

# ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITA SBÍRKOVÝCH A NOVĚ IZOLOVANÝCH KMENŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ PRO PŘÍPRAVU KVASŮ

Šárka Horáčková<sup>1</sup>, Tereza Nováková<sup>1</sup>,  
Kristina Bialasová<sup>1</sup>, Pavel Skřivan<sup>2</sup>, Marcela Sluková<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav mléka, tuků a kosmetiky,

<sup>2</sup> Ústav sacharidů a cereálií, VŠCHT Praha

## Antifungal activity of collection and newly isolated strains of lactic acid bacteria for sourdough preparation

### Abstrakt

V práci byla pomocí agarové difusní metody testována antifungální aktivita sbírkových kmenů laktobacilů a nově izolovaných kmenů bakterií mléčného kvašení z ječného kvasu vůči kontaminujícím plísním *Fusarium culmorum* DMF301 a *Penicillium expansum* DMF04. Jako vysoce aktivní byly určeny kmeny *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151, *L. plantarum* CCDM 181, *L. panis* CCDM 471, *L. plantarum* CCDM 583 a *L. plantarum* VT2. Antifungální aktivita byla způsobena převážně tvorbou organických kyselin, ale mírnou aktivitu vykazovaly i tepelně ošetřené zneutralizované bezbuněčné supernatanty kmene *L. zymae* CCDM 361 vůči *P. expansum* DMF04 a kmene *L. plantarum* CCDM 583 vůči *F. culmorum* DMF301. Nově izolované kmeny z ječných kvasů *L. curvatus* a *Leuconostoc mesenteroides* se lišily svojí aktivitou vůči testovaným plísním.

**Klíčová slova:** laktobacily, *Fusarium culmorum*, *Penicillium expansum*, ječný kvas

### Abstract

In this work, antifungal activity of the collection lactobacilli strains and newly isolated strains of lactic acid bacteria from barley sourdough against contaminating fungi *Fusarium culmorum* DMF301 and *Penicillium expansum* DMF04 was tested by agar diffusion method. *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151, *L. plantarum* CCDM 181, *L. panis* CCDM 471, *L. plantarum* CCDM 583 and *L. plantarum* VT2 were determined to be highly active. Antifungal activity was predominantly caused by the formation of organic acids, but also the heat-treated neutralized cell-free supernatants of *L. zymae* CCDM 361 showed at least weak activity against *P. expansum* DMF04 and supernatant of *L. plantarum* CCDM 583 against *F. culmorum* DMF301. The newly isolated strains of barley leeks *L. curvatus* and

*Leuconostoc mesenteroides* differed in their activity against the tested fungi.

**Key words:** lactobacilli, *Fusarium culmorum*, *Penicillium expansum*, barley leaven, barley sourdough

### Úvod

Funkční vlastnosti bakterií mléčného kvašení (BMK) se tradičně uplatňují nejen ve fermentovaných mléčných výrobcích, ale nalézají ocenění i v nemléčných potravinách např. v kvasech a následně pekařských výrobcích. V současné době je velká pozornost věnována opětovnému zavádění kvasových chlebů z důvodu většího zájmu spotřebitelů o tyto výrobky, u kterých dochází k přirozenému prodloužení trvanlivosti činností BMK.

Je známo, že složení fermentační mikroflóry kvasu není vždy konstantní. Typicky méně než šest různých druhů či kmenů tvoří více než 99,9 % mikrobiálních buněk. Počet druhů izolovaných z kvasu v celosvětovém měřítku zahrnuje více než 80 druhů bakterií, kde významné zastoupení mají čeledi *Lactobacillaceae* a *Leuconostocaceae*, ale přítomny jsou i laktokoky, streptokoky a enterokoky (Gänzle, Ripari, 2016). Bylo prokázáno, že druhy *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus sanfranciscensis* se vyskytují u 50 % zkoumaných kvasů (De Vuyst a kol., 2014). Metabolická aktivita mikroflóry kvasu má v kombinaci s enzymatickou aktivitou substrátů obilovin významný vliv na kvalitu výsledného pekařského výrobku. Základními biochemickými procesy, které probíhají během přípravy kvasu, jsou alkoholové a mléčné kvašení, ale přítomné BMK se mohou také lišit dalšími metabolickými aktivitami, jako je např. schopnost efektivně využít maltosu, tvorba exopolysacharidů ze sacharosy, což zvyšuje objem a zlepšuje strukturu chleba, či odolnost vůči kyselinám vzniklým v důsledku konverze argininu a glutaminu (Gänzle, Ripari, 2016; Gänzle, 2014; Galle, Arendt, 2014).

Zastoupení v kvasech mají především heterofermentativní druhy laktobacilů (Gül a kol., 2005), jejichž konečným produktem fermentace sacharidů je kyselina mléčná a kyselina octová. Právě kyselina octová je velice významnou složkou podílející se na chuti a vůni kvasu (De Vuyst, Neysens, 2005; Gül a kol., 2005). Kromě ovlivnění chutě prostřednictvím metabolitů BMK je jejich důležitou funkcí také zamezení růstu nežádoucí mikroflóry v samotném kvasu i v hotových výrobcích, kde se nejvýznamněji uplatňuje jejich antifungální aktivita. Kontaminující mikroflórou kvasu mohou být vláknité mikromycety a zástupci rodu *Bacillus*. Zejména se jedná o druhy *Bacillus subtilis* a *Bacillus mesentericus*, jejichž spóry přežijí i řádné propečení výrobku. Jestliže má střída hotového pekařského produktu dostatečně nízké pH, dochází k omezení výskytu nitkovitosti způsobené těmito bakteriemi (Šedivý, Albrecht, 2014).

Antifungální účinek BMK se dříve přikládal snížení pH v důsledku produkce organických kyselin. Avšak v současné době je známo, že kromě nich vytvářejí BMK řadu dalších sekundárních metabolitů s antifungální aktivitou,

jako jsou mastné kyseliny, kyseliny s fenolovou skupinou (hlavně kyselina fenylmléčná), bílkovinné sloučeniny a řadu nízkomolekulárních látek (Axel a kol., 2015).

Cílem této práce bylo ověření vlivu zástupců bakterií mléčného kvašení, jednak sbírkových a jednak přímo izolovaných z ječného kvasu, a dále tepelně ošetřených bezbuněčných supernatantů na růst nežádoucích kontaminujících plísní rodu *Fusarium* a *Penicillium*.

## Materiál a metody

**Použití mikroorganismy:** laktobacily ze sbírky Laktoflora® Milcom (ČR) - *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151; *L. plantarum* CCDM 181 (izolát ze siláže); *L. zymae* CCDM 361 (izolát z pšeničného kvasu); *L. sanfranciscensis* CCDM 451; *L. panis* CCDM 471; *L. sanfranciscensis* CCDM 827 (izoláty z kvasu); *L. plantarum* CCDM 583 (izolát z ječné mouky); mikroorganismy ze sbírky Ústavu mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha - *Lactobacillus plantarum* VT2 (izolát z tatarské omáčky); *Fusarium culmorum* DMF301; *Penicillium expansum* DMF04.

**Kmeny** *L. acidophilus* 151, *L. plantarum* 181, *L. plantarum* VT2, *L. zymae* 361 a *L. plantarum* 583 byly kultivovány v MRS bujónu (Merk, Německo) (2 % obj. inokula), zatímco kmeny *L. sanfranciscensis* 451, *L. panis* 471 a *L. sanfranciscensis* 827 byly kultivovány v MRS bujónu se sníženým hmotnostním podílem glukosy (7 g·l<sup>-1</sup>) s fruktosou (7 g·l<sup>-1</sup>) a maltosou (7 g·l<sup>-1</sup>); pH 5,8 před sterilací; kultivace v termostatu při teplotě 37 °C s 5 % obj. CO<sub>2</sub> po dobu 18 hodin.

**Kultivace plísní** probíhala na Yeast extract sucrose agar (YESA agar) o složení (g·l<sup>-1</sup>): kvasničný extrakt 20,0 (Oxoid, Velká Británie), sacharosa 15,0 (VWR, Belgie), síran hořečnatý heptahydrát 0,5, síran měďnatý pentahydrát 0,005 (Lachema, ČR), síran zinečnatý heptahydrát 0,01 (Penta, ČR), agar 20,0 (Oxoid, Velká Británie), destilovaná voda 885,0; pH 5,7 (před sterilací).

**Identifikace nově izolovaných kmenů z kvasů** (25 g ječné celozrnné mouky, Mlýn Perner Svijany spol. s r.o. nebo Pro-Bio spol. s r.o. a 50 ml vlažné vody, kultivace při 25 °C, izolace technikou čárkování, Gramovo barvení, katalasový test, mikroskopická kontrola) byla provedena pomocí API testů (Biomérieux, USA) dle návodu výrobce a pomocí metody MALDI-TOF na Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze.

**Stanovení produkce organických kyselin** po kultivaci v MRS bujónu bylo provedeno metodou HPLC: kolona Polymer IEX H, 250 x 8 mm s předkolonou 40 x 8 mm (Watrex s.r.o.), teplota na 60 °C, mobilní fáze kyselina sírová (9 mmol·l<sup>-1</sup>), průtok činil 0,6 ml·min<sup>-1</sup>; nástřik vzorku byl 20 μl; detekce na UV detektoru při 210 nm.

**Antifungální aktivita** byla zjišťována pomocí agarové difusní metody (Stiles a kol., 2002): na Petriho misku bylo napipetováno 100 μl suspenze laktobacilů o koncentraci 10<sup>3</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup> nebo 2 ml tepelně ošetřených (100 °C) bezbuněčných supernatantů a zalito 10 ml modifikovaného

**Tab. 1** Počet buněk laktobacilů po kultivaci v MRS bujónu (18 h, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) a produkce organických kyselin

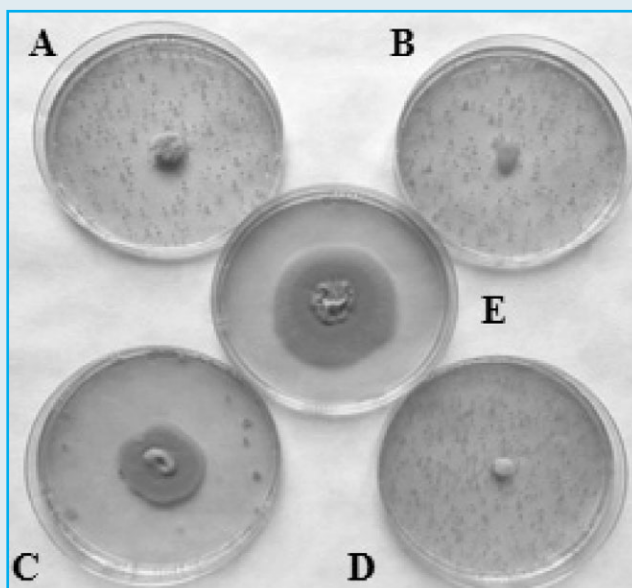
Kmen	počet [KTJ·ml <sup>-1</sup> ]	k. mléčná [g·l <sup>-1</sup> ]	k. octová [g·l <sup>-1</sup> ]
<i>L. acidophilus</i> CCDM 151	4,6·10 <sup>9</sup>	18,5	0,3
<i>L. plantarum</i> CCDM 181	2,9·10 <sup>9</sup>	36,3	2,8
<i>L. plantarum</i> VT2	3,1·10 <sup>9</sup>	34,1	2,7
<i>L. zymae</i> CCDM 361	8,1·10 <sup>8</sup>	38,6	4,0
<i>L. sanfranciscensis</i> CCDM 451	3,8·10 <sup>5</sup>	13,5	2,9
<i>L. panis</i> CCDM 471	2,3·10 <sup>6</sup>	29,1	0,9
<i>L. plantarum</i> CCDM 583	6,5·10 <sup>8</sup>	38,0	3,7
<i>L. sanfranciscensis</i> CCDM 827	8,6·10 <sup>8</sup>	29,8	0,8

(bez obsahu octanu sodného) MRS agaru, po zatuhnutí byl převrstven 5 ml YESA soft agaru (7,5 g agaru ·l<sup>-1</sup>) a po předsušení bylo do středu misky zaočkováno 5 μl suspenze spor plísní rodu *Fusarium culmorum* DMF 301 nebo *Penicillium expansum* DMF04 o koncentraci asi 10<sup>5</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup>. Následná kultivace probíhala po dobu 10 dnů při teplotě 30 °C, byl sledován radiální růst plísní měřením průměru kolonie digitálním posuvným měřítkem. Jako kontrolní stanovení byl použit růst plísně na agaru bez přídavku laktobacilů. Všechna měření byla provedena dvakrát, výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr.

## Výsledky a diskuse

### Antifungální aktivita sbírkových kmenů laktobacilů

V první části práce byl ověřen růst a metabolická aktivita (produkce kyseliny mléčné a octové) testovaných laktobacilů v MRS bujónu. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 1. Všechny kmeny vykazovaly dobré růstové schopnosti, dosahovaly denzity 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup> kromě kmenů 451 a 471 (10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup>). I když byl kmen 451 kultivován



**Obr. 1** Radiální růst plísně *F. culmorum* DMF301 za přítomnosti živých buněk laktobacilů po 6 dnech kultivace (A: *L. plantarum* CCDM 181; B: *L. plantarum* CCDM VT2; C: *L. zymae* CCDM 361; D: *L. plantarum* CCDM 583; E: kontrolní růst plísně *F. culmorum* DMF301)

**Tab. II** Inhibice růstu [%] plísně *F. culmorum* DMF301 rostoucími buňkami laktobacilů vůči kontrolnímu stanovení

Kmen Den	151	181	VT2	361	451	471	583	827
3	56,6	61,7	58,0	26,4	50,8	77,5	72,2	36,8
5	72,4	73,7	73,6	34,5	62,2	86,5	82,1	61,6
7	78,3	78,4	79,3	40,3	63,1	88,6	84,5	64,8
10	84,0	83,4	84,9	47,9	65,3	90,3	87,5	70,2

**Tab. III** Inhibice růstu [%] plísně *P. expansum* DMF04 rostoucími buňkami laktobacilů vůči kontrolnímu stanovení

Kmen Den	151	181	VT2	361	451	471	583	827
3	14,5	17,5	17,1	8,0	3,0	45,5	21,2	16,1
5	31,7	34,7	33,1	25,0	15,0	57,1	37,9	35,3
7	37,9	40,6	39,4	28,1	14,4	49,4	43,6	39,4
10	51,8	53,2	51,3	45,5	14,5	47,2	56,0	40,2

v MRS s přidavkem fruktosy a maltosy, nebylo dosaženo zvýšení počtu buněk. Jednotlivé kmeny se značně lišily produkcí jednotlivých kyselin. Kmeny 361 a 583 produkovaly největší množství kyseliny mléčné a octové, kmen 583 vykazoval v následujících experimentech největší antifungální účinek. Ačkoliv kmen 151 patří do homofermentativní skupiny laktobacilů, byla i u něj zjištěna malá produkce kyseliny octové. U kmenů VT2 a 361 byly detekovány stopy kyseliny fenylmléčné. Právě produkce organických kyselin (mléčné, octové, fenylmléčné) je hlavní příčinou silné schopnosti inhibovat růst plísní (Ventimiglia a kol., 2015; Le Lay a kol., 2016).

Antifungální aktivita laktobacilů vyjádřená jako procenta inhibice růstu plísní vůči kontrolnímu stanovení [%] je uvedena v Tab. II a III, příklad růstu plísně *F. culmorum* DMF301 v přítomnosti suspenze živých buněk laktobacilů po 6 dnech kultivace je zachycen na Obr. 1.

Z výsledků uvedených v Tab. II a III lze usoudit, že největší inhibiční účinek vůči růstu plísně *F. culmorum* DMF301 vykazoval kmen 471, zatímco růst plísně *P. expansum* DMF04 byl nejvíce inhibován kmenem 583. Naopak nejslabší antifungální aktivita vůči růstu plísně *F. culmorum* DMF301 byla pozorována u kmene 361, vůči růstu plísně *P. expansum* DMF04 byla zaznamenána u kmene 451. Byla zjištěna rozdílná inhibiční aktivita testovaných laktobacilů vůči použitým plísním, větší inhibiční účinek měly všechny testované laktobacily vůči *F. culmorum* DMF301. Antifungální účinek laktobacilů je popsán v celé řadě studií. Stiles a kol. (2002) ověřovali plotnovou metodou antifungální účinek kmene *Lactobacillus rhamnosus* VT1 vůči plísním rodu *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Rhizopus*. Zjistili, že octan sodný, který je jednou ze složek MRS agarů, vykazuje antifungální aktivitu. Zaznamenali, že spolu s kmenem VT1 octan sodný projevuje synergický efekt. Z tohoto důvodu byl v této práci používán modifikovaný MRS agar bez hmotnostního podílu octanu sodného. Z testovaných plísní se jako nejvíce citlivý jevil rod *Fusarium*. Yang a Chang (2010) zaznamenali schopnost kmene *Lacto-*

*bacillus plantarum* AF1 inhibovat růst plísní rodu *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum* a *Penicillium*. Demirba a kol. (2017) potvrdili antifungální účinek kmene *Lactobacillus paraplantarum* N-15 a *Lactobacillus paralimentarius* E-106 vůči plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium chrysogenum*.

### Antifungální aktivita bezbuněčných supernatantů

Je zřejmé, že během procesu pečení kvasového chleba dochází ke zničení živých buněk přítomných laktobacilů. Za antifungální aktivitu jsou poté zodpovědné antifungálně účinné metabolity. U vybraných kmenů laktobacilů byla tedy ověřována antifungální aktivita tepelně

ošetřených bezbuněčných supernatantů a zneutralizovaných supernatantů (pH 7,0) s cílem zjistit, zda je antifungální aktivita způsobena pouze tvorbou organických kyselin nebo i jiných látek. Výsledky měření (průměrné hodnoty radiálního růstu) jsou uvedeny v tabulkách IV a V.

Zneutralizované tepelně ošetřené bezbuněčné supernatanty měly u obou vybraných kmenů laktobacilů nižší antifungální aktivitu v porovnání s tepelně ošetřenými bezbuněčnými supernatanty, jejichž pH upraveno nebylo. Přesto i tyto zneutralizované supernatanty vykazovaly u kmene 583 potlačení růstu *F. culmorum* DMF301a u kmene 361 mírnou inhibici růstu *P. expansum* DMF04. Antifungální aktivita je zřejmě způsobena hlavně produkcí organických kyselin, ale z výsledků vyplývá, že oba kmeny mohou tvořit ještě další metabolity odpovědné za potlačení růstu plísní. V literatuře se hlavně studuje a uvádí antifungální aktivita organických kyselin. Gerez a kol. (2013) zjistili, že bezbuněčné supernatanty kmenů laktobacilů ztratily po neutralizaci antifungální aktivitu. De Muynck

**Tab. IV** Průměr kolonií [cm] plísně *F. culmorum* DMF301 v přítomnosti tepelně ošetřených bezbuněčných supernatantů a zneutralizovaných supernatantů

Kmen Den	361 (pH 3,7)	361 (pH 7,0)	583 (pH 3,9)	583 (pH 7,0)	Kontrola
3	1,14	2,67	1,50	2,37	2,51
5	1,62	4,25	2,14	3,09	4,11
7	2,18	5,52	2,70	3,99	5,27
10	2,91	7,38	3,52	4,99	7,23

**Tab. V** Průměr kolonií [cm] plísně *P. expansum* DMF04 v přítomnosti tepelně ošetřených bezbuněčných supernatantů a zneutralizovaných supernatantů

Kmen Den	361 (pH 3,7)	361 (pH 7,0)	583 (pH 3,9)	583 (pH 7,0)	Kontrola
3	0,63	0,78	0,39	1,10	0,89
5	0,62	0,99	0,42	1,36	1,28
7	0,75	1,14	0,45	1,59	1,53
10	0,96	1,41	0,47	1,80	1,64

**Tab. VI** Inhibice růstu [%] *F. culmorum* DMF301 rostoucími buňkami jednotlivých izolátů z kvasu vůči kontrolnímu stanovení

Izolát č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	65,9	72,1	45,0	38,2	73,2	16,8	27,1	38,2	25,4	22,9	11,8
5	76,4	79,4	56,5	49,8	79,6	17,9	39,6	51,0	34,6	35,3	14,9
7	81,0	83,3	61,1	54,8	83,9	24,6	46,6	56,9	41,5	41,3	24,4
10	85,9	87,2	61,9	55,8	88,0	29,3	51,7	60,9	46,5	46,2	28,1

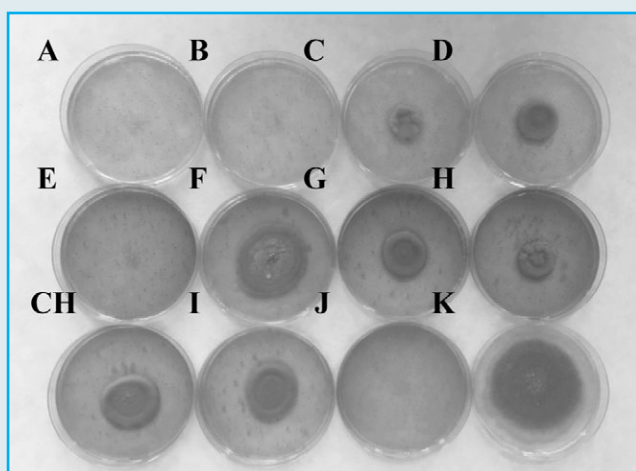
**Tab. VII** Inhibice růstu [%] *P. expansum* DMF04 rostoucími buňkami jednotlivých izolátů z kvasu vůči kontrolnímu stanovení

Izolát č.	4	8	9	10
3	100,0	100,0	100,0	100,0
5	100,0	100,0	100,0	25,1
7	65,3	100,0	58,5	36,1
10	71,1	82,5	60,9	41,6

a kol. (2004) zaznamenali, že kmeny náležící ke druhu *Penicillium paneum* a *P. roqueforti* jsou velmi citlivé na působení bezbuněčného supernatantu kmene *L. acidophilus* LMG9433. Dále prokázali, že po neutralizaci bezbuněčných supernatantů kmene *L. acidophilus* LMG9433, *L. amylovorus* DSM20532, *L. brevis* LMG6906 a *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* LMG9196 došlo ke ztrátě antifungálního účinku. Le Lay a kol. (2016) zaznamenali, že bezbuněčné supernatanty kmene *L. brevis* Lu35 a *L. citreum* L123 vykazovaly silnou inhibici růstu plísně *Aspergillus niger* UBOCC-A-112064 a *Penicillium corylophilum* UBOCC-A-112081.

### Antifungální aktivita nových kmenů bakterií mléčného kvašení izolovaných z kvasu

V další části práce bylo z připravených ječných kvasů vyizolováno 11 nových kmenů BMK. Cílem bylo získat nové izoláty s antifungální aktivitou pro případné použití při přípravě kvasů z ječné mouky. Pečivo s přídavkem ječné

**Obr. 2** Růst plísně *F. culmorum* DMF301 za přítomnosti živých buněk izolátů z kvasů po 6 dnech kultivace (A-J = izolát č. 1-11; K = kontrolní růst)

mouky a kvasu přináší spotřebitelům zvýšenou nutriční hodnotu např. v podobě vyššího obsahu  $\beta$ -glukanů.

U získaných 11 izolátů nejprve otestována antifungální aktivita s koncentrací buněk v médiu  $10^3$  KTJ·ml<sup>-1</sup>. Antifungální aktivita vyjádřená jako inhibice růstu plísní vůči kontrole [%] je uvedena v Tab. VI a VII. Na Obr. 2 je dokumentován růst plísně *F. culmorum* DMF301 v přítomnosti suspenze buněk izolátů po 6 dnech kultivace.

Z výsledků v Tab. VI je patrné, že největší inhibiční účinek vůči růstu plísně *F. culmorum* DMF301 vykazoval izolát č. 5, 2 a 1. V Tab. VII uvedeny hodnoty měření pouze pro izoláty, které měly menší inhibiční účinek, ostatní izoláty vykazovaly po celou dobu kultivace 100 % inhibiční aktivitu vůči růstu plísně *P. expansum* DMF04.

### Identifikace získaných izolátů z kvasu

Všechny izoláty získané z kvasu byly identifikovány jako grampozitivní, katalasa negativní bakterie. Vybrané kmeny s vysokou antifungální a růstovou aktivitou byly dále určeny

**Tab. VIII** Identifikace nových izolátů z ječných kvasů

Izolát č.	API test	MALDI-TOF	Kvas
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	nestanoveno	mouka Pro-Bio
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	nestanoveno	mouka Pro-Bio
3	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	mouka Pro-Bio
4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	mouka Perner
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	mouka Pro-Bio
7	nestanoveno	<i>Lactobacillus curvatus</i>	mouka Perner
8	nestanoveno	<i>Lactobacillus curvatus</i>	mouka Pro-Bio
9	nestanoveno	<i>Lactobacillus curvatus</i>	mouka Perner
10	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	mouka Perner

na úroveň druhu buď pomocí API® 50 CH testu nebo metodou MALDI-TOF. Všechny určované izoláty byly pomocí metody MALDI-TOF identifikovány s vysokým skóre (>2) jako *L. curvatus* (viz Tab. VIII). Jelikož získané kmeny *L. curvatus* vykazovaly dobrý růst i antifungální aktivitu, bylo by možné je použít jako doplňkovou kulturu pro přípravu kvasu.

V několika studiích byla popsána izolace kmenů bakterií *L. curvatus* a *Leuconostoc mesenteroides* z kvasu, např. Gerez a kol. (2013) otestovali antifungálně aktivní kmen *L. curvatus* 760. Ventimiglia a kol. (2015) potvrdili schopnost kmene *L. curvatus* PON100490 redukovat růst plísně *Alternaria alternata* Ra56. Demirba a kol. (2017) dospěli k závěru, že kmen *Leuconostoc pseudomesenteroides* N-13 nevykazoval schopnost inhibice růstu plísně *Aspergillus niger* a *Penicillium chrysogenum*. Dále zjistili, že z kvasu izolovaný *Leuconostoc mesenteroides* N-6 a *Lactobacillus curvatus* N-19 mají antifungální aktivitu vůči zmíněným plísním.

### Závěr

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že kmeny VT2 a CCDM 151, 181, 471, a 583 vykazovaly

vysokou inhibiční aktivitu vůči *F. culmorum* DMF301 i *P. expansum* DMF04. Plíseň *F. culmorum* DMF301 je k účinku laktobacilů citlivější. Antifungální aktivita je způsobena převážně tvorbou organických kyselin, ale mírnější aktivitu vykazovaly i tepelně ošetřené zneutralizované bezbuněčné supernatanty kmene 361 vůči *P. expansum* DMF04 a kmene 583 vůči *F. culmorum* DMF301. Po ověření růstové aktivity testovaných laktobacilů v prostředí kvasu lze tyto kmeny doporučit jako doplňkové kultury s antifungální aktivitou. Nově izolované kmeny BMK z připravených ječných kvasů byly převážně identifikovány jako *L. curvatus* s významnou aktivitou proti *P. expansum* DMF04; izoláty č. 1 a 2 určené jako *Leuconostoc mesenteroides* měly vysokou antifungální aktivitu vůči *F. culmorum* DMF301.

#### Poděkování:

Práce byla podpořena z grantu Ministerstva zemědělství ČR z programu Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 (KUS) "Vývoj nových plodin s cílem produkce potravinářských výrobků s vyšší výživovou hodnotou" QJ1610202.

#### Literatura

- DEMIRBAŞ F., ISPIRLI H., KURNAZ A. A., YILMAZ M. T., DERTLI E. (2017): Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *Food Sci. Technol.*, 79, s. 361-366.
- DE MUYNCK C., LEROY A. I. J., DE MAESENEIRE S., ARNAUT F., SOETAERT W., VANDAMME E. J. (2004): Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiol. Res.*, 159, s. 339-346.
- DE VUYST L., NEYSENS P. (2005): The sourdough microflora: biodiversity and metabolite interactions. *Trends Food Sci. Technol.*, 16, s. 43-56.
- DE VUYST L., VAN KERREBROECK S., HARTH H., HUYS G., DANIEL H. M., WECKX S. (2014): Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol.*, 37, s. 11-29.
- GALLE S., ARENDT E. K. (2014): Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54, s. 891-901.
- GÄNZLE M. G. (2014): Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiol.*, 37, s. 2-10.
- GÄNZLE M., RIPARI V. (2016): Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. *Int. J. Food Microbiol.*, 239, s. 19-25.
- GEREZ C. L., TORRES M. J., FONT DE VALDEZ G., ROLLÁN G. (2013): Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol. Control*, 64, s. 231-237.
- GÜL H., ÖZÇELİK S., SAĞDIÇ O., CERTEL M. (2005): Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochem.*, 40, s. 691-697.
- LE LAY C., MOUNIER J., VASSEUR V., WEILL A., LE BLAY G., BARBIER G. (2016): In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control*, 60, s. 247-255.
- ŠEDIVÝ P., ALBRECHT J. (2014): *Pekařská technologie II. výroba chleba*, Praha, Odborné nakladatelství a vydavatelství Pekař a cukrář, s. 22 - 25.
- STILES J., PENKAR S., PLOČKOVÁ M., CHUMCHALOVA J., BULLERMAN L. B. (2002): Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Prot.*, 65, s. 1188-1191.
- VENTIMIGLIA G., ALFONZO A., GALLUZZO P., CORONA O., FRANCESCA N., CARACAPPA S., MOSCHETTI G., SETTANNI L. (2015): Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiol.*, 51, s. 57-68.
- YANG E. J., CHANG H. C. (2010): Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.*, 139, s. 56-63.

#### Korespondenční autor:

Ing. Šárka Horáčková, CSc.  
Ústav mléka, tuků a kosmetiky  
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze  
Technická 5, 166 28 Praha 6  
e-mail: Sarka.Horackova@vscht.cz

Přijato do tisku: 11. 6. 2017

Lektorováno: 27. 6. 2017

## IMUNOMODULAČNÍ A PREBIOTICKÉ VLASTNOSTI DUNALIELLA SALINA

Hyršlová Ivana<sup>1</sup>, Smolová Jana<sup>1</sup>, Bártová Jiřina<sup>2</sup>,  
Staňková Barbora<sup>3</sup>

<sup>1</sup> VÚM s.r.o. Praha;

<sup>2</sup> Stomatologická klinika, VFN Praha;

<sup>3</sup> IV. Interní klinika, 1. LF UK, Praha

### Immunomodulation and prebiotic properties of *Dunaliella salina*

#### Abstrakt

V současnosti roste popularita využití pozitivních vlastností jednobuněčných řas pro aplikaci do celé řady potravinářských výrobků a doplňků stravy pro člověka i zvířata. Proto bylo cílem této práce rozšířit znalosti o prebiotických a imunomodulačních vlastnostech jednobuněčné řasy *Dunaliella salina* vyznačující se zvýšeným obsahem  $\beta$ -karotenu. Imunomodulační efekt *Dunaliella salina* byl porovnáván na základě produkce vybraných cytokinů lidskými mononukleárními buňkami po třídenní stimulaci stanovených pomocí multiplexové analýzy. Po stimulaci různými suspenzemi *Dunaliella salina* ve vodě (0,5 %, 1,0 %, 3,0 % w/v) došlo k výraznému zvýšení hladiny IL-6 a TNF- $\alpha$ . Prebiotický efekt *Dunaliella salina* byl hodnocen na základě růstu vybraného souboru probiotických mikroorganismů z rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Růst mikroorganismů byl porovnáván na základě počtů stanovených plotnovou metodou po 24h kultivaci v médiu s obsahem řasy. Při testování růstu vybraného souboru mikroorganismů nebyl zjištěn negativní vliv jednobuněčné řasy *Dunaliella salina* na jejich růst.

**Klíčová slova:** cytokiny, *dunaliella*, řasy, prebiotika, imunomodulace

#### Abstract

Nowadays, the popularity of using microalgae in food products and dietary supplements for human or animals increases due to their positive properties. The unicellular algae *Dunaliella salina* contains higher level of  $\beta$ -carotene