

WOJCIECH RUSINEK, ALEKSANDRA M. KOCOT

IGŁY, KTÓRE CHRONIĄ, A NIE KŁUJĄ: AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA FERMENTOWANYCH NAPOJÓW NA BAZIE IGIEŁ SOSNOWYCH

Streszczenie

Wprowadzenie. Żywność funkcjonalna to kategoria produktów spożywczych, które poza wartością odżywczą wywierają udowodniony korzystny wpływ na jedną lub więcej funkcji organizmu. Szczególną rolę w tym zakresie odgrywają produkty fermentowane, takie jak jogurt, kefir czy kiszonki, znane ze swojego wpływu na regulację równowagi mikrobity jelitowej, wspieranie odporności oraz dostarczanie bioaktywnych składników, w tym peptydów o właściwościach antybakteryjnych i przeciwtleniających. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie fermentowanymi napojami jako alternatywą dla komercyjnych napojów gazowanych. Przykładem takiego napoju może być fermentowany napój z igieł sosnowych (soda sosnowa, ang. *pine soda*). W odpowiedzi na rosnące zainteresowanie żywnością nisko przetworzoną i funkcjonalną celem niniejszego badania było opracowanie fermentowanego napoju z igieł sosny oraz jego wersji wzbogaconych w kurkumę, szczep probiotyczny *Lactobacillus acidophilus* Narine lub kombinację obu, a następnie ocena ich działania przeciwdrobnoustrojowego wobec wybranych patogenów żywności (*Listeria monocytogenes* 1326, *Listeria monocytogenes* 1327 oraz *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp Typhimurium PCM 2266).

Wyniki i wnioski. Badania wykazały, że supernatanty z napojów sosnowych pozbawione komórek bakteryjnych (ang. *cell-free supernatants*) wykazują zróżnicowane działanie hamujące wzrost patogenów zależne głównie od wartości pH. Obniżone pH zwiększało efekt antybakteryjny, wskazując na dominującą rolę kwasów organicznych w mechanizmie inhibicji. Dodatki funkcjonalne takie jak kurkuma i szczep probiotyczny *L. acidophilus* Narine wpływały na wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) w sposób zróżnicowany – w zależności od składu obserwowano zarówno jej obniżenie, jak i wzrost. Supernatant *L. acidophilus* Narine wykazywał najwyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową jako osobny komponent.

Słowa kluczowe: probiotyki, żywność funkcjonalna, *Lactobacillus*, bioaktywne składniki żywności, fermentowany napój sosnowy

Mgr W. Rusinek, ORCID: 0000-0003-0494-938X, Pracownia Biologii Ekstremofili, Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański; dr A.M. Kocot, ORCID: 0000-0003-0578-2673; Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Wita Stwosza 59, 80-309 Gdansk.
Kontakt: e-mail: wojciech.rusinek@phdstud.ug.edu.pl

Wprowadzenie

Koncepcja żywności funkcjonalnej pojawiła się w latach 80. XX wieku w Japonii, gdzie zrodziła się idea FOSHU (ang. *Foods for Specified Health Use*), czyli żywności do określonego przeznaczenia zdrowotnego [38]. W Europie badania nad żywnością funkcjonalną zapoczątkowano w roku 1996 w ramach programu FUFOSE (ang. *Functional Food Science in Europe*) finansowanego przez Komisję Europejską [9]. W rezultacie w 1999 roku sformułowano definicję żywności funkcjonalnej, zgodnie z którą żywność funkcjonalna to produkty spożywcze, które dostarczają dodatkowych korzyści, innych niż sam efekt odżywczy, i wpływają na jedną lub więcej funkcji organizmu, a działania te muszą być udowodnione w badaniach klinicznych z udziałem ludzi [28].

Żywność funkcjonalną można podzielić ze względu na zróżnicowane kryteria, m.in. technologiczne, fizjologiczne, chemiczne czy regulacyjne [13]. Dla konsumentów najbardziej użyteczna jest klasyfikacja oparta o przeznaczenie danego produktu spożywczego. Wyróżniamy tu m.in.: żywność dla kobiet w ciąży (zawierająca kwas foliowy, żelazo, jod) [14], dla sportowców i osób aktywnych fizycznie (zawierająca m.in. białka serwatkowe, leucynę, glutaminę, magnez, azotany, beta-alaninę, kofeinę) [40], dla dzieci (zawierająca cholinę, luteinę, witaminę D) [45], dla osób starszych (zawierających omegę 3, kurkuminę, witaminę D, polifenole) [32] czy dla diabetyków (mających w składzie błonnik rozpuszczalny, kwas chlorogenowy, cynamon) [25, 42]. Najbardziej zasadny wydaje się jednak podział ze względu na składniki bioaktywne i ich efekt funkcjonalny [3]. Przykładem składników funkcjonalnych są probiotyki, reprezentowane przez szczepy *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp., które przywracają równowagę w ekosystemie jelitowym oraz zwiększają odporność organizmu [2, 17, 42]. Kolejnym przykładem są prebiotyki, czyli substancje takie jak inulina, fruktooligosacharydy (FOS) i galaktooligosacharydy (GOS), które odżywiają pożyteczne bakterie jelitowe i regulują równowagę mikrobioty jelitowej [20]. Następnie fitosterole i stanole – beta-sitosterol i kampesterol, które obniżają frakcję LDL (ang. *low-density lipoprotein*) cholesterolu, czyli tzw. złego cholesterolu [33]. Kolejny składnik funkcjonalny to wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), do których zaliczamy kwas eikozapentaenowy (EPA), dokozaheksaenowy (DHA) i alfa-liponowy (ALA), które wykazują działanie kardioprotekcyjne i neuroprotekcyjne [16, 17]. Następnie związki fenolowe (potocznie zwane polifenolami), tj. flawonoidy, resweratrol, kwas chlorogenowy, które działają antyoksydacyjnie i przeciwzapalnie [6]. Do składników funkcjonalnych zaliczamy również peptydy bioaktywne, takie jak kazeina czy białka serwatkowe, które regulują ciśnienie krwi i mają działanie immunomodulujące [27]. Witaminy i minerały, np. witamina D, cynk, jod i selen, to również składniki funkcjonalne, wpływające na zdrowie kości, prawidłowe funkcjonowanie tarczycy oraz wykazujące działanie antyoksydacyjne [39]. Również błonnik pokarmowy, którego przykładem są celuloza, pektyny i beta-glukany,

zaliczane są do komponentów funkcjonalnych żywności, dzięki regulacji gospodarki węglowodanowej, obniżeniu poziomu lipidów we krwi i poprawie perystaltyki jelit [22, 47]. W konsekwencji na półkach sklepowych można zaobserwować coraz większy asortyment żywności funkcjonalnej. Jej przykładem są jogurty probiotyczne, np. zawierające szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG, margaryny wzbogacone w fitosterole, oleje roślinne bogate w kwasy tłuszczowe omega-3, soki i napoje wzbogacone w witaminy antyoksydacyjne (A, E, C) czy pieczywo i płatki pełnoziarniste bogate w błonnik pokarmowy [8, 10, 43].

W ostatnich latach, m.in. w związku z pandemią COVID-19, na znaczeniu zyskuje również żywność funkcjonalna, zwiększająca odporność organizmu, a jednym z najczęściej stosowanych w tym aspekcie składnikiem bioaktywnym jest kurkuma [5]. Kurkumę (*Curcuma longa* L.) uznawaje się za funkcjonalny dodatek do żywności. Jej głównym składnikiem bioaktywnym jest kurkumina. To ona posiada szeroki wachlarz udokumentowanych właściwości biologicznych, które nadają jej silne właściwości funkcjonalne, zarówno w żywności, jak i w suplementach diety [1, 36]. Działanie kurkuminy potwierdzono w licznych badaniach i przypisuje się jej właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, przeciwbakteryjne, przeciwpierwotniakowe, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze i immunomodulacyjne [29]. Kurkumę dodaje się m.in. do: napojów funkcjonalnych (np. „golden milk”), batonów i przekąsek „superfoods”, mieszanek przyprawowych (np. curry) oraz suplementów diety (tabletki, kapsułki, ekstrakty liposomalne) [41]. Zalecane jest łączenie kurkuminy z piperyną, zawartą m.in. w czarnym pieprzu, która zwiększa biodostępność kurkuminy nawet o 2000 % [18].

Przykładem żywności funkcjonalnej jest żywność fermentowana, która powstaje w wyniku aktywności drobnoustrojów, jednak pojęcia te nie są tożsame. By produkt fermentowany mógł zostać zaklasyfikowany jako funkcjonalny, konieczna jest w nim obecność żywych kultur bakterii lub drożdży oraz udowodnione korzystne działanie na organizm ludzki [23, 44]. Wśród produktów fermentowanych najlepiej poznane są produkty mleczne, tj. kefir, jogurt czy maślanka. Ich właściwości prozdrowotne wynikają głównie z obecności żywych kultur bakterii fermentacji mlekowej, często o cechach probiotycznych oraz związków bioaktywnych powstających w procesie fermentacji. Szczepy bakterii, takie jak *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp., wspomagają zwalczanie infekcji układu pokarmowego, moczowo-płciowego, oddechowego, skóry i jamy ustnej, głównie poprzez modulację mikrobioty, wspieranie odporności i hamowanie wzrostu patogenów [46]. Ponadto w fermentowanych produktach mlecznych występują bioaktywne peptydy, które działają przeciwbakteryjnie, przeciwutleniająco oraz obniżają ciśnienie krwi [34]. Dodatkowo dochodzi do zwiększenia biodostępności składników odżywczych – np. polepszenia wchłaniania wapnia i witamin z grupy B [15].

Fermentowane produkty mleczne, podobnie jak kiszona kapusta czy ogórki, od stuleci są obecne w diecie Polaków, a w ostatnich latach coraz bardziej popularne stają się orientalne roślinne produkty fermentowane, takie jak miso, tempeh, kimchi [19] oraz fermentowane napoje funkcjonalne, takie jak kombucha, zakwas imbirowy (ginger bug), tepache, kefir wodny czy soda sosnowa (pine needle soda), będące alternatywą dla komercyjnych napojów gazowanych. Napoje fermentowane z łatwością mogą być przygotowane w warunkach domowych, ze składników znajdujących się w praktycznie każdej kuchni [7, 16, 24, 48]. Takie napoje mogą potem służyć jako naturalne startery do przygotowania domowych lemoniad, „szampanów” czy gazowanych soków.

Coraz większa świadomość konsumentów na temat oddziaływania diety i składników żywności na zdrowie sprawia, że zainteresowanie zarówno żywnością funkcjonalną, jak i fermentowanymi napojami stale rośnie, a w poszukiwaniu surowców do fermentacji ogranicza nas już właściwie tylko wyobraźnia.

Wychodząc naprzeciw współczesnym trendom i potrzebom rynku, zbadaliśmy właściwości antibakteryjne fermentowanego napoju z igieł sosnowych oraz jego modyfikowane warianty wzbogacone w dodatki funkcjonalne – szczep probiotyczny *Lactobacillus acidophilus* Narine i ekstrakt z kurkumy i pieprzu oraz kombinację obu tych dodatków funkcjonalnych, a następnie oceniliśmy potencjał antibakteryjny uzyskanych napojów fermentowanych wobec wybranych patogenów występujących w żywności.

Material

Materialy

Surowce potrzebne do przygotowania fermentowanego napoju sosnowego i jego wariantów - pieprz czarny (Prymat, Wietnam), kurkuma (Prymat, Indie) oraz sacharoza (Diamant, Polska) zostały zakupione w lokalnym sklepie w Gdańsku. Igły sosny (*Pinus sylvestris*) zebrano w marcu 2025 w Parku Nadmorskim im. Prezydenta R. Reagana w Gdańsku-Brzeźnie i umyto celem usunięcia zanieczyszczeń powierzchniowych.

Material biologiczny

Szczepy *Lactobacillus acidophilus* Er-2 szczep 317/402 Narine (probiotyki Narine, Narum), *Listeria monocytogenes* 1326 (L1326), *Listeria monocytogenes* 1327 (L1327) oraz *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp Typhimurium PCM 2266 (S. Typhimurium; PCM2266) pozyskano z kolekcji drobnoustrojów Katedry Mikrobiologii (Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego).

Metody badań

Proces wstępnej fermentacji

Do przygotowanych wcześniej czterech jałowych słoików odmierzone po 30 g sacharozy i 500 cm³ wody jałowej o temperaturze pokojowej. Po rozpuszczeniu cukru do każdego słoika dodano po 30 g igieł sosnowych, wypłukanych w wodzie jałowej i wysuszonych za pomocą ręczników papierowych. Słoiki szczelnie zamknięto w celu zapewnienia warunków zbliżonych do beztlenowych. Wstępną fermentację z wykorzystaniem naturalnej mikrobioty igieł sosny prowadzono przez 12 godzin w temperaturze pokojowej ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

Przygotowanie ekstraktu z kurkumy i pieprzu

Do przygotowania ekstraktu z kurkumy i pieprzu odmierzone 5 g sproszkowanego korzenia kurkumy (*Curcuma longa*) i 0,5 g świeżo mielonego pieprzu czarnego (*Piper nigrum* L.), następnie uzupełniono wodą do objętości 100 cm³. Po energicznym wymieszaniu ekstrakty zostawiano na 12 godzin w temperaturze pokojowej ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

Przygotowanie szczepu probiotycznego

Płynną pożywkę MRS (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy) o objętości 50 cm³ zaszczipiono szczepem probiotycznym *Lactobacillus acidophilus* Narine i namnażano przez noc w temperaturze 37 °C w warunkach beztlenowych (BD GasPak™ system; Warszawa, Polska).

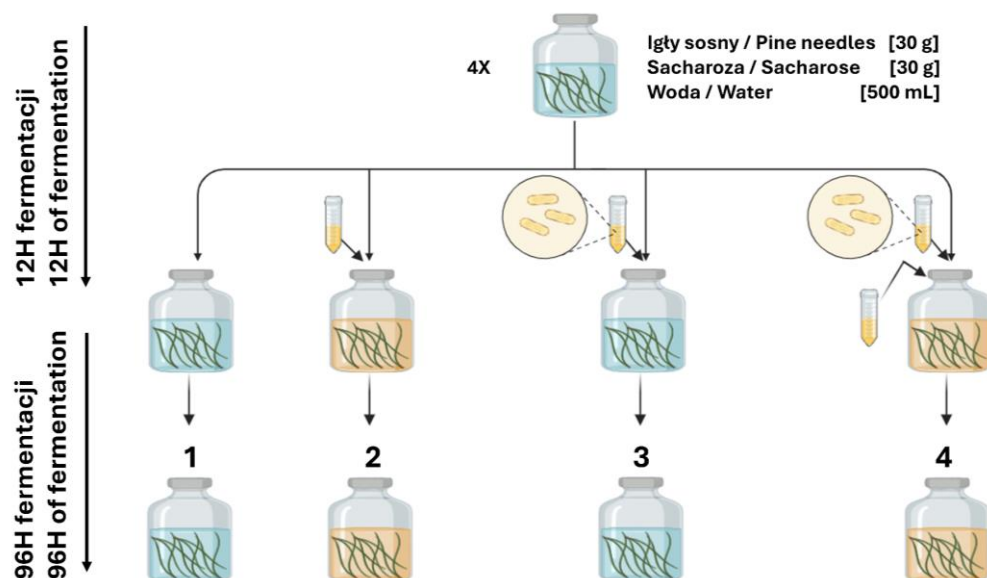
Proces fermentacji właściwej

Po 12 godzinach wstępnej fermentacji wykonano pomiary pH. Wariant podstawowy (kontrola) napoju bez dodatków (1) oznaczono kodem P. Do wariantu eksperymentalnego (2) dodano 5 cm³ ekstraktu z kurkumy i pieprzu i oznaczono kodem P + K. Do wariantu eksperymentalnego napoju (3) dodano 25 cm³ hodowli nocnej probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* Narine ($\text{OD}_{600} = 0.7$) i oznaczono jako P + N. Do wariantu eksperymentalnego napoju (4) dodano 5 cm³ ekstraktu z kurkumy i pieprzu oraz 25 cm³ hodowli nocnej *Lactobacillus acidophilus* Narine ($\text{OD}_{600} = 0.7$) i oznaczono jako P + K + N. Fermentację prowadzono przez następne 96 godzin, monitorując wartość pH co 24 godziny. Schemat warunków eksperymentów przedstawiono na Ryc. 1.

Przygotowanie supernatantów pozbawionych komórek (Cell-Free Supernatants)

W celu otrzymania supernatantów wolnych od komórek hodowle bakterii oraz warianty napojów poddawano wirowaniu ($11\,627 \times g$, 30 minut, 4 °C). Po usunięciu osadu komórek supernatanty filtrowano przez filtry strzykawkowe ($\varnothing 0.2 \mu\text{m}$), a na-

stępnie korygowano wartość pH do 4.6 oraz 7.0 w celu przeprowadzenia testów aktywności antybakteryjnej.



Rycina 1. Schemat przygotowania wariantów fermentowanego napoju sosnowego: 1 – napój bez dodatków, 2 – napój z dodatkiem ekstraktu z kurkumy i czarnego pieprzu, 3 – napój z dodatkiem szczepu probiotycznego *Lactobacillus acidophilus* Narine, 4 – napój z dodatkiem ekstraktu z kurkumy i czarnego pieprzu oraz szczepu probiotycznego *Lactobacillus acidophilus* Narine

Figure 1. Scheme for the preparation of fermented pine beverage variants: 1 – beverage without additives, 2 – beverage with turmeric and black pepper extract, 3 – beverage with the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* Narine, 4 – beverage with turmeric and black pepper extract and the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* Narine

Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Działanie antybakteryjne przygotowanych supernatantów oceniono na podstawie wyznaczenia wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC) wobec drobnoustrojów: *S. Typhimurium* PCM 2266 oraz *Listeria monocytogenes* 1326 i *Listeria monocytogenes* 1327. W tym celu w 96-dółkowych płytkach testowych, metodą seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń (2-fold dilution), przygotowano supernatanty o stężeniach w zakresie od 100 do 1.5625 % w pożywce Mueller-Hinton (MH; BD DifcoTM, Poznań, Polska). Dodatkowo przeprowadzano kontrole jałowości i wzrostu drobnoustrojów.

Pomiar wartości pH

Podczas badań dokonywano pomiaru pH, wykorzystując do tego celu pH-metr (Toledo, Szwajcaria).

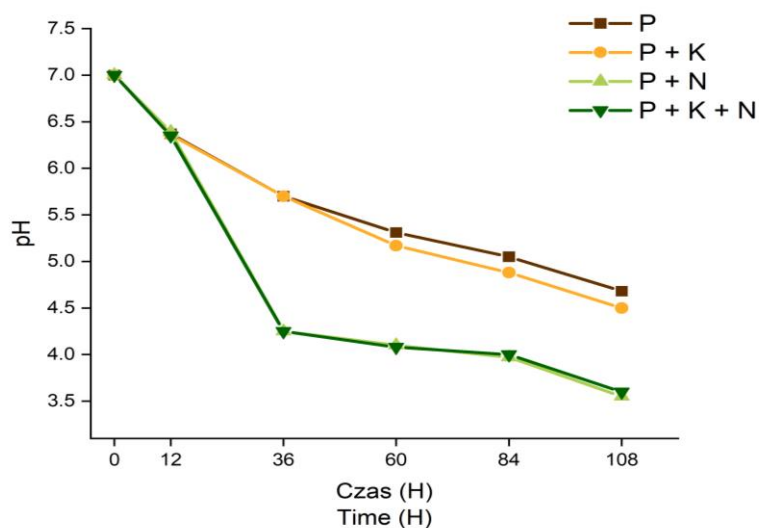
Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe z trzech powtórzeń. Oceny istotności statystycznej wyników dokonano przy użyciu niezależnego testu t. Za istotne statystycznie różnice uznano przy wartości $p < 0,05$. Analizy wykonano przy użyciu oprogramowania Origin Pro (OriginLab Corp., Massachusetts, USA), Statistica (TIBCO Software Inc., USA).

Wyniki i dyskusja

Kontrola pH i wzrostu patogenów

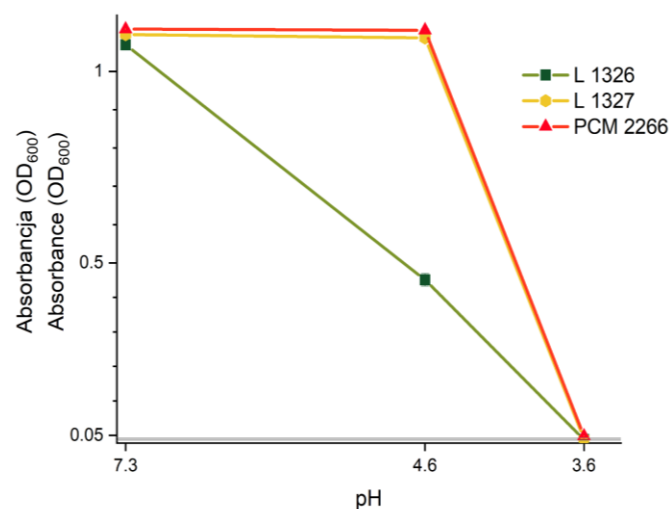
Wartość pH wariantów napojów sosnowych przed fermentacją właściwą wynosiła $6,38 (\pm 0,02)$. Wraz z czasem fermentacji wartość pH stopniowo obniżała się, uzyskując wartości końcowe równe 4,68 dla wariantu (1), 4,51 dla wariantu (2), 3,55 dla wariantu (3), 3,6 dla wariantu (4). Zmiany wartości pH w czasie fermentacji zostały przedstawione na Ryc. 2.



Rycina 2. Wpływ procesu fermentacji na wartość pH wariantów napojów sosnowych: 1 (P – napój bazowy), 2 (P+K – napój z dodatkiem ekstraktu z kurkumy i pieprzu), 3 (P+N – napój z dodatkiem szczepu *L. acidophilus* Narine) oraz 4 (P+K+N – napój z dodatkiem ekstraktu jak i szczepu probiotycznego)

Figure 2. Effect of the fermentation process on the pH value of pine beverage variants: 1 (P – base drink), 2 (P+K – with turmeric and pepper extract), 3 (P+N – with *L. acidophilus* Narine strain) and 4 (P+K+N – with both extract and probiotic strain)

Przeprowadzono ocenę wzrostu szczepów L1326, L1327 oraz PCM 2266 w pożywce MH o pH odpowiadającym końcowym wartościom pH fermentowanych napojów sosnowych (4,6 dla wariantów P i P+K oraz 3,6 dla P+N i P+K+N) w celu weryfikacji możliwości oznaczenia wartości MIC w warunkach zbliżonych do rzeczywistych. Spośród analizowanych szczepów jedynie L1326 wykazywał ograniczony wzrost przy pH 4,6, natomiast dla żadnych z badanych drobnoustrojów nie zaobserwowano wzrostu przy pH 3,6.

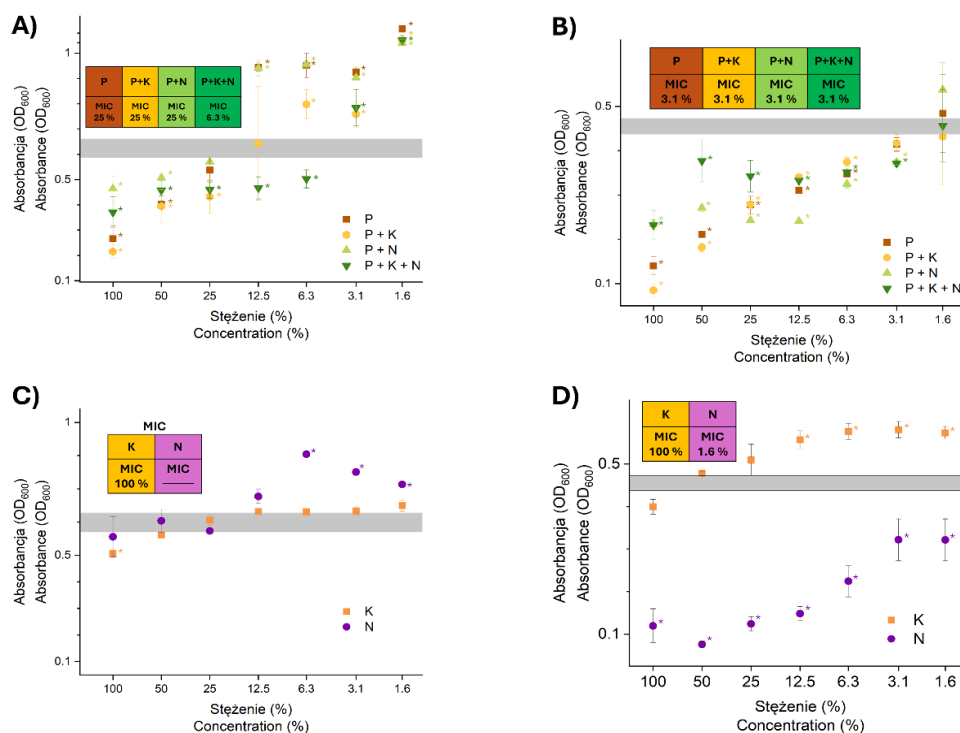


Rycina 3. Wpływ pH pożywki MH na wzrost drobnoustrojów. Kolorem zielonym oznaczono *L. monocytogenes* 1326 (L 1326), kolorem żółtym oznaczono *L. monocytogenes* 1327 (L 1327), kolorem czerwonym oznaczono *S. enterica* PCM 2266 (PCM 2266). Szara pozioma linia na dole wykresu odzwierciedla wartość absorbancji dla jałowej pożywki MH

Figure 3. Effect of MH medium pH on microbial growth. *L. monocytogenes* 1326 is indicated in green (L1326), *L. monocytogenes* 1327 is indicated in yellow (L 1327), and *S. enterica* PCM 2266 is indicated in red (PCM 2266). The gray horizontal line at the bottom of the graph represents the absorbance value of sterile MH medium

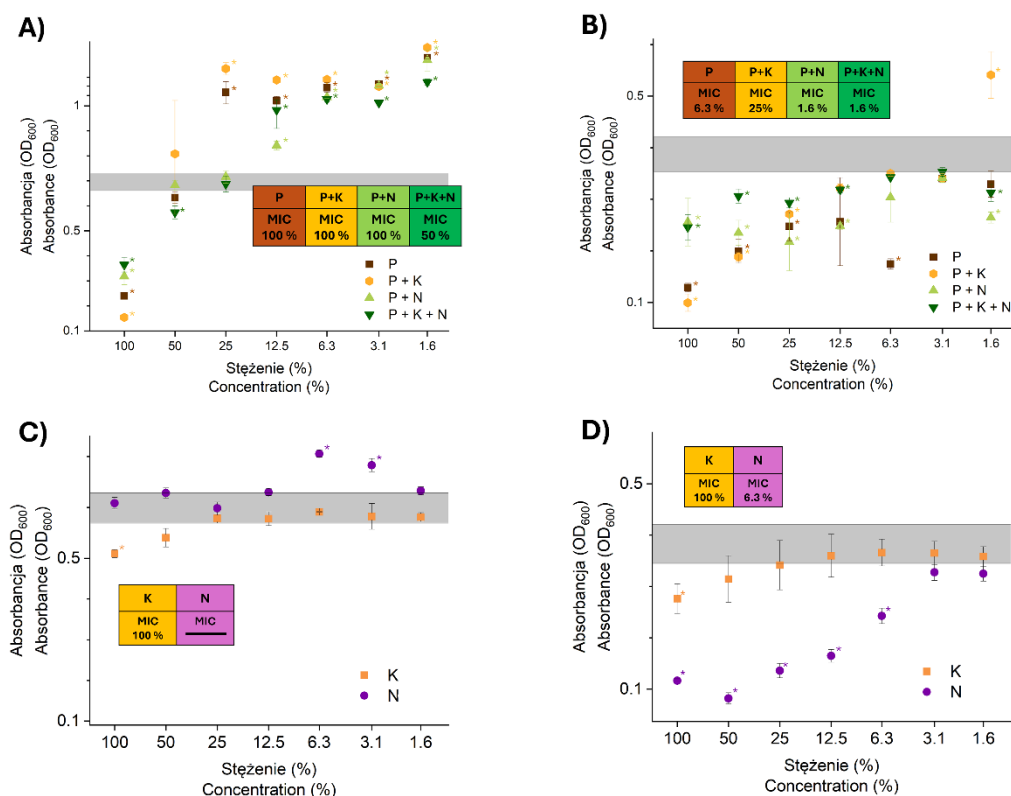
Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Przeprowadzone badania wykazały, że supernatanty pozbawione komórek z fermentowanego napoju z igieł sosny wykazują zróżnicowane działanie hamujące na wzrost *L. monocytogenes* oraz *S. Typhimurium* w zależności od pH. W każdym testowanym przypadku w niższych wartościach pH obserwowano niższe wartości MIC. Supernatanty pozbawione komórek bakteryjnych traciły lub znacząco osłabiały swoją aktywność inhibitującą po neutralizacji, co znajduje odzwierciedlenie w literaturze



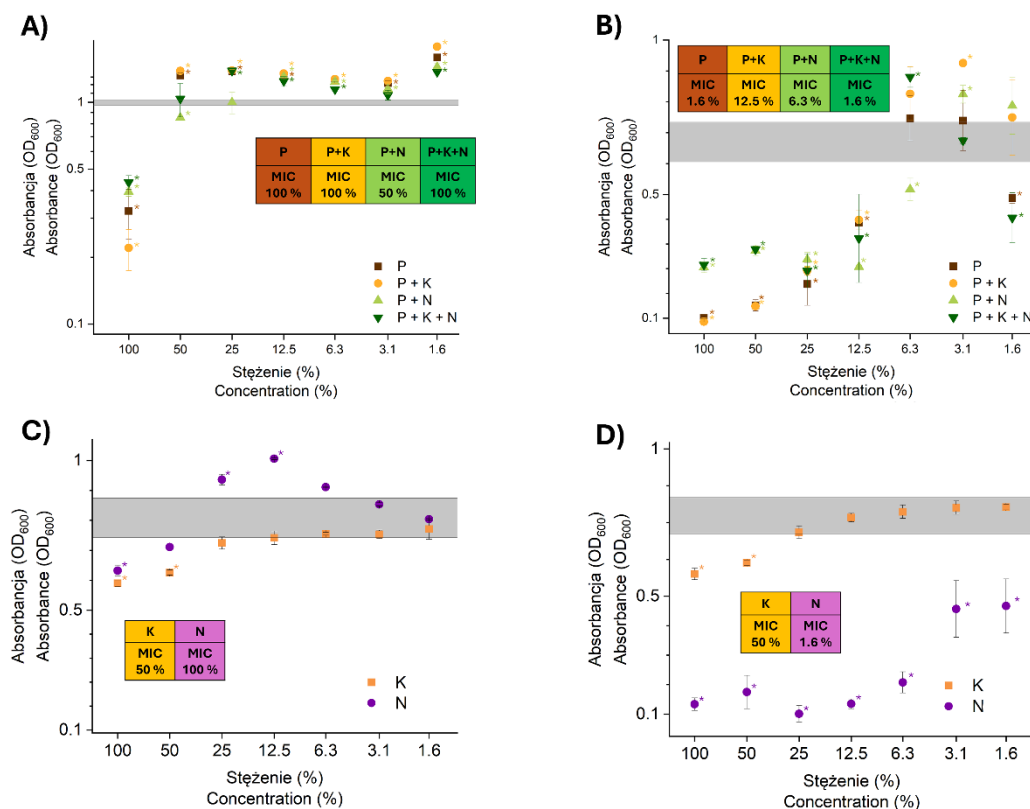
Rycina 4. Pomiar gęstości optycznej hodowli (OD₆₀₀) szczepu *L. monocytogenes* 1326 po inkubacji z różnymi wariantami fermentowanego napoju sosnowego. Panele A i C przedstawiają wyniki uzyskane przy pH = 7,0, natomiast panele B i D przy pH = 4,6. Szary pasek odpowiada wartościom wzrostu drobnoustroju w pożywce MH o odpowiadającym pH. W tabelach z korespondującymi do wykresów kolorami pokazano wartości MIC, określone graficznie. Panele A i B przedstawiają wyniki pomiarów dla badanych wariantów napojów: P (napój bazowy), P+K (z dodatkiem ekstraktu z kurkumy i pieprzu), P+N (z dodatkiem szczepu *L. acidophilus* Narine), oraz P+K+N (z dodatkiem zarówno ekstraktu jak i szczepu probiotycznego). Panele C i D przedstawiają próbki kontrolne: K (sam ekstrakt kurkumy i pieprzu) oraz N (sam szczep Narine). Wyniki przedstawiono jako średnie z trzech powtórzeń ± odchylenie standardowe. Gwiazdki wskazują na różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w badanym wariantcie napoju w porównaniu z kontrolą wzrostu drobnoustroju

Figure 4. Measurement of optical density (OD₆₀₀) of *L. monocytogenes* 1326 culture after incubation with different variants of fermented pine beverage. Panels A and C show the results obtained at pH = 7.0, while panels B and D show the results at pH = 4.6. The gray bar represents the microbial growth values in MH medium with the corresponding pH. The tables are color coded to the graphs displaying the MIC values, determined graphically. Panels A and B present the results for the tested drink variants: P (base drink), P+K (with turmeric and pepper extract), P+N (with *L. acidophilus* Narine strain), and P+K+N (with both extract and probiotic strain). Panels C and D present control samples: K (only turmeric and pepper extract) and N (only Narine strain). The results are presented as the mean of three repetitions ± standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) in the tested beverage variant compared to the microbial growth control



Rycina 5. Pomiar gęstości optycznej hodowli (OD_{600}) szczepu *L. monocytogenes* 1327 po inkubacji z różnymi wariantami fermentowanego napoju sosnowego. Panele A i C przedstawiają wyniki uzyskane przy $pH = 7,0$, natomiast panele B i D przy $pH = 4,6$. Szary pasek odpowiada wartościom wzrostu drobnoustroju w pożywce MH o odpowiadającym pH . W tabelach z korespondującymi do wykresów kolorami pokazano wartości MIC. Wyniki przedstawiono jako średnie z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenie standardowe. Gwiazdki wskazują na różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w badanym wariantie napoju w porównaniu z kontrolą wzrostu drobnoustroju

Figure 5. Measurement of optical density (OD_{600}) of *L. monocytogenes* 1327 culture after incubation with different variants of fermented pine beverage. Panels A and C show the results obtained at $pH = 7,0$, while panels B and D show the results at $pH = 4,6$. The gray bar represents the microbial growth values in MH medium with the corresponding pH . The tables are color coded to the graphs displaying the MIC values. The results are presented as the mean of three repetitions $\pm$ standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0,05$) in the tested beverage variant compared to the microbial growth control



Rycina 6. Pomiar gęstości optycznej hodowli (OD_{600}) szczepu *S. enterica* PCM 2266 po inkubacji z różnymi wariantami fermentowanego napoju sosnowego. Panele A i C przedstawiają wyniki uzyskane przy $pH = 7,0$, natomiast panele B i D przy $pH = 4,6$. Szary pasek odpowiada wartościom wzrostu drobnoustroju w pożywce MH o odpowiadającym pH . W tabelach z korespondującymi do wykresów kolorami pokazano wartości MIC. Wyniki przedstawiono jako średnie z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenie standardowe. Gwiazdki wskazują na różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w badanym wariantcie napoju w porównaniu z kontrolą wzrostu drobnoustroju

Figure 6. Measurement of optical density (OD_{600}) of *S. enterica* PCM 2266 culture after incubation with different variants of fermented pine beverage. Panels A and C show the results obtained at $pH = 7.0$, while panels B and D show the results at $pH = 4.6$. The gray bar represents the microbial growth values in MH medium with the corresponding pH . The tables are color coded to the graphs displaying the MIC values. The results are presented as the mean of three repetitions $\pm$ standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) in the tested beverage variant compared to the microbial growth control

[26, 37]. Badacze podkreślili rolę pH w inhibicji wzrostu wybranych patogenów, polegającą na deregulacji ważnych funkcji metabolicznych, prowadzących w konsekwencji do śmierci mikroorganizmów.

Inni badacze wykazali, że niższe wartości pH supernatantów pozbawionych komórek przyczyniały się do silniejszego efektu inhibitującego bakteriocyn oraz innych peptydów o działaniu antybakteryjnym produkowanych przez bakterie fermentacji mlekowej [12, 31]. Na przykład w badaniu Prudêncio i wsp. [31] sprawdzono wpływ temperatury i pH na efekt antybakteryjny nizyny oraz nizyny połączonej z EDTA (chelatorem jonów dwuwartościowych, wzmacniających efekt antybakteryjny przeciwko bakteriom Gram-ujemnych) wobec szczepu bakteryjnego *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Wykazano, że niskie pH (5.3) i temperatura 15,1 °C przyczyniały się do redukcji liczby żywych komórek *S. Typhimurium*. Co istotne, podobny efekt uzyskano dla wariantu z samą nizyną, bez dodatku EDTA, przy wydłużonej inkubacji [31], co wskazuje, że czynniki środowiskowe, takie jak temperatura i pH, wpływają na skuteczność stosowanych substancji antybakteryjnych. Badania innej grupy wskazują, że obniżone pH nie tylko zwiększa efekt antybakteryjny szeregu substancji antybakteryjnych, ale również, w obecności krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, hamuje wzrost *Salmonella* sp., *E. coli* i *L. monocytogenes* oraz przeciwdziała adhezji tych bakterii do komórek nabłonkowych jelita [30]. W kwaśnym środowisku krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe są zdolne do przenikania przez błonę komórkową wspomnianych patogenów, dysocjują w cytoplazmie, co prowadzi do jej zakwaszenia i deregulacji szlaków metabolicznych, skutkujących śmiercią bakterii [30].

W niniejszych badaniach zauważono, że sosnowe supernatanty pozbawione komórek bakterii wykazywały silniejsze działanie przeciwko *L. monocytogenes* niż *S. Typhimurium*. Zaobserwowane różnice wskazują na możliwość istnienia swoistych mechanizmów wrażliwości mikroorganizmów na składniki napoju i wynikają najprawdopodobniej z różnic pomiędzy budową bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [21]. Dodatek ekstraktu z kurkumy zwiększał działanie inhibicyjne wzrostu badanych drobnoustrojów niezależnie od pH, jednak obserwowano to tylko dla najwyższego stężenia. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu identyfikacji związków obecnych w uzyskanych przez nas fermentowanych napojach z igieł sosnowych.

Fermentowany napój sosnowy wykazuje obiecującą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wybranych patogenów żywności, co w powiązaniu z obecnością zróżnicowanej mikrobioty, w tym z bakterii kwasu mlekowego, związkami bioaktywnymi i witaminami, może kwalifikować go jako kandydata do grona żywności funkcjonalnej. Zawarte w nim substancje bioaktywne powstałe po procesie fermentacji mogą wspierać zdrowie konsumentów. Choć nie przeprowadzono formalnej analizy sensorycznej, to wariant podstawowy (P) charakteryzował się wyczuwalnym cytrusowo-żywiczym smakiem i aromatem, natomiast w przypadku napoju z ekstraktem kurkumy (P+K) zaobserwowano intensywniejszą barwę oraz zmienioną konsystencję, która przybrała postać lekko zagęszczonej żelowej struktury przypominającej rozwodniony żel z na-

sion szalwii hiszpańskiej (chia). Wariant wzbogacony o szczep probiotyczny Narine (P+N) wykazywał subtelny wpływ na zmianę smaku napoju, nadając mu bardziej jogurtowy posmak. Wariant z dodatkiem ekstraktu z kurkumy oraz szczepu probiotycznego (P+K+N) charakteryzował się intensywniejszą barwą i jogurtowym posmakiem, bez zmiany konsystencji.

Fermentowany napój na bazie igieł sosnowych posiada wysoki potencjał aplikacyjny ze względu na prostotę przygotowania, unikatowy profil sensoryczny oraz właściwości prozdrowotne. Może więc być chętnie wybierany przez konsumentów. Jednak aby jednoznacznie zaklasyfikować ten produkt jako żywność funkcjonalną, konieczna jest dokładna charakterystyka napoju pod względem chemicznym, a w dalszej perspektywie również przeprowadzenie badań klinicznych, potwierdzających jego wpływ na organizm człowieka.

Wnioski

1. Supernatanty pozbawione komórek pozyskane z fermentowanych napojów sosnowych wykazały działanie inhibitujące wzrost patogenów żywności *L. monocytogenes* oraz *S. Typhimurium*.
2. Fortyfikacja fermentowanych napojów sosnowych wybranymi składnikami żywności funkcjonalnej wpłynęła na wartość MIC w sposób zróżnicowany – obserwowano zarówno obniżenie, jak i zwiększenie tej wartości.
3. Supernatant pozbawiony komórek pozyskany z hodowli *L. acidophilus* Narine wykazywał większą skuteczność przeciwdrobnoustrojową samodzielnie niż jako składnik fermentowanego napoju sosnowego, co wskazuje na syntezę substancji antybakteryjnych przez ten szczep.
4. Fermentowany napój z igieł sosnowych posiada cechy żywności funkcjonalnej, jednak by zakwalifikować go do tej grupy żywności, należy przeprowadzić dalsze badania nad identyfikacją substancji bioaktywnych obecnych w napoju oraz oceną ich wpływu na organizm ludzki w badaniach *in vivo*.

Wyniki niniejszych badań przedstawiono podczas XV Sympozjum „Probiotyki i prebiotyki w żywności”, które odbyło się w Kirach w dniach 02-04 kwietnia 2025.

Badania zrealizowano w ramach aktywności SKN “Bakterioza”, sfinansowano ze środków DS Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego, Zadanie 531-D100-D069-25.

Literatura

- [1] Abd El-Hack M.E., El-Saadony M.T., Swelum A.A., Arif M., Abo Ghanima M.M., Shukry M., Noreldin A., Taha A.E., El-Tarabily K.A.: Curcumin, the active substance of turmeric: its effects on health and ways to improve its bioavailability. *J. Sci. Food Agric.*, 2021, 101, 14, 5747-5762.
- [2] Adnan M.L.: The Effect of Probiotic Supplementation as Alternative Therapy for NAFLD: A Literature Review. *Eur. J. Trans. Clin. Med.*, 2021, 4, 2, 75-85.
- [3] Awulachew M.: Functional Foods: Functional Ingredients, Sources and Classification, Health Claims, Food Intolerance, and Allergy. in: Novo Barros A., Campos J., Vilela A. (Eds.) *Functional Food-Upgrading Natural and Synthetic Sources*. IntechOpen, 2024, pp. 1-38.
- [4] Banaszak M., Dobrzyńska M., Kawka A., Górna I., Woźniak D., Przysławski J., Drzymała-Czyż S. Role of Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) as modulatory and anti-inflammatory agents in noncommunicable diet-related diseases – Reports from the last 10 years. *Clin. Nutr. ESPEN*, 2024, 63, 240-258.
- [5] Basha S.J., Kaur K., Kaur P., Rehal J.: Curcuminoids: Composition, extraction, health benefits, delivery systems, and relation to COVID-19 treatment. *Food Saf. Health*, 2024, 2, 1, 21-38.
- [6] Bocsan I.C., Măgureanu D.C., Pop R.M., Levai A.M., Macovei S.O., Pătrașca I.M., Chedea V.S., Buzoianu A.D.: Antioxidant and Anti-Inflammatory Actions of Polyphenols from Red and White Grape Pomace in Ischemic Heart Diseases. *Biomedicines*, 2022, 10, 10, #2337.
- [7] Chiu H.-F., Wang H.-M., Shen Y.-C., Venkatakrishnan K., Wang C.-K.: Anti-inflammatory properties of fermented pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Food Biochemistry*, 2019, 43, 11, #12994.
- [8] Chusak C., Balmori V., Kamonsuwan K., Suklaew P., Adisakwattana S.: Enhancing Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and Total Polyphenol Content in Fermented Black Goji Berry Beverage Through Calcium – Alginate Encapsulation with Hydrocolloids. *Foods*, 2025, 14, 3, #518.
- [9] Contor L.: Functional Food Science in Europe. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2001, 11, 4Suppl, 20-23.
- [10] Damián M.R., Cortes-Perez N.G., Quintana E.T., Ortiz-Moreno A., Garfias Noguez C., Cruceño-Casarrubias C.E., Sánchez Pardo M.E., Bermúdez-Humarán L.G.: Functional Foods, Nutraceuticals and Probiotics: A Focus on Human Health. *Microorganisms*, 2022, 10, 5, #1065.
- [11] Darbandi A., Asadi A., Mahdizade Ari M., Ohadi E., Talebi M., Halaj Zadeh M., Darb Emamie A., Ghanavati R., Kakanj M. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2022, 36, #24093.
- [12] De Keersmaecker S.C.J., Verhoeven T.L.A., Desair J., Marchal K., Vanderleyden J., Nagy I.: Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Letters*, 2006, 259, 89-96.
- [13] Doyon M., Labrecque J.: Functional foods: a conceptual definition. *Brit. Food J.*, 2008, 110, 11, 1133-1149.
- [14] Fatima N., Yaqoob S., Rana L., Imtiaz A., Iqbal M.J., Bashir Z., Shaukat A., Naveed H., Sultan W., Afzal M., Kashif Z., Al-Asmari F., Shen Q., Ma Y.: Micro-nutrient sufficiency in mothers and babies: management of deficiencies while avoiding overload during pregnancy. *Front. Nutr.*, 2025, 12, #1476672.
- [15] García-Burgos M., Moreno-Fernández J., Alférez M.J.M., Díaz-Castro J., López-Aliaga I.: New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *J. Funct. Foods*, 2020, 72, #104059.
- [16] Gutiérrez-Sarmiento W., Peña-Ocaña B.A., Lam-Gutiérrez A., Guzmán-Albores J.M., Jasso-Chávez R., Ruíz-Valdiviezo V.M.: Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. *Microbiol. Res.*, 2022, 260, #127045.

- [17] He B.-L., Xiong Y., Hu T.-G., Zong M.-H., Wu H.: *Bifidobacterium* spp. as functional foods: A review of current status, challenges, and strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2023, 63, 26, 8048–8065.
- [18] Hewlings S.J., Kalman D.S.: Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health”, *Foods*, 2017, 6, 10, #92.
- [19] Karwowska K.K., Kaczmarczyk D.: Rola i znaczenie produktów fermentowanych w diecie. *Med. Og. Nauk. Zdr.*, 2023, 29, 2, 79-88.
- [20] Kaur A.P., Bhardwaj S., Dhanjal D.S., Nepovimova E., Cruz-Martins N., Kuča K., Chopra C., Singh R., Kumar H., Şen F., Kumar V., Verma R., Kumar D.: Plant Prebiotics and Their Role in the Amelioration of Diseases. *Biomolecules*, 2021, 11, 3, #440.
- [21] Kovanda L., Zhang W., Wei X., Luo J., Wu X., Atwill E.R., Vaessen S., Li X., Liu Y.: *In Vitro* Antimicrobial Activities of Organic Acids and Their Derivatives on Several Species of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Molecules*, 2019, 24, 20, #3770.
- [22] Lattimer J.M., Haub M.D.: Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients*, 2010, 2, 12, 1266-1289.
- [23] Leroy F., De Vuyst L.: Fermented food in the context of a healthy diet: how to produce novel functional foods? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 2014, 17, 6, 574-581.
- [24] Lynch K.M., Wilkinson S., Daenen L., Arendt E.K.: An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Int. J. Food Microbiol.* 2021, 345, #109128.
- [25] Ma Z.F., Fu C., Lee Y.Y.: The Modulatory Role of Bioactive Compounds in Functional Foods on Inflammation and Metabolic Pathways in Chronic Diseases. *Foods*, 2025, 14, 5, #821.
- [26] Mani-López E., Arriola-Bretón D., López-Malo A.: The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2022, 21, 1, 604-641.
- [27] Marcone S., Belton O., Fitzgerald D.J.: Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *Brit. J. Clin. Pharm.*, 2016, 83, 1, #152.
- [28] Martirosyan D., Singh J.: A New Definition of Functional Food by FFC: What Makes a New Definition Unique? *Funct. Foods Health and Disea.*, 2015, 5, 209-223.
- [29] Munekata P.E.S., Pateiro M., Zhang W., Dominguez R., Xing L., Fierro E.M., Lorenzo J.M.: Health benefits, extraction and development of functional foods with curcuminoids. *J. Func. Foods*, 2021, 79, #104392.
- [30] Peng M., Biswas D.: Short chain and polyunsaturated fatty acids in host gut health and foodborne bacterial pathogen inhibition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 18, 3987-4002.
- [31] Prudêncio C.V., Mantovani H.C., Cecon P.R., Prieto M., i Vanetti M.C.D.: Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella Typhimurium* to nisin combined with EDTA”, *Food Control*, 2016, 61, 248-253.
- [32] Rudkowska I.: Functional foods for health: Focus on diabetes. *Maturitas*, 2009, 62, 3, 263-269.
- [33] Schiepers O.J.G., de Groot R.H.M., van Boxtel M.P.J., Jolles J., de Jong A., Lütjohann D., Plat J., Mensink R.P., „Consuming Functional Foods Enriched with Plant Sterol or Stanol Esters for 85 Weeks Does Not Affect Neurocognitive Functioning or Mood in Statin-Treated Hypercholesterolemic Individuals. *The J. Nutr.*, 2009, 139, 7, 1368-1373.
- [34] Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T., Korpela R.: A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 77, 2, 326-330.
- [35] Shahidi F., Ambigaipalan P.: Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2018, 9, 345-381.
- [36] Sharifi-Rad J., Rayess Y.E., Rizk A.A., Sadaka C., Zgheib R., Zam W., Sestito S., Rapposelli S., Neffe-Skocińska K., Zielińska D., Salehi B., Setzer W.N., Dosoky N.S., Taheri Y., El Beyrouthy M.,

- Martorell M., Ostrander E.A., Suleria H.A.R., Cho W.C., Maroyi A., Martins N.: Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. *Front. Pharmacol*, 2020, 11, #01021.
- [37] Shehata M.G., Badr A.N., El Sohaimy S.A., Asker D., Awad T.S.: Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food bio-preservatives. *Annals Agri. Sci.*, 2019, 64, 1, 71-78.
- [38] Shimizu T.: Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. *Nutr. Res. Rev.*, 2023, 16, 2, 241-252.
- [39] Shulhai A.-M., Rotondo R., Petraroli M., Patianna V., Predieri B., Iughetti L., Esposito S., Street M.E.: The Role of Nutrition on Thyroid Function. *Nutrients*, 2024, 16, 15, #2496.
- [40] Spano M.: Functional Foods, Beverages, and Ingredients in Athletics. *Strength Condition. J.*, 2010, 32, 1, #79.
- [41] Tsuda T.: Curcumin as a functional food-derived factor: degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. *Food Funct.*, 2018, 9, 2, 705-714.
- [42] Victoria Obayomi O., Folakemi Olaniran A., Olugbemiga Owa S.: Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. *J. Funct. Foods*, 2024, 119, #106337.
- [43] Vlaicu P.A., Untea A.E., Varzaru I., Saracila M., Oancea A.G.: Designing Nutrition for Health – Incorporating Dietary By – Products into Poultry Feeds to Create Functional Foods with Insights into Health Benefits, Risks, Bioactive Compounds, Food Component Functionality and Safety Regulations. *Foods*, 2023, 12, 21, #4001.
- [44] Voidarou C., Antoniadou M., Rozos G., Tzora A., Skoufos I., Varzakas T., Lagiou A., Bezirtzoglou E. Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods*, 2021, 10, 1, #69.
- [45] Wichansawakun S., Buttar H.S.: Chapter 32 - Antioxidant Diets and Functional Foods Promote Healthy Aging and Longevity Through Diverse Mechanisms of Action. In: *The Role of Functional Food Security in Global Health*. Singh R.B., Watson R.R., Takahashi T. (Eds.), Academic Press, 2019, pp. 541-563
- [46] Wróblewska B., Kuliga A., Wnorowska K.: Bioactive Dairy-Fermented Products and Phenolic Compounds: Together or Apart. *Molecules*, 2023, 28, 24, #8081.
- [47] Yegin S., Kopec A., Kitts D.D., Zawistowski J.: Chapter 24 - Dietary fiber: a functional food ingredient with physiological benefits. In: *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*. Preuss H.G., Bagchi D. (Eds.) Academic Press, 2020, pp. 531-555
- [48] Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D.: Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria”, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2005, 38, 1, 73-75.

NEEDLES THAT PROTECT, NOT PRICK: ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FERMENTED PINE NEEDLE BEVERAGES

S u m m a r y

Introduction. Functional food refers to a category of food products that, beyond their nutritional value, have a proven beneficial effect on one or more functions of the human body. Fermented products such as yogurt, kefir or pickled vegetables play a special role in this regard, known for their impact on regulating gut microbiota balance, supporting the immune system and providing bioactive compounds and peptides with antibacterial and antioxidant properties. In recent years, there has been growing interest in fer-

mented beverages as a healthier alternative to commercial fizzy drinks. An example of such a beverage is pine needle soda – a fermented drink made from pine needles. In response to the increasing demand for unprocessed and functional food, the aim of this study was to develop a fermented pine needle beverage and its variants enriched with turmeric, the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* Narine, or their combination, followed by the evaluation of their antimicrobial activity against selected foodborne pathogens (*Listeria monocytogenes* 1326, *Listeria monocytogenes* 1327 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp Typhimurium PCM 2266).

Results and conclusions. The study showed that cell-free supernatants from fermented pine-based beverages exhibit variable inhibitory effects on pathogen growth, primarily dependent on pH values. Lower pH enhanced the antimicrobial activity, indicating the predominant role of organic acids in the inhibition mechanism. The addition of functional ingredients: turmeric and probiotic strain *L. acidophilus* Narine influenced the minimum inhibitory concentration (MIC) values in different ways – both decreasing and increasing MIC depending on the composition. The *L. acidophilus* Narine supernatant demonstrated the highest antimicrobial efficacy when used as a separate component.

Key words: probiotics, functional food, *Lactobacillus*, bioactive food compounds, fermented pine needle soda ☒