



ANTIFUNGÁLNÍ METABOLITY PRODUKOVANÉ RODEM *LACTOBACILLUS*

Horáčková Šárka¹, Kavková Miloslava², Veselá Kristina¹,
Sluková Marcela³

¹ Ústav mléka tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha, Technická 5

² VÚM, s.r.o., Ke Dvoru 12a, Praha 160 00

³ Ústav sacharidů a cereálií, VŠCHT Praha, Technická 5

Antifungal metabolites produced by *Lactobacillus* genus

Abstrakt

Plísně a kvasinky představují jednu ze zásadních skupin mikroorganismů způsobujících kažení potravin. Potlačení jejich růstu je možné pomocí různých chemických konzervantů, ale stále větší počet spotřebitelů vyhledává potraviny bez přídavných látek. Jednou z možností, jak zabránit růstu nežádoucí mikroflóry, je využít antimikrobiální potenciál bakterií mléčného kvašení, které se běžně používají ve výrobě potravin. Článek shrnuje základní poznatky o antifungálních metabolitech, které produkují zástupci rodu *Lactobacillus*. Hlavní pozornost je věnována účinku organických kyselin, které vznikají v průběhu glykolýzy (kyselina mléčná a octová), nebo hydroxylovaných mastných kyselin s delším řetězcem. Z nízkomolekulárních látek jsou jako významné antifungální metabolity popsány peroxid vodíku, diacetyl, reuterin nebo krátké a cyklické peptidy.

Klíčová slova: plísně, kvasinky, kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina fenylmléčná, reuterin, cyklické peptidy

Abstract

Fungi and yeasts are one of the essential groups of food spoilage microorganisms. Suppressing their growth is possible by chemical preservatives, but an increasing number of consumers are looking for food without

additives. One way how to prevent the growth of undesirable microflora is to exploit the antimicrobial potential of lactic acid bacteria commonly used in food production. The article summarizes the basic knowledge of antifungal metabolites produced by representatives of the genus *Lactobacillus*. The main attention is paid to the effect of organic acids formed during glycolysis (lactic and acetic acids) or hydroxylated fatty acids with longer chain. As low molecular weight substances - hydrogen peroxide, diacetyl, reuterin or short and cyclic peptides are described as important antifungal metabolites.

Key words: moulds, yeasts, lactic acid, acetic acid, phenyllactic acid, reuterin, cyclic peptides

Úvod

Mikroskopické houby – kvasinky a plísně – představují neoddělitelnou součást životního prostředí. Jejich působení může mít jak pozitivní, tak i negativní význam. Pozitivní význam spočívá v jejich rozsáhlém uplatnění v technologiích při výrobě potravin, léčiv, enzymů, organických kyselin, aminokyselin, polysacharidů apod. Na druhé straně způsobují tyto mikroorganismy znehodnocování potravin (viditelný růst na povrchu, změny barvy nebo textury, produkce metabolitů způsobujících vady chuti a vůně apod.) a negativně ovlivňují zdravotní nezávadnost potravin v důsledku možnosti produkce mykotoxinů (Pitt, Hocking, 2009; Ledenbach, Marshall, 2010). Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní nebilkovinné povahy, které jsou pro obratlovce toxické již při nízké koncentraci (Varsha, Nampoothiri, 2016).

Pro zabránění rozvoje kazící mikroflóry se v potravinářství používá řada metod, jako je snížení vodní aktivity, tepelné ošetření, aplikace konzervačních látek, modifikace atmosféry v obalech či skladování za nízkých teplot (Rico-Munoz a kol., 2019). Plísně jsou však schopné růstu i za nepříznivých podmínek. Osmofilní a xerofilní plísně prospívají při vyšších koncentracích cukru nebo soli v médiu, při nízkém obsahu dostupné vody a psychofilní jsou tolerantní dokonce k teplotám nižším než 0 °C. Pokud se dostanou do prostředí s nedostatečným množstvím živin, snižuje se metabolická aktivita jejich buněk (Dijksterhuis, 2017). Řada

izolátů plísní z průmyslového prostředí vykazuje také rezistenci vůči sanitacím prostředkům a konzervantům. Z tohoto pohledu se jeví aplikace antifungálně účinných kultur jako slibná strategie k prodloužení trvanlivosti výrobků, která zároveň napomáhá ke snížení obsahu chemických aditiv a konzervačních látek. Bylo potvrzeno, že řada kmenů ze skupiny bakterií mléčného kvašení (BMK) produkuje rozsáhlou škálu antimikrobiálních sloučenin, včetně látek s významnou antifungální aktivitou (Crowley a kol., 2013). Mezi BMK je jedním z nejlépe prostudovaných producentů antifungálních metabolitů rod *Lactobacillus*. Jedná se o grampozitivní, nesporulující, katalasa negativní a mikroaerofilní mikroorganismy, které se uplatňují v řadě potravinářských technologií (Curry, Crow, 2003).

Antifungální metabolity rodu *Lactobacillus*

Organické kyseliny

Při fermentaci sacharidů bakteriemi rodu *Lactobacillus* vzniká jakožto hlavní produkt kyselina mléčná, u heterofermentativních kmenů pak v relativně velkém množství také kyselina octová a ve stopovém množství kyselina propionová. Právě tyto organické kyseliny jsou považovány za hlavní antifungální metabolity (Peláez a kol., 2012). Mechanismus působení organických kyselin spočívá v okyselení cytoplasmy. Jejich účinek je výrazně vyšší v kyselém prostředí, neboť se za těchto podmínek vyskytují v nedisociovaném stavu. Nedisociované formy kyselin vzhledem k hydrofobnímu charakteru difundují přes buněčnou membránu a poté uvnitř buňky disociují. Uvolněním H^+ iontů nastane okyselení cytoplasmy a zastavení metabolických aktivit. Následně dochází k selhání protonmotivní síly v cytoplasmatické membráně (Reis a kol., 2012). Bylo zjištěno, že minimální inhibiční koncentrace kyseliny mléčné a kyseliny octové vůči zástupcům rodu *Aspergillus* a *Penicillium* je vyšší, než koncentrace, kterou BMK vytvářejí (tj. 44,8-76,8 mmol/l, resp. 1,2-7,5 mmol/l), což naznačuje, že jejich antifungální účinek je dán především jejich synergickým působením (Aunsbjerg a kol., 2015). Také kyselina propionová interaguje s buněčnými membránami a neutralizuje elektrochemický protonový gradient, ale její vliv je často závislý právě na snížení pH kyselinou mléčnou. Tato kyselina redukuje růst plísní zvláště při pH nižším než 4,5 a rovněž inhibuje vychytávání aminokyselin. Stejný efekt na kvasinky a plísně vykazují propionát sodný a propionát amonný při nízkém pH (Schnürer, Magnusson, 2005).

V roce 2000 byla publikována práce o antifungálním účinku kyseliny fenylmléčné a 4-hydroxyfenylmléčné produkované kmenem *Lactobacillus plantarum* 21B (Lavermicocca a kol., 2000). Tyto metabolity vznikají z aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu. Za pomoci nespecifické aminotransferasy vzniká při transaminaci fenylalaninu fenylpyruvát, který je následně redukován na fenyllaktát s širokým spektrem působení proti *Penicil-*

lium spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Eurotium* spp. (Lavermicocca a kol., 2000; Gerez a kol., 2013).

Organické kyseliny a hydroxy-kyseliny s delším řetězcem

Mezi kmenově specifickou vlastností některých laktobacilů patří také konverze volných mastných kyselin na antifungálně aktivní hydroxy-mastné kyseliny. Cílem jejich působení je buněčná membrána, specifické enzymy a metabolické procesy zapojené do syntézy mastných kyselin. Největší inhibiční účinek na růst plísní vykazují mastné kyseliny o dvanácti a více uhlících (Dalié a kol., 2010). Byla publikována celá řada prací prokazující antifungální aktivitu hydroxy-kyselin (2-hydroxyisokapronová, 5-osododekanová, 3-hydroxydekanová, 3-hydroxy-5-dodecenová), nasycených mastných kyselin (kapronová, palmitová, stearová) i nenasycených mastných kyselin (olejová, linolová) produkovaných druhů *L. plantarum*, *L. reuteri* nebo *L. sanfranciscensis* (Dalié a kol., 2010; Sangmanee a Hongpattarakere, 2014; Ryu a kol., 2014).

Nízkomolekulární látky

V současné době je známo, že vedle organických kyselin vytvářejí laktobacily řadu dalších sekundárních metabolitů s antifungální aktivitou, jako jsou bílkovinné sloučeniny a řada nízkomolekulárních látek. Za přítomnosti kyslíku tvoří většina BMK peroxid vodíku. Samy BMK nemají schopnost degradace této antimikrobiální a antifungální látky. V důsledku toho dochází k jeho akumulaci v prostředí, což může mít za následek oxidaci lipidové membrány a buněčných proteinů cílových mikroorganismů, jelikož se jedná o silné oxidační činidlo. Antimikrobiální účinek peroxidu vodíku v neletálním množství je připisován jeho reakci s thiokyanátem, kterou katalyzuje enzym laktoperoxidasa. Minimální inhibiční koncentrace peroxidu vodíku např. vůči růstu plísně *P. expansum* je méně než 0,025 % (Schnürer a Magnusson, 2005; Dalié a kol., 2010).

Během fermentace citrátů vytvářejí některé kmeny BMK diacetyl (2,3-butandion). Jeho maximální koncentrace se získá s prodlouženou dobou fermentace a při pH nižším než 5. Jedná se o těžkovou sloučeninu, proto může během technologických operací docházet k jeho ztrátám. Mechanismus působení diacetylu na růst plísní nebyl doposud objasněn, nicméně byla prokázána jeho aktivita vůči zástupcům rodu *Penicillium* (Aunsbjerg a kol., 2015).

Další nízkomolekulární látkou s prokázanou aktivitou vůči plísním rodu *Aspergillus* a *Fusarium* je reuterin (1,3-propandiol), který vzniká při anaerobním metabolismu glycerolu za přítomnosti kobalaminu. Dříve byla produkce této látky připisována pouze druhu *L. reuteri*, ale dnes je známo, že jej produkují i *L. brevis*, *L. collinoides*, *L. coryniformis* nebo *L. buchneri* (Dalié a kol., 2010). Reuterin se může vyskytovat ve třech formách jako 3-hydroxypropanal, dimer a hydrát hydroxypro-

panalu. Antimikrobiální aktivita reuterinu je připisována přítomné aldehydové skupině a spočívá ve vyčerpání volných sulfhydrylových skupin v malých molekulách a proteinech, což má za následek nerovnováhu redoxního stavu buňky. Je známo, že reuterin způsobuje v cílové buňce potlačení ribonukleasové aktivity, jakožto významného enzymu podílejícího se na biosyntéze DNA (Ávila a kol., 2014).

Zajímavé výsledky byly publikovány ohledně aktivity krátkých peptidů a cyklických dipeptidů, které jsou produkovány řadou laktobacilů a které nevykazují antibakteriální aktivitu, ale pouze antifungální. Jejich produkce byla potvrzena u kmenů *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. coryniformis* apod. Jako citlivé se jevíly opět plísň z rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* či kvasinka *Candida albicans*. Otestován byl antifungální účinek cyklických peptidů cyklo(L-Val-L-Pro), cyklo(Gly-L-Leu), cyklo(L-Phe-L-Pro) a cyklo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) (Ström a kol., 2002; Kwak a kol., 2014; Axel a kol., 2015; Luz a kol., 2017).

Obecně lze shrnout, že tvorba antifungálních sloučenin závisí na metabolické aktivitě BMK – na pH kultivačního média, době a teplotě kultivace, přítomnosti nutričních faktorů a odvíjí se jak od indikátorového kmene, tak od složení média. Stimulaci tvorby antifungálních látek lze podpořit optimalizací růstového media. Zvýšení koncentrace glukosy a kvasničného extraktu o 1-2 % nebo přidavek chloridu sodného a chloridu vápenatého do média vedl např. ke zvýšení tvorby antifungálních látek u *L. rhamnosus* a *Pediococcus acidilactici* (Effat a kol., 2001). Stejného efektu bylo dosaženo po přidavku některých alkoholických cukrů do média pro kultivaci laktobacilů pro podpoření účinku vůči plísním *Alternaria* spp., *Aspergillus niger*, *Fusarium latenicum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor hiemalis* a kvasince *Candida vini* (Lipińska a kol., 2016).

Závěr

Z výše uvedených poznatků plyne, že rod *Lactobacillus* je významným producentem antifungálně účinných metabolitů. Těto vlastnosti lze využít pro prodloužení doby trvanlivosti a zajištění nezávadnosti řady výrobků, při jejichž výrobě se laktobacily běžně používají, jako jsou fermentované mléčné výrobky a sýry nebo kvasové chleby.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MZe ČR NAZV QK1910036.

Literatura

Aunsbjerg S.D., Honoré A.H., Marcussen J., Ebrahimi P., Vogensen F.K., Benfeldt C., Skov T., Knøchel S. (2015): Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.* 194, s. 46-53.

Ávila M., Gómez-Torres N., Hernández M., Garde S. (2014): Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spore of dairy-related *Clostridium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 172, s. 70-75.

- Axel C., Röcker B., Brosnan B., Zannini E., Furey A., Coffey A., Arendt E.K. (2015): Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiol.* 47, s. 36-44.
- Crowley S., Mahony J., van Sinderen D. (2013): Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci Tech.* 33, s.93-109.
- Curry B., Crow V. (2003): General Characteristics. V knize: *Encyclopedia of dairy science* (Roginski H., ed.), sv. III, Academic Press, Londýn, s. 1479.
- Dalié D. K. D., Deschamps A. M., Richard-Forget F. (2010): Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins. *Food Control* 21, s. 370-380.
- Dijksterhuis J. (2017): The fungal spore and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, s. 68-74.
- Effat B. A., Ibrahim G. A., Tawfik N. F., Sharaf O. M. (2001): Comparison of antifungal activity of metabolites from *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* and *Propionibacterium thoenii*. *Egypt. J. Dairy Sci.* 29, s. 251-262.
- 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.
- Kwak M.K., Liu R., Kim M.K., Moon D., Kim A.H., Song S.H., Kang S.O. (2014): Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi. *J. Microbiol.* 52, s. 64-70.
- Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M (2000): Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, s. 4084-4090.
- Ledenbach L.H., Marshall R.T. (2010): Microbiological spoilage of dairy products. In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety*; Sperber, W.H., Doyle, M.P., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2010; s. 41-67, ISBN 1441908269.
- Lipińska L., Klewicki R., Klewicka E., Kolodziejczyk K., Sójka M., Nowak A. (2016): Antifungal activity of *Lactobacillus* sp. bacteria in the presence of xylitol and galactosyl-xylitol. *Biomed. Res. Int.* 5897486.
- Luz C., Saladino F., Luciano F.B., Manes J., Meca G. (2017): *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT - Food Sci. Technol.* 81, s. 128-135.
- Peláez A.M.L., Catano C.A.S., Yepes E.A.Q., Villarroela R.R.G., De Antoni G.L.D., Giannuzzi L. (2012): Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control* 24, s. 177-183.
- Pitt J.I., Hocking A.D. (2009): *Fungi and Food Spoilage*, 3rd ed.; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2009; s. 1-2, ISBN 978-1-4615-6391-4.
- Rico-Munoz E., Samson R.A., Houbaken J. (2019): Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiol.* 81, s. 51-62.
- Ryu E.H., Yang E.J., Woo E.R., Chang H.C. (2014): Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiol.* 41, s. 19-26.
- Sangmanee P., Hongpattarakere T. (2014): 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* 40, s. 224-233.
- Schnürer J., Magnusson J. (2005): Antifungal lactic acid bacteria as bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16, s. 70-78.
- Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. (2002): *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.* 68, s. 4322-4327.

Korespondující autor: Ing. Šárka Horáčková, CSc.

Ústav mléka tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha,

Technická 5, 166 28 Praha 6,

e-mail: Sarka.Horackova@vscht.cz

Přijato do tisku: 17. 7. 2019

Lektorováno: 25. 7. 2019