

Dr inż. Anna SZOSLAND-FALTYN
 Dr Joanna KRÓLASIK
 Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
 im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie
 Zakład Jakości Żywności w Łodzi

ZASTOSOWANIE BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ DO KONTROLI WZROSTU PLEŚNI TOKSYNOTWÓRCZYCH ORAZ USUWANIA MIKOTOKSYN Z PRODUKTÓW MLECZNYCH®

Application of lactic acid bacteria for control of mould growth and removal of mycotoxins from dairy products®

Obecność mikotoksynotwórczych grzybów pleśniowych w żywności stanowi poważny problem, nie tylko z punktu widzenia bezpieczeństwa zdrowotnego, ale również ze względów ekonomicznych. Opracowanie skutecznego sposobu kontroli poziomu pleśni oraz ich mikotoksyn jest od wielu lat przedmiotem licznych badań naukowych. Stosowane techniki chemiczne i fizyczne, nie są w pełni efektywne, dlatego duże nadzieje pokłada się w metodach biologicznych. Wśród nich, coraz większe zainteresowanie budzi wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej. Odpowiednio wyselekcjonowane szczepy bakteryjne mają zdolność hamowania wzrostu pleśni oraz tworzenia przez nie mikotoksyn, a ponadto detoksyfikacji środowiska z mikotoksyn.

Presence of mycotoxigenic fungi in food is a serious problem, not only from the point of view of health security, but also for economic reasons. Develop an effective way to control mold growth and mycotoxins for many years is the subject of numerous scientific studies. The chemical and physical techniques used are not fully effective, which is why big hopes for the bioassays. Among them, more and more interest is the use of lactic acid bacteria. Appropriately selected bacterial strains have the ability to inhibit the growth of molds and mycotoxins formation, and further environmental detoxification of mycotoxins.

WPROWADZENIE

Skażenie mikotoksynotwórczymi pleśniami jest jedną z ważniejszych przyczyn psucia się żywności oraz pasz i pociąga za sobą duże straty ekonomiczne, a także stwarza poważne zagrożenie zdrowotne dla ludzi i zwierząt. Z danych przytoczonych przez Muñoz i wsp. [17] wynika, że od 5 do 10% światowej produkcji żywności marnuje się z powodu zanieczyszczenia pleśniami. Ponadto, co roku w europejskim systemie wczesnego ostrzegania o niebezpiecznej żywności i paszach [z ang. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)] odnotowuje się kilkaset potwierdzonych przypadków zgłoszeń występowania mikotoksyn w żywności i paszach (Tabela 1).

Ze względu na konsumentów, oczekujących żywności zdrowej, mało przetworzonej, ale przede wszystkim mikrobiologicznie bezpiecznej, poszukuje się alternatywnych metod, biologicznych wykorzystujących korzystne dla organizmu gospodarza mikroorganizmy.

Celem artykułu jest przybliżenie pojęcia mikotoksyn oraz przedstawienie aktualnego przeglądu literatury dotyczącej zastosowania bakterii fermentacji mlekowej do kontroli wzrostu pleśni toksynotwórczych oraz usuwania mikotoksyn szczególnie z produktów mleczarskich.

Tabela 1. Potwierdzone przypadki zgłoszeń występowania mikotoksyn w żywności i paszach

Table 1. Reported incidences of mycotoxins in food and feed

Mikotoksyny <i>Mycotoxins</i>	Rok / Year				
	2009	2010	2011	2012	2013
aflatoksyny	638	649	585	484	341
ochratoksyna A	27	34	35	32	54
patulina	–	–	–	–	–
fumonizyny	1	3	4	4	7
zearalenon	–	–	–	4	–
deoksynowalenol	3	2	11	4	8
ogółem	669	688	635	528	410

Źródło: Annual Report. 2013 [3]

WYJAŚNIENIE POJĘCIA

Termin mikotoksyna pochodzi z połączenia dwóch słów: greckiego *mycos* oznaczającego – pleśń i łacińskiego *toxicum* – trucizna. Szkodliwe dla ludzi i zwierząt, mikotoksyny są niskocząsteczkowymi drugorzędowymi metabolitami pleśni, kumulowanymi w grzybni i konidiach lub wydzielanymi do środowiska. Z mleka i jego przetworów najczęściej izolowanymi gatunkami pleśni są: *Geotrichum*, *Aspergillus*,

Mucor, Fusarium, Penicillium, Moniliella, Byssoschlamys, Alternaria, Cladosporium, Eurotium, Trichodrema [6, 12, 13, 25]. Niektóre z tych gatunków mogą produkować różne rodzaje mikotoksyn, inne wytwarzają jedynie toksyny specyficzne dla siebie. W mleku i jego przetworach mikotoksyny mogą występować z dwóch powodów. Pierwszym jest skarmianie krów paszą skażoną miko toksynami, drugim zamierzone lub przypadkowe zanieczyszczenie pleśniami wytwarzającymi mikotoksyny [12].

Do mikotoksyn, które najczęściej spotyka się w mleku i jego przetworach należą: aflatoksyny, fumonizyna, deoksynowalenol, ochratoksyna A, patulina, zearalenon [19, 22, 29].

Pomimo, że badania nad mikotoksynami rozpoczęły się już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku, ich rola nadal pozostaje dla badaczy tajemnicą. Najprawdopodobniej wytwarzane są w obronie przed roślinami, zwierzętami oraz innymi gatunkami grzybów.

Spożycie wraz z produktami toksyn pleśni może doprowadzić do mikotoksykozy, którą jest ostre lub chroniczne zatrucie, wynikające z przyjmowania małych dawek mikotoksyn przez dłuższy czas. Ze względu na wielokierunkowe działanie toksyn w czasie mikotoksykozy może dojść do uszkodzenia nerek, wątroby, zakłóceń w pracy przewodu pokarmowego oraz układu immunologicznego, a także porażenia układu nerwowego i krwiotwórczego.

Najczęściej stosowanymi technikami do inhibicji wzrostu pleśni, w mlecznych produktach, są pasteryzacja oraz pakowanie w atmosferze ochronnej. Jednak, ze względu na trudność w doborze odpowiedniej kompozycji gazów oraz coraz częściej występujące zjawisko nabywania przez drobnoustroje oporności, techniki te nie są w pełni efektywne [6]. Przykładem, opornych na wysokie temperatury pleśni, są powszechnie występujące w przyrodzie, a wyizolowane z margaryny *Aspergillus fumigatus* i *Paecilomyces variotii*. Poprzez wytwarzanie ciepłoopornych askospor i chlamydo-spor, odpowiedzialne są one za psucie produktów, zwłaszcza pasteryzowanych. *Aspergillus fumigatus* przeżywa 60 minutowe ogrzewanie w 80°C [11]. Dlatego też, coraz większe zainteresowanie w kontroli rozwoju pleśni mikotoksynotwórczych oraz detoksyfikacji z mikotoksyn znajdują biologiczne metody, między innymi, z wykorzystaniem bakterii fermentacji mlekowej. Obok ich prozdrowotnych właściwości, dzięki którym przywracana jest równowaga drobnoustrojów w organizmie gospodarza, bakterie te mogą bezpośrednio oddziaływać na grzyby pleśniowe, a także wpływać na ich szkodliwe produkty metabolizmu inhibując biosyntezę mikotoksyn lub wiążąc je w ścianie komórkowej [7, 18].

KONTROLA WZROSTU PLEŚNI MIKOTOKSYNOTWÓRCZYCH PRZEZ BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ

Odpowiednio wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej, mogą rozwiązać problem grzybów toksynotwórczych w żywności. Dotyczy to głównie produktów mlecznych, które stanowią znakomity nośnik dla tych mikroorganizmów (Tabela 2). Antypleśniowa aktywność bakterii mlekowych przejawia się poprzez hamowanie tworzenia i kiełkowania zarodników oraz rozwoju plechy. Do

najczęściej wymienianych w literaturze związków, produkowanych przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej, a inhibujących wzrost grzybów pleśniowych należą: kwasy organiczne (mlekowy, octowy, propionowy, masłowy), nadtlenuk wodoru oraz bakteriocyny (nizyna, reuteryna, pediocyna, laktacyna, enterocyna). Wraz z postępem technik analitycznych odkrywa się nowe produkty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej, którym przypisuje się inhibujące działanie. Są to najczęściej substancje o niskiej masie molekularnej, syntetyzowane w niewielkiej ilości, przez co trudno jest je zidentyfikować dostępnymi metodami. Ostatnio inhibujące działanie przypisuje się kwasom karboksylowym (stearynowy, benzoesowy, kapronowy, salicyłowy, wanilinowy, D-glukuronowy, hydrocynamonowy, azealinowy), kwasom fenylomlekowym oraz cyklicznym dipeptydom (2,5-dioksy-piperazy) [5, 16, 28]. Związki te produkowane są przez szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*.

Tabela 2. Antypleśniowa aktywność bakterii fermentacji mlekowej w mleku i jego przetworach

Table 2. Antifungal activity of lactic acid bacteria in milk and dairy products

Bakterie o aktywności antypleśniowej Bacteria with antifungal activity	Spektrum aktywności Spectrum of activity	Produkt Product	Źródło Referencjes
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> SM20	<i>Penicillium</i> sp.	surowe mleko	[21]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Penicillium solitum</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>	ser twarogowy	[6]
<i>Lactobacillus harbinensis</i> K.V9.3.1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	jogurt	[8]
<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 19280	<i>Penicillium expansum</i>	ser Cheddar	[14]
<i>Lactobacillus fermentum</i> Te007	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>	żółty ser	[16]
<i>Pediococcus pentosaceus</i> Te010			
<i>Lactobacillus pentosus</i> G004			
<i>Lactobacillus paracasi</i> D5			
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Aspergillus niger</i>	dip serowy	[24]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR1524			
<i>Lactobacillus brevis</i> KR3	<i>Penicillium claviforme</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus niger</i>	"katak" jogurt butgarski	[26]
<i>Lactobacillus brevis</i> KR4			
<i>Lactobacillus brevis</i> KR51			
<i>Lactobacillus plantarum</i> IMAU 10014	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium citrinum</i>	kumys	[27]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDC 291	<i>Alternaria alternata</i>	"paneer" indyjski ser	[10]
<i>Lactobacillus curvatus</i> A61	<i>Cladosporium</i> and <i>Fusarium</i> ssp.	azerski ser	[2]

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA ANTYPLEŚNIOWĄ AKTYWNOŚĆ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ

Do najważniejszych czynników wpływających na syntezę substancji o właściwościach antypleśniowych należą temperatura, czas inkubacji, pH, medium hodowlane, jak również rodzaj produktu [7, 16]. Reddy i Ranganathan [20] wykazali, że najwyższe stężenie metabolitów antypleśniowych w hodowlach *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* odnotowywane było po trzech i czterech dniach inkubacji w temperaturze 25°C przy pH 6,8. Podobne wyniki otrzymała Bianchini [4]. Wynikało z nich że szczepy *Lactobacillus plantarum* efektywniej syntetyzowały substancje antypleśniowe (kwas mlekowy, octowy, pirogronowy, piroglutaminowy, fenylomlekowy) w hodowlach prowadzonych w zakresie temperatur 30-35°C, przy pH 7, z mieszaniem oraz saturacją do 10% stężenia tlenu niż w hodowlach statycznych, których pH wynosiło 4. Dowiedziono ponadto, że na efektywność syntezy metabolitów antypleśniowych ma wpływ medium hodowlane, przy czym najlepszym jest bulion Ellikera. Również dodatek niektórych substancji odżywczych, takich jak ekstrakt drożdżowy, glukoza, chlorek sodu i wapnia do hodowli wzmacnia produkcję metabolitów antypleśniowych, podczas gdy ksyloza czy hydrolizat kazeiny wykazują odwrotny efekt [7]. Muhiaddin i wsp. [16] wykazali, że równie istotnym czynnikiem jest rodzaj produktu. Szczepy *Lactobacillus paracasei* D5 i *Pediococcus pentosaceus* Te010 odznaczały się wyższą aktywnością antypleśniową w chlebie niż np. w pulpie pomidorowej.

DETOKSYKACJA MIKOTOKSYN PRZEZ BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ

W literaturze opisywane są dwa mechanizmy działania bakterii fermentacji mlekowej, prowadzące do detoksykacji mikotoksyn ze środowiska. Pierwszy z nich, to inhibicja biosyntezy mikotoksyn poprzez uwalnianie specyficznych antymikotoksynotwórczych metabolitów. Metabolity te, produkowane głównie przez szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, są ciepłoopornymi związkami, o niskiej masie molekularnej wykazującymi aktywność w stosunku do aflatoksyn [7, 18]. Drugim z mechanizmów jest wiązanie mikotoksyn w ścianie komórkowej bakterii fermentacji mlekowej. Zjawisko to wykazują zarówno żywe jak i martwe komórki bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, w stosunku do mikotoksyn takich jak: aflatoksyny, ochratoksyn A, trichoteceny. Siła wiązania mikotoksyn z bakteryjną ścianą komórkową jest uzależniona od warunków środowiska oraz od szczepu, a szczególnie od budowy jego ściany komórkowej [7, 9, 15, 18, 23]. Z badań prowadzonych przez Abbès i wsp. [1] wynika, że szczepy *Lactobacillus plantarum* MON03 i *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 (wyizolowane z tunezyjskiego masła wytwarzanego rzemieślniczo) trwale wiązały aflatoksynę M1 zarówno w roztworze buforu fosforanowego jak i w mleku, przy czym zdolność wiązania toksyny wynosiła odpowiednio 16,1-78,6% i 15,3-95,1%. Szczep *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 wykazywał większy potencjał wiązania aflatoksyn niż *Lactobacillus plantarum* MON03 [1].

PODSUMOWANIE

1. Naturalnie obecne lub celowo dodawane do produktów mlecznych, szczepy bakterii fermentacji mlekowej chronią produkt przed rozwojem grzybów toksynotwórczych i pomagają w usuwaniu mikotoksyn z produktów.
2. Wydaje się, że jest to kierunek badań stwarzający duże możliwości w opracowywaniu żywności bezpiecznej zdrowotnie.
3. Ze względu na szczepozależny efekt aktywności antypleśniowej tych bakterii oraz bardzo dużą liczbę, trudnych do zidentyfikowania, związków wykazujących antypleśniowe działanie, konieczne jest prowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

LITERATURA

- [1] **ABBÈS S. J. B., SHARAFI H., JEBALI R., NOGHABI K. A., OUESLATI R. 2013.** Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM1 in vitro and to counteract AFM1 immunotoxicity in vivo. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 279-286.
- [2] **AHMADOVA A., TODOROV S. D., HADJI-SFAXI I., CHOISET Y., RABESONA H., MESSAOUDI S., KULIYEV A., GOMBOSSY DE MELO FRANCO B. D., CHOBERT J.-M., HAERTLÉ T. 2013.** Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*, 20, 42-49.
- [3] **ANNUAL REPORT. 2013.** *Rapid Alert System for Food and Feed*. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014.
- [4] **BIANCHINI A. 2010.** Antifungal activity of lactic acid bacteria: Factors affecting production and stability of antifungal compounds of *Lactobacillus plantarum*, and effects of the antifungal compounds on growth and aflatoxin production by *Aspergillus* spp. ETD collection for University of Nebraska-Lincoln. Paper AAI3398388.
- [5] **BROSNAN B., COFFEY A., ARENDT E. K., FUREY A. 2012.** Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 2983-2995.
- [6] **CHEONG E. Y. L., SANDHU A., JAYABALAN J., THU THI KIEU LE, NGUYEN THI NHI-EP, HUONG THI MY HO, ZWIELEHNER J., BANSAL N., TURNER M. S. 2014.** Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97.
- [7] **DALIÉ D. K. D., DESCHAMPS A. M., RICHARD-FORGET F. 2010.** Lactic acid bacteria-Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21, 370-380.
- [8] **DELAVENNE E., CLIQUET S., TRUNET C., BARBIER G., MOUNIER J., LE BLAY G. 2014.** Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus*

- K.C8.3. *II in yogurt*. Food Microbiology, In Press, Corrected Proof, Available online 10 May 2014.
- [9] **ELSANHOTY R. M., SALAM S. A., FAWZY R. M., BADR F. H. 2014.** *Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria*. Food Control, 43, 129-134.
- [10] **GARCHA S., NATT N. K. 2012.** *In situ control of food spoilage fungus using Lactobacillus acidophilus NCDC 291*. Journal of Food Science and Technology, 49(5), 643-648.
- [11] **GUMUS T., DEMIRCI A. S., SAGDIC O., ARIC M. 2010.** *Inhibition of heat resistant molds: Aspergillus fumigatus and Paecilomyces variotii by some plant essential oils*. Food Science and Biotechnology, 19(5), 1241-1244.
- [12] **KHALIFA M. I., AL-ASHMAWY M. A., ABDEL-KHALIK A., EL-SHERBINI M. 2013.** *Mycological evaluation of serving some dairy products with special reference to mycotoxins production in Azhar University student hostels*. World Journal of Dairy Food Science, 8(2), 165-170.
- [13] **LIU S.-Q., TSAO M. 2009.** *Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast Debaryomyces hansenii in yoghurt and cheese at elevated temperatures*. Food Control, 20, 852-855.
- [14] **LYNCH K. M., PAWLOWSKA A. M., BROSNAN B., COFFEY A., ZANNINI E., FUREY A. MCSWEENEY P. L. H., WATERS D. M., AREND E. K. 2014.** *Application of Lactobacillus amylovorus as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese*. International Dairy Journal, 34, 167-173.
- [15] **MECHOUD M. A., JUAREZ G. E., DE VALDEZ G. F., RODRIGUEZ A. V. 2012.** *Lactobacillus reuteri CRL 1098 and Lactobacillus acidophilus CRL 1014 differently reduce in vitro immunotoxic effect induced by Ochratoxin A*. Food and Chemical Toxicology, 50(12), 4310-4315.
- [16] **MUHIALDIN B. J., HASSAN Z., SADON S. K. 2011.** *Antifungal activity of Lactobacillus fermentum Te 007, Pediococcus pentosaceus Te010, Lactobacillus pentosus G004, and L. paracasi D5 on selected foods*. Journal of Food Science, 76(7), 493-499.
- [17] **MUÑOZ R., ARENA M. E., SILVA J., GONZÁLEZ S. N. 2010.** *Inhibition of mycotoxin-producing Aspergillus nomius VSC 23 by lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian Journal of Microbiology, 41, 1019-1026.
- [18] **OLIVEIRA P., BROSNAN B., FUREY A., COFFEY A., ZANNINI E., ARENDT E. K. 2014.** *Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: strain characterization and identification of antifungal compounds*. Food Control In Press, Accepted Manuscript, Available online 9 July 2014.
- [19] **PATTONO D., GALLO P. F., CIVERA T. 2011.** *Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms*. Food Chemistry, 127, 374 - 377.
- [20] **REDDY N. S., RANGANATHAN B. 1985.** *Effect of time, temperature and pH on the growth and production of antimicrobial substance by Streptococcus lactis ssp diacetylactis S1-67-C*. Milchwissenschaft, 40, 346-348.
- [21] **SCHWENNINGER S. M., VON AH U., NIEDERER B., TEUBER M., MEILE L. 2005.** *Detection of antifungal properties in Lactobacillus paracasei subsp. paracasei SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains*. Journal of Food Protection, 68, 111-119.
- [22] **SENGUN I., YAMAN D., GONUL S. 2008.** *Mycotoxins and mould contamination in cheese*. World Mycotoxin Journal, 3, 291-298.
- [23] **SERRANO-NIÑO J. C., CAVAZOS-GARDUÑO A., HERNANDEZ-MENDOZA A., APLEGATE B., FERRUZZI M. G., SAN MARTIN-GONZÁLEZ M. F., GARCÍA H. S. 2013.** *Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model*. Food Control, 31, 202-207.
- [24] **THARMARAJ N., SHAH N. P. 2009.** *Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and moulds in cheese-based dips*. International Journal of Food Science and Technology, 44, 1916-1926.
- [25] **TORKAR G. K., VENGUST A. 2008.** *The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia*. Food Control, 19, 570-577.
- [26] **TROPICHEVA R., NIKOLOVA D., EVSTATIEVA Y., DANOVA S. 2014.** *Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product "katak"*. Anaerobe, 28, 78 - 84.
- [27] **WANG H., YAN Y., WANG J., ZHANG H., QI W. 2012.** *Production and characterization of antifungal compounds produced by Lactobacillus plantarum IMAU10014*. PLoS ONE, 7(1), 1.
- [28] **VARSHA K. K., PRIYA S., DEVENDRA L., NAMPOOTHIRI K. M. 2014.** *Control of spoilage fungi by protective lactic acid bacteria displaying probiotic properties*. Applied Biochemistry and Biotechnology 173, 3402-3413.
- [29] **YIANNIKOURIS A., JOUANY J. P. 2002.** *Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review*. Animal Research, 51, 81-89.