bakterie fermentacji propionowej *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS (DSM 7076) o właściwościach ograniczających wzrost drożdży i grzybów strzępkowych [55]. Innym przykładem jest Micrograd™ (Wesman Foods Inc., OR, USA), w którym do wytworzenia fermentowanego napoju mlecznego użyto bakterii *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Napój ten był stabilny i wykazywał właściwości ograniczania wzrostu drożdży, grzybów strzępkowych i bakterii Gram-ujemnych [50]. Kolejnym przykładem jest zastosowanie dodatkowo, obok szczepionki typowej do produkcji jogurtu, preparatu zawierającego bakterie *Propionibacterium jensenii* SM11 i *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29 lub SM63, który ogranicza wzrost drożdży z rodzaju *Candida*, nie wpływając na cechy sensoryczne produktu końcowego [50].

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wykazują selektywną aktywność antagonistyczną wobec grzybów zanieczyszczających żywność. Spektrum tej aktywności jest zależne zarówno od szczepu bakterii, jak i od szczepu wskaźnikowego grzybów. Dostępne obecnie metody zwiększania zakresu hamowania wzrostu grzybów przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* nie zostały dotąd dostatecznie zoptymalizowane i nie pozwalają na inhibicję szerokiego spektrum drożdży i pleśni, jednak perspektywy zastosowania ich w przyszłości jako naturalnych metod ochrony żywności przed grzybami są obiecujące.

Praca finansowana w ramach grantu NCN, no 2013/09/B/NZ29/01806.

Literatura

- [1] Ahmadova A., Todorov S.D., Hadji-Sfaxi I., Choiset Y., Rabesona H., Messaoudi S., Kuliyeu A., Franco B.D., Chobert J.M., Haertlé T.: Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*, 2013, **20**, 42-49.
- [2] Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., Rejiniemon T.S., Lee K.D., Huxley V.A.J., Kim D.H., Durairandiyar V., Karupiah P., Choi K.C.: Identification and characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with

- antifungal, antioxidant and probiotic functional properties. *Indian J. Microbiol.*, 2015, **55** (1), 19-28.
- [3] Aroui A., Mouritsen O.G.: Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. *Prog. Lipid Res.*, 2013, **52** (1), 130-140.
- [4] Axel C., Zannini E., Arendt E.K., Waters D.M., Czerny M.: Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2Δ by HRGC/MS using stable isotope dilution assay. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406** (9-10), 2433-2444.
- [5] Belguesmia Y., Rabesona H., Mounier J., Pawtowsky A., Le Blay G., Barbier G., Haertlé T., Chobert J.M.: Characterization of antifungal organic acids produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np immobilized in gellan-xanthan beads during batch fermentation. *Food Control*, 2014, **36** (1), 205-211.
- [6] Belz M.C., Mairinger R., Zannini E., Ryan L.A., Cashman K.D., Arendt E.K.: The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **96** (2), 493-501.
- [7] Black B.A., Zannini E., Curtis J.M., Gänzle M.G.: Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, **79** (6), 1866-1873.
- [8] Cheong E.Y.L., Sandhu A., Jayabalan J., Kieu Le T.T., Nhiep N.T., My Ho H.T., Zwielenher J., Bansa N., Turner M.S.: Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *P. commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 2014, **46**, 91-97.
- [9] Cortés-Zavaleta O., López-Malo A., Hernández-Mendoza A., García H.S.: Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int. J. Food Microbiol.*, 2014, **173**, 30-35.
- [10] Crowley S., Mahony J., Morrissey J.P., Van Sinderen D.: Transcriptomic and morphological profiling of *Aspergillus fumigatus* Af293 in response to antifungal activity produced by *Lactobacillus plantarum* 16. *Microbiology*, 2013, **159** (Pt 10), 2014-2024.
- [11] Crowley S., Mahony J., Van Sinderen D.: Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiol.*, 2013, **58** (4), 291-299.
- [12] Dal Bello F., Clarke C.I., Ryan L.A.M., Ulmer H., Schober T.J., Ström K., Sjögren J., Van Sinderen D., Schnürer J., Arendt E.K.: Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.*, 2007, **45** (3), 309-318.
- [13] De Muynck C., Leroy A.I., De Maeseneire S., Arnaut F., Soetaert W., Vandamme E.J.: Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiol. Res.*, 2004, **159** (4), 339-346.
- [14] Delavenne E., Cliquet S., Trunet C., Barbier G., Mounier J., Le Blay G.: Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.II in yogurt. *Food Microbiol.*, 2015, **45** (Pt A), 10-17. DOI: 10.1016/j.fm.2014.04.017.
- [15] Delavenne E., Ismail R., Pawtowski A., Mounier J., Barbier G., Le Blay G.: Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*, 2013, **30** (1), 206-213.
- [16] Delavenne E., Mounier J., Déniel F., Barbier G., Le Blay G.: Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, **155** (3), 185-190.
- [17] Falagas M.E., Betsi G.I., Athanasiou S.: Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: A review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, **58** (2), 266-272.
- [18] Fhoula I., Najjari A., Turki Y., Jaballah S., Boudabous A., Ouzari H.: Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *Biomed Res. Int.*, 2013, **2013**, 1-14.

- [19] Gerez C.L., Torres M.J., Font de Valdez G., Rollán G.: Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol. Control*, 2013, **64** (3), 231-237.
- [20] Goderska K., Rychlik T., Andrzejewska E., Szkaradkiewicz A., Czarnecki Z.: Antagonistyczny wpływ *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 i DSM 20242 na bakterie patogenne izolowane od ludzi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **82** (3), 114-131.
- [21] Guo J., Brosnan B., Furey A., Arendt E., Murphy P., Coffey A.: Antifungal activity of *Lactobacillus* against *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and *Epidermophyton floccosum*. *Bioeng. Bugs*, 2012, **3** (2), 104-113.
- [22] Gupta R., Srivastava S.: Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiol.*, 2014, **42**, 1-7.
- [23] Hassan Y.I., Bullerman L.B.: Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, **121** (1), 112-115.
- [24] Ho P.H., Luo J.B., Adams M.C.: Lactobacilli and dairy propionibacterium with potential as biopreservatives against food fungi and yeast contamination. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2009, **45** (4), 414-418.
- [25] Kim J.D.: Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi against *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 2005, **33** (4), 210-214.
- [26] Klewicka E.: Antifungal activity of lactic acid bacteria of genus *Lactobacillus* sp. In the presence of polyols. *Acta Alimentaria*, 2007, **36** (4), 495-499.
- [27] Klewicka E., Klewicki R.: *In vitro* fermentation of galactosyl derivatives of polyols by *Lactobacillus* strains. *Czech J. Food Sci.*, 2009, **27** (1), 65-70.
- [28] Klewicka E., Libudzisz Z.: Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* bacteria toward selected food-contaminating bacteria. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2004, **13/54** (2), 169-174.
- [29] Klewicki R., Klewicka E.: Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnol. Lett.*, 2004, **26** (4), 317-320.
- [30] Köhler G.A., Assefa S., Reid G.: Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 2012, **2012**, 1-14.
- [31] Kwak M.K., Liu R., Kim M.K., Moon D., Kim A.H., Song S.H., Kang S.O.: Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi. *J. Microbiol.*, 2014, **52** (1), 64-70.
- [32] Li H., Liu L., Zhang S., Cui W., Lv J.: Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Curr. Microbiol.*, 2012, **65** (2), 156-161.
- [33] Li H., Liu L., Zhang S., Uluko H., Cui W., Lv J.: Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control*, 2013, **34** (2), 675-680.
- [34] Li H., Zhang S., Lu J., Liu L., Uluko H., Pang X., Sun Y., Xue H., Zhao L., Kong F., Lv J.: Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control*, 2014, **43**, 57-64.
- [35] Lynch K.M., Pawlowska A.M., Brosnan B., Coffey A., Zannini E., Furey A., McSweeney P.L.H., Waters D.M., Arendt E.K.: Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 2014, **34** (1), 167-173.
- [36] Magnusson J.: Antifungal activity of lactic acid bacteria. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden 2003, **397**.
- [37] Mauch A., Dal Bello F., Coffey A., Arendt E.K.: The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, **141** (1-2), 116-121.

- [38] Mu W., Yang Y., Jia J., Zhang T., Jiang B.: Production of 4-hydroxyphenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007 fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, 2010, **109** (4), 369-371.
- [39] Mu W., Yu S., Zhu L., Zhang T., Jiang B.: Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **95** (5), 1155-1163.
- [40] Nyanzi R., Awouafack M.D., Steenkamp P., Jooste P.J., Eloff J.N.: Anticandidal activity of cell extracts from 13 probiotic *Lactobacillus* strains and characterisation of lactic acid and a novel fatty acid derivative from one strain. *Food Chem.*, 2014, **164**, 470-475.
- [41] Ogunshe A.A.O., Omotoso M.A., Bello V.B.: The in vitro antimicrobial activities of metabolites from lactobacillus strains on *Candida* species implicated in *Candida vaginitis*. *Malays J. Med. Sci.*, 2011, **18** (4), 13-25.
- [42] Oranusi S.U., Braide W., Oguoma O.I.: Antifungal properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Ricinus communis*, *Pentaclethra macrophylla* and yoghurts. 2013, *Glob. Adva. Res. J. Food Sci. Technol.*, 2013, **2** (1), 01-06.
- [43] Quan X., Zhang L., Li Y., Liang C.: TCF2 Attenuates FFA-induced damage in islet β -cells by regulating production of insulin and ROS. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15** (8), 13317-13332.
- [44] Rather I.A., Seo B.J., Rejish Kumar V.J., Choi U.H., Choi K.H., Lim J.H., Park Y.H.: Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2013, **57** (1), 69-76.
- [45] Rizzello C.G., Cassone A., Coda R., Gobetti M.: Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem.*, 2011, **127** (3), 952-959.
- [46] Rouse S., Harnett D., Vaughan A., Van Sinderen D.: Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, **104** (3), 915-923.
- [47] Ryan L.A., Zannini E., Dal Bello F., Pawlowska A., Koehler P., Arendt E.K.: *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, **146** (3), 276-283.
- [48] Sangmanee P., Hongpattarakere T.: Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 2014, **40**, 224-233.
- [49] Schnürer J., Magnusson J.: Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. 2005, *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16** (1-3), 70-78.
- [50] Schwenninger S.M., Meile L.: A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2004, **27**, 229-237.
- [51] Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer J., Kenne L.: Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69** (12), 7554-7557.
- [52] Sorrentino E., Reale A., Tremonte P., Maiuro L., Succi M., Tipaldi L., Coppola R.: *Lactobacillus plantarum* 29 inhibits *Penicillium* spp. involved in the spoilage of black truffles (*Tuber aestivum*). *J. Food Sci.*, 2013, **78** (8), M1188-M1194.
- [53] Souza J.L., Da Silva A.F., Carvalho P.H., Pacheco B.S., Pereira C.M., Lund R.G.: Aliphatic fatty acids and esters: Inhibition of growth and exoenzyme production of *Candida*, and their cytotoxicity in vitro: Anti-*Candida* effect and cytotoxicity of fatty acids and esters. *Arch. Oral. Biol.*, 2014, **59** (9), 880-886.
- [54] 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.
- [55] Suomalainen T.H., Mäyrä-Mäkinen A.M.: Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Le Lait*, 1999, **79** (1), 165-174.
- [56] Tropcheva R., Nikolova D., Evstatieva Y., Danova S.: Antifungal activity and identification of *Lactobacilli*, isolated from traditional dairy product "katak". *Anaerobe*, 2014, **28**, 78-84.

- [57] Valan Arasu M., Jung M.W., Ilavenil S., Jane M., Kim D.H., Lee K.D., Park H.S., Hur T.Y., Choi G.J., Lim Y.C., Al-Dhabi N.A., Choi K.C.: Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC - 10 from forage silage with potential beneficial properties. J. Appl. Microbiol., 2013, **115** (5), 1172-1185.
- [58] Varsha K.K., Priya S., Devendra L., Nampoothiri K.M.: Control of spoilage fungi by protective lactic acid bacteria displaying probiotic properties. Appl. Biochem. Biotechnol., 2014, **172** (7), 3402-3413.
- [59] Voulgari K., Hatzikamari M., Delepoglou A., Georgakopoulos P., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N.: Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. Food Control, 2010, **21** (2), 136-142.
- [60] Wang H., Sun Y., Chen Ch., Sun Z., Zhou Y., Shen F., Zhang H., Dai Y.: Genome shuffling of *Lactobacillus plantarum* for improving antifungal activity. Food Control, 2013, **32** (2), 341-347.
- [61] Yang E.J., Chang H.C.: Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. Korean J. Microbiol. Biotechnol., 2008, **36** (4), 276-284.
- [62] Yang E.J., Chang H.C.: Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. Int. J. Food Microbiol., 2010, **139** (1-2), 56-63.
- [63] Yang S.C., Lin Ch.H., Sung C.T., Fang J.Y.: Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. Front Microbiol., 2014, **5**, 241.
- [64] Zamani-Zadeh M., Soleimani-Zad S., Sheikh-Zeinoddin M.: Biocontrol of gray mold disease on strawberry fruit by integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with ajwain and cinnamon essential oils. J. Food Sci., 2013, **78** (10), M1582-M1588.
- [65] Zheng J., Gänzle M.G., Lin X.B., Ruan L., Sun M.: Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. Environ. Microbiol., 2015, **17**(6), 2133-2143.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA OF *LACTOBACILLUS* GENUS

S u m m a r y

One of the methods of protecting fermented foods against undesirable microorganisms living therein is using the lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. The occurrence of lactic acid bacteria (LAB) in food is particularly beneficial. In addition to their expected antibacterial and antifungal activities, LAB are also characterized by their advantageous effect on human health for they stimulate gastrointestinal track to prevent food-borne infections and they improve overall health. The spectrum of antifungal activity of bacteria of the *Lactobacillus* genus, which is the main subject in this paper, results from the synthesis of metabolites with antifungal properties, i.e. of primary metabolites: lactic acid and acetic acid, and of secondary metabolites: other organic acids, cyclic dipeptides, fatty acids and their hydroxylated derivatives, low molecular weight compounds, bacteriocins, and hydrogen peroxide. The ability to synthesize the above named compounds is not a feature common to all bacteria of the *Lactobacillus* genus; it is a strain-linked ability of some individual bacterial cultures. Therefore, such strains of lactic acid bacteria are sought, which have a broad spectrum of antagonistic activity against fungi as are the methods of increasing that activity, for example by selecting optimal conditions of the fermentation process or by modifying the composition of a medium, thus, changing the metabolism of lactic acid bacteria.

Key words: antifungal activity, antagonism, *Lactobacillus* sp., metabolites of LAB ☒