

**CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH CECH  
SZCZEPÓW BAKTERII Z RODZAJU *LACTOBACILLUS*  
O AKTYWNOŚCI ANTYMIKOTOKSYNOWEJ**

**Agata U. Kapturowska, Krystyna J. Zielińska,**

**Krystyna M. Stecka, Marta P. Kupryś**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego,

Zakład Technologii Fermentacji,

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa,

agata.kapturowska@ibprs.pl

**Streszczenie**

Przedmiotem pracy była ocena przydatności do produkcji preparatów bakteryjnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* cechujących się zdolnością do hamowania rozwoju pleśni oraz obniżania zawartości ochratoxyny A i aflatoxyny B<sub>1</sub> w kiszonych paszach. Badano wpływ źródła węgla w podłożu na dynamikę syntezy kwasu mlekowego i octowego. Oceniano również plon biomasy uzyskany w wyniku hodowli w podłożu stosowanym w produkcji preparatów bakterii fermentacji mlekowej. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w wyniku 72 h hodowli szczepów *L. fermentum* N KKP 2020 i *L. plantarum* S KKP 880, w podłożu zawierającym glukozę lub sacharozę, zawartość kwasu mlekowego wynosiła od 5,28 do 7,49 g/dm<sup>3</sup>. Wyżej wymienione szczepy cechowały się zdolnością do fermentacji D-ksylozy oraz L-arabinozy. Plon biomasy badanych szczepów bakterii wahał się od 9,34 do 9,60 g/dm<sup>3</sup> podłoża i był porównywalny z plonem biomasy szczepów bakterii fermentacji mlekowej stosowanych w produkcji preparatów bakteryjnych.

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus*, synteza kwasów organicznych, plon biomasy

**CHARACTERISTIC OF SELECTED FEATURES  
OF BACTERIAL STRAINS FROM GENUS *LACTOBACILLUS*  
WITH ANTIMICOTOXIGENIC ACTIVITY**

**Summary**

The subject of this study was to evaluate the technological utility for bacterial preparation production of two *Lactobacillus* strains with the ability of moulds growth inhibition and the decrease of ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub> content in silages. There was estimated the effect of carbon sources on the synthesis of lactic acid and acetic acid. A bacterial biomass yield was

measured after cultivation in medium used for production of bacterial preparation. On the basis of the results of these experiments it can be concluded that bacterial strains *L. fermentum* N KKP 2020 and *L. plantarum* S KKP 880 synthesize lactic acid in amount from 5.28 to 7.49 g/dm<sup>3</sup>. The above mentioned strains utilize D-xylose and L-arabinose. There was evaluated from 9.34 to 9.60 g/dm<sup>3</sup> bacterial biomass yield, which is comparable to the biomass yield for lactic acid bacteria used in preparation production.

**Key words:** *Lactobacillus*, synthesis of organic acids, biomass yield

## WSTĘP

Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzują się statusem GRAS (ang. Generally Recognized As Safe) i przez wieki stosowane były do utrwalania żywności i pasz ze względu na swoje zdolności wykorzystywania cukrów do syntezy kwasu mlekowego, a tym samym obniżania jej pH i zabezpieczania przed rozwojem szkodliwej mikroflory [Magnusson i Schnürer 2005]. Liczba bakterii fermentacji mlekowej obecnych w surowcu roślinnym jest często wystarczająca do zapoczątkowania fermentacji. Dodatek kultury starterowej przyspiesza proces fermentacji, a odpowiednia selekcja umożliwia dobór szczepów bakterii o specjalnych właściwościach, cennych z punktu widzenia otrzymywania określonych produktów [Broberg i in. 2007].

W Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie opracowano technologię produkcji różnorodnych preparatów bakteryjnych i bakteryjno-enzymatycznych, które poprawiają jakość i stabilność tlenową kiszzonek oraz przyczyniają się do poprawy higieny i bezpieczeństwa pasz. Każdy preparat zawiera mieszaną kulturę szczepów bakterii względnie heterofermentatywnych (*Lactobacillus plantarum*) i heterofermentatywnych (*Lactobacillus buchnerii* i/lub *Lactobacillus brevis*) [12].

Ogólnie wiadomo, że wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej jak również fermentowane produkty żywnościowe wykazują zdolności do obniżania zawartości metali ciężkich (kadm, ołów), amin aromatycznych, policyklicznych węglowodorów aromatycznych, cyjanotoksyn, a także mikotoksyn [Haskard i in. 2001; Turbic i in. 2002; Halttunen i in. 2007; Fuchs i in. 2008]. Doniesienia naukowe z ostatnich dziesięciu lat potwierdzają ponadto, że izolowane ze środowisk roślinnych oraz jelitowe szczepy bakterii z rodzajów *Lactobacillus*, *Streptococcus* czy *Bifidobacterium* są w stanie eliminować takie mikotoksyny jak: ochratoksyna A, patulina, aflatoksyny oraz toksyny fuzaryjne jak deoksyniwalenol, zearalenon i fumonizyny B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> w warunkach modelowych [Turbic i in. 2002; Niderkorn i in. 2006; 2007; Shahin 2007, Fuchs i in. 2008, Fazeli i in. 2009]

Obecnie podejmowane są badania nad ograniczaniem wchłaniania mikotoksyn z przewodu pokarmowego zwierząt, z wykorzystaniem preparatów składających się z probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, które mogą redukować zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub> w przewodzie pokarmowym kurcząt [El-Nezami i in. 2000, 2006]. Podejmowane są badania dotyczące możliwości zastosowania wyselekcjonowanych kultur bakterii fermentacji mlekowej w procesie słodowania i warzenia piwa celem zahamowania wzrostu pleśni oraz produkcji przez nie mikotoksyn [Rouse i in. 2008]. Obiecujące są wyniki badań Kankaanpää i in. [2000] nad zdolnościami szczepu *L. rhamnosus* GG do adhezji do komórek linii nabłonka jelitowego. Zwiążanie komórek bakterii z aflatoksyną B<sub>1</sub> skutkowało zmniejszeniem zdolności tych komórek do przylegania do nabłonka jelita, dzięki czemu mikotoksyny zaadsorbowane na powierzchni komórek bakterii mogły zostać usunięte z organizmu. Dotychczasowe badania nad możliwością obniżania adsorpcji mikotoksyn w przewodzie pokarmowym są niejednoznaczne i trudno jest ocenić przyszłą przydatność omawianej grupy drobnoustrojów w tym procesie.

Tradycja zastosowania szczepów bakterii fermentacji mlekowej do produkcji żywności i pasz, w połączeniu ze współczesną wiedzą na temat ich pozytywnego wpływu na zdrowie ludzi i zwierząt, jako organizmów o potencjalnym działaniu probiotycznym, daje nadzieje na ich zastosowanie jako alternatywnych metod utrwalania produktów żywnościowych, z jednoczesną eliminacją mikotoksyn w tych produktach [Kabak i in. 2006].

Do badań nad opracowaniem preparatu antymikotoksynowego wytypowano wyselekcjonowane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, które w warunkach modelowych obniżały zawartość ochratoksyny A o około 40 % [Kapturowska i in. 2010], jak również wykazywały zdolności do obniżania zawartości aflatoksyny B<sub>1</sub> o około 50 % [Zielińska i in. 2011].

Wyniki badań, prowadzonych w warunkach produkcyjnych, dotyczące zastosowania do kiszenia runi łąkowej preparatu składającego się z wyselekcjonowanych szczepów *L. plantarum* K KKP 593/p, *L. plantarum* C KKP 788/p i *L. buchneri* KKP 907, o udokumentowanych zdolnościach do obniżania poziomu skażenia ochratoksyną A środowiska modelowego, wykazały, że działanie preparatu spowodowało nie tylko 100 do 1000-krotne obniżenie liczby pleśni w kiszonce, ale także obniżenie zawartości ochratoksyny A o około 60 %, w stosunku do jej zawartości w surowcu przeznaczonym do kiszenia [Suterska i in. 2009].

Celem pracy była charakterystyka wybranych cech szczepów z gatunków *Lactobacillus fermentum* oraz *Lactobacillus plantarum* o zdolności do obniżania w środowisku zawartości

zarówno ochratoksyny A jak i aflatoksyne B<sub>1</sub>, pod kątem ich przydatności do produkcji antymikotoksynowego preparatu do kiszzenia pasz objętościowych.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

### Szczepy bakterii fermentacji mlekowej

Badania prowadzono z udziałem szczepów bakterii

- *Lactobacillus fermentum* N KKP 2020,
- *Lactobacillus plantarum* S KKP 880.

### Podłoża hodowlane

W pracy wykorzystano następujące podłoża hodowlane:

- podłoże MRS firmy Difco o zawartości w g/1000 cm<sup>3</sup>: pepton (10), ekstrakt mięsny (10), ekstrakt drożdżowy (5), glukoza (20), Tween 80 (1), cytrynian amonu (2), octan sodu (5), siarczan (VI) magnezu (0,1), siarczan (VI) manganu (0,05), fosforan (V) potasu (2),
- zmodyfikowane podłoże MRS do badania rozkładu cukrów (bez wyciągu mięsnego o zawartości 2 % testowanego cukru),
- podłoże produkcyjne o zawartości w g/1000 cm<sup>3</sup>: glukozy (25), sacharozy (20), ekstraktu drożdżowego (2), bactopectonu (Difco) (5), ekstraktu słodowego (8), siarczanu (VI) amonu (10,5), wodorofosforanu (V) amonu (6,0), siarczanu (VI) magnezu (2,4), siarczanu (VI) manganu (II) (0,3).

### Układ doświadczeń

Badania obejmowały ocenę zdolności badanych szczepów bakterii do wytwarzania kwasu mlekowego i octowego przy zastosowaniu różnych źródeł węgla (glukoza, sacharoza, D-ksyloza i L-arabinoza) oraz ocenę wydajności biomasy bakterii hodowanych w podłożu produkcyjnym w fermentorze laboratoryjnym.

Hodowle badanych szczepów bakterii prowadzono w kolbach (w objętości 100 cm<sup>3</sup>) w czasie 72 h w temperaturze 30°C. Biomasa bakteryjną oddzielano od płynu pohodowlanego przez wirowanie w wirówce szybkoobrotowej Jouan (7000 rpm, 10 min, 5°C). pH płynu pohodowlanego oznaczano metodą potencjometryczną, a zawartość izomerów L i D kwasu mlekowego oraz zawartość kwasu octowego za pomocą testów enzymatycznych firmy BOEHRINGER MANNHEIM. Liczbę bakterii jako jednostki tworzące kolonie (j.t.k.) oznaczano metodą płytkową na podłożu agarowym MRS. Oznaczenia wykonywano po upływie 24 h, 48 h oraz 72 h hodowli dla każdego zastosowanego cukru.

Wydajność biomasy oceniano prowadząc hodowle bakterii w fermentorze laboratoryjnym BIOSTAT B firmy B. Braun Biotech International o objętości roboczej 5 dm<sup>3</sup>. Hodowlę prowadzono w temperaturze 35°C w czasie 24 h. Obroty mieszadła utrzymywano na stałym poziomie 200 obr./min. pH w trakcie hodowli wynosiło 5,8 i było stabilizowane poprzez dozowanie 12,5 % roztworu amoniaku. Po zakończeniu hodowli biomasę bakteryjną odwirowano w wirówce Sharples (25000 g, 40 minut). Suchą masę biomasy bakterii oznaczano metodą termogravimetryczną za pomocą wagosuszarki MA45 Sartorius.

### **Analiza statystyczna**

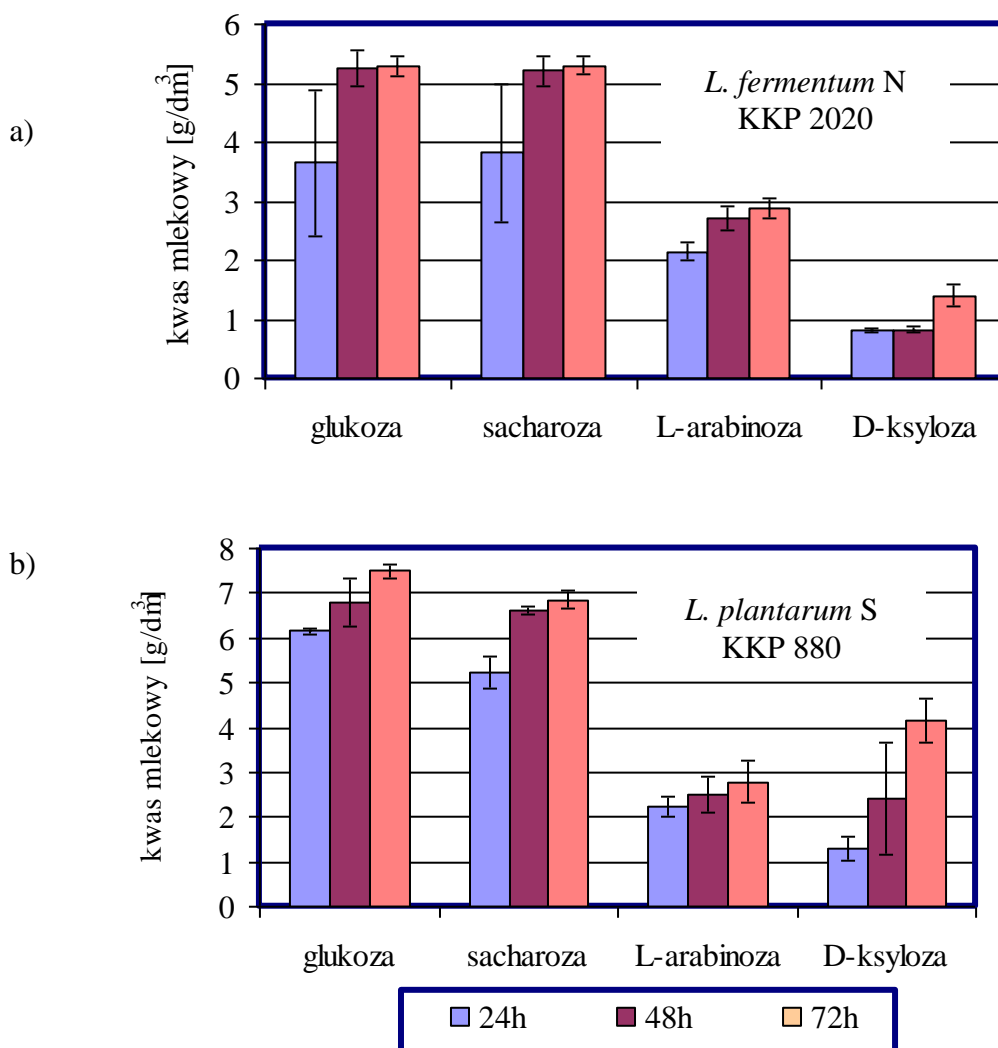
Wyniki przeprowadzonych badań analizowano metodami statystycznymi przy pomocy oprogramowania STATGRAPHICS Plus for Windows 4.1©Statistical Graphics Corp. W celu weryfikacji hipotezy statystycznej o równości średnich obiektowych przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji. Szczegółowego porównania średnich i wyodrębnienia grup jednorodnych dokonano, stosując test porównań wielokrotnych - test Tukey'a. W analizie statystycznej ustalono poziom istotności  $\alpha = 0,05$ . Doświadczenia wykonywano w trzech powtórzeniach.

## **WYNIKI I DYSKUSJA**

### **Badanie dynamiki syntezy kwasów organicznych przez bakterie hodowane w podłożu zawierającym różne źródła węgla**

Prowadzona w ciągu 72 h hodowla bakterii badanych szczepów z wykorzystaniem różnych źródeł węgla pozwoliła na ocenę ilości produkowanego kwasu mlekowego ogółem, w tym izomerów L(+) i D(-) oraz kwasu octowego oraz dynamiki zmian pH. Do badań wybrano cukry: glukozę, sacharozę oraz pentozy (L-arabinozę i D-ksylozę), które obok fruktozy, galaktozy i kwasów uronowych stanowią znaczącą ilość cukrów prostych występujących w kiszonkach jako produkty hydrolizy enzymatycznej hemiceluloz roślinnych [Zielińska, Miecznikowski, 2008].

Na rysunku 1 przedstawiono dynamikę zmian ogólnej zawartości kwasu mlekowego produkowanego przez badane szczepy bakterii. W tabeli 1 zaprezentowano analizę statystyczną wyników dotyczących właściwości fermentacyjnych badanych szczepów bakterii. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej uzyskanych wyników stwierdzono, że na ilość syntezowanego kwasu mlekowego przez testowane szczepy bakterii miał wpływ zastosowany cukier.



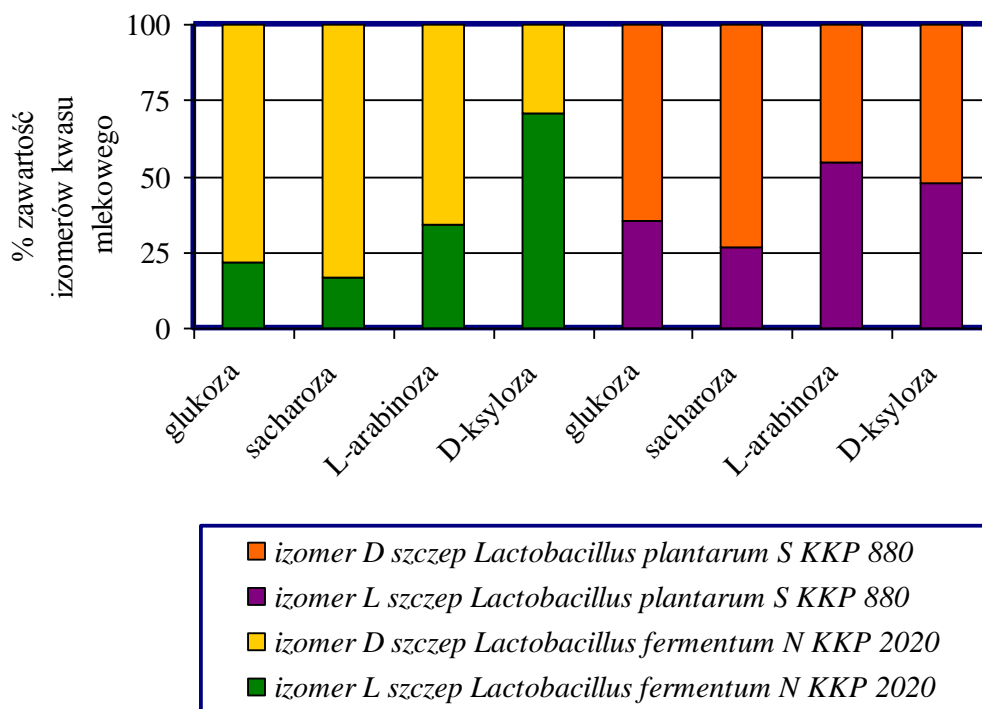
**Rysunek. 1.** Dynamika zmian ogólnej zawartości kwasu mlekowego syntezowanego przez szczep a) *L. fermentum* N KKP 2020, b) *L. plantarum* S KKP 880 w czasie hodowli stacjonarnej w zależności od zastosowanego źródła węgla.

*Dynamics of general amount of lactic acid synthesized by strains: a) *L. fermentum* N KKP 2020, b) *L. plantarum* S KKP 880 during stationary culture depending on carbon source.*

Szczep *L. fermentum* N KKP 2020 wytwarzał największe ilości kwasu mlekowego w dwóch podłożach: z glukozą i sacharozą (średnio 5,28 i 5,30 g/dm<sup>3</sup> po 72 h). Istotnie niższe ilości kwasu mlekowego stwierdzono w podłożu z L-arabinozą (2,89 g/dm<sup>3</sup>). Najmniejszą ilość badanego metabolitu uzyskano w czasie hodowli w podłożu z D-ksylozą (1,40 g/dm<sup>3</sup>). Podobnie zawartość formy D(-) kwasu mlekowego była najwyższa w podłożu z glukozą i sacharozą, a najniższa w przypadku zastosowania D-ksylozy jako jedyne źródła węgla

(rys. 2). Szczep *L. plantarum* S KKP 880 syntezował najwyższą ilość kwasu mlekowego w podłożu z glukozą i sacharozą (średnio 7,49 oraz 6,86 g/dm<sup>3</sup> po 72 h) (rys. 1). Istotnie niższą zawartością metabolitu charakteryzował się płyn pochodzący w wariacie doświadczenia z L-arabinozą i D-ksylozą. Po 72 h uzyskano 4,16 g/dm<sup>3</sup> kwasu mlekowego w podłożu z D-ksylozą, czyli o ponad 30 % więcej aniżeli w podłożu z L-arabinozą.

Ogólna ilość kwasu mlekowego wytwarzanego przez szczep *L. fermentum* N KKP 2020 w podłożach z glukozą i sacharozą była istotnie niższa po pierwszych 24 h hodowli w stosunku do zawartości po 2 i 3 dobie, kiedy stężenie kwasu mlekowego nie różniło się w sposób istotny (rys. 1). W przypadku szczepu *L. plantarum* S KKP 880 ilość syntetyzowanego kwasu mlekowego w czterech podłożach z różnym źródłem węgla różniła się pomiędzy 1 a 2 dobą oraz pomiędzy 2 i 3, a zatem proces fermentacji mlekowej przebiegał nadal intensywnie po 48 h hodowli.



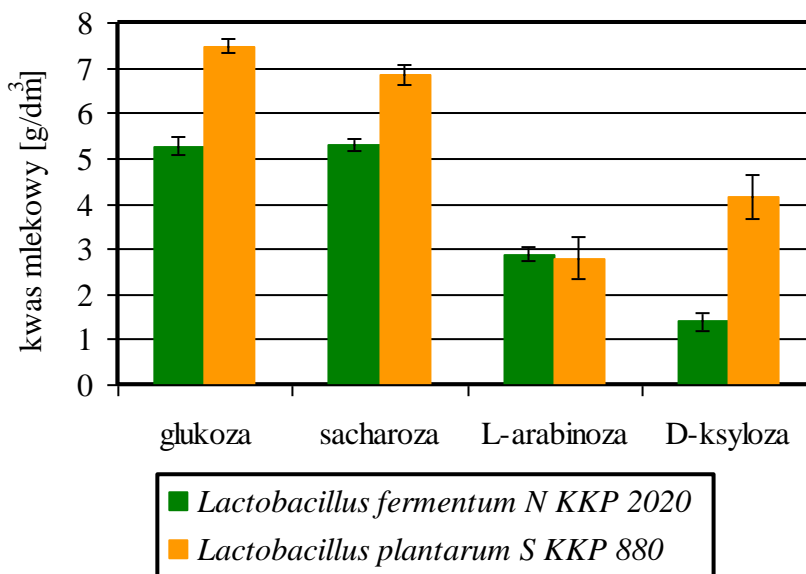
**Rysunek 2.** Wpływ źródła węgla na zawartość kwasu L(+) i D(-) mlekowego w płynie pochodzącym po 72 h hodowli stacjonarnej szczepów *L. fermentum* N KKP 2020 oraz *L. plantarum* S KKP 880.

*Impact of carbon source on content of L(+) and D lactic acid in supernatant after 72 h culture of strains L. fermentum N KKP 2020 and L. plantarum S KKP 880.*

Zastosowane źródło węgla w podłożu nie miało istotnego wpływu na ilość wytwarzanego przez szczep *L. fermentum* N KKP 2020 kwasu L(+) mlekowego, która wahała się

w przedziale od 0,58 do 1,14 g/dm<sup>3</sup> po 72 h hodowli (rysunek 2). Ilość syntezowanego izomeru L(+) stanowiła zaledwie od 16,56 % do 34,19 % całkowitej ilości wytworzonego kwasu mlekowego z wyjątkiem podłoża z D-ksylozą (70,91 % formy L) (rys. 2). Zastosowane źródła węgla miało wpływ na ilość syntezowanego izomeru L kwasu mlekowego przez szczep *L. plantarum* S KKP 880. W hodowli w podłożach z heksozami zaobserwowano przewagę formy D kwasu mlekowego nad formą L, podobnie jak w przypadku szczepu *L. fermentum* N KKP 2020, zaś w hodowli z zastosowaniem L-arabinozy oraz D-ksylozy uzyskano mieszaninę izomerów kwasu mlekowego zbliżoną do racemicznej, zawierającą odpowiednio 54,95 % oraz 47,94 % kwasu L(+)-mlekowego.

Porównanie ogólnej ilości wytworzonego kwasu mlekowego po 72 h hodowli stacjonarnej przez szczepy *L. fermentum* N KKP 2020 oraz *L. plantarum* S KKP 880 w zależności od zastosowanego źródła węgla zaprezentowano na rysunku 3.



**Rysunek 3.** Porównanie ogólnej ilości wytworzonego kwasu mlekowego po 72 h hodowli stacjonarnej przez szczepy *L. fermentum* N KKP 2020 oraz *L. plantarum* S KKP 880 w zależności od zastosowanego źródła węgla.

*Comparison of general amount of lactic acid produced by strains *L. fermentum* N KKP 2020 and *L. plantarum* S KKP 880 after 72 h stationary culture depending on carbon source.*

Niezależnie od źródła węgla (za wyjątkiem L-arabinozy) szczep *L. plantarum* S KKP 880 syntezował istotnie wyższe ilości kwasu mlekowego, w tym ilość izomeru D(-) w porównaniu do szczepu *L. fermentum* N KKP 2020. Szczep *L. plantarum* S KKP 880 niezależnie od zastosowanego cukru odznaczył się także wyższą ilością syntezowanej formy L(+) kwasu



mlekowego. Oba szczepy wykazywały bardziej intensywny przebieg fermentacji mlekowej w podłożu z glukozą i sacharozą, nie mniej jednak założone doświadczenie potwierdziło ich zdolność do wykorzystywania pentoz, takich jak L-arabinoza oraz D-ksyloza, do syntezy kwasu mlekowego.

**Tabela 1.** Analiza statystyczna dotycząca właściwości fermentacyjnych szczepów *L. fermentum* N KKP 2020 oraz *L. plantarum* S KKP 880 (test porównań wielokrotnych - test Tukey'a), \* za korzystniejszy wynik przyjęto wyższą zawartość kwasów.

*Statistical analysis concerning fermentative abilities of bacterial strains L. fermentum N KKP 2020 and L. plantarum S KKP 880 (repeated measurements test - Tukey test), \*as favorable results were considered higher amounts of organic acids.*

Badana cecha	Cukier zastosowany w podłożu	p-value	najmniejsza istotna różnica	*Szczep o istotnie korzystniejszych właściwościach
kwas mlekowy ogółem	glukoza	0,0031	0,96	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
	sacharoza	0,0008	0,48	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
	L-arabinoza	0,6958	0,66	brak istotnej różnicy
	D-ksyloza	0,0016	1,23	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
kwas mlekowy izomer L	glukoza	0,0094	0,90	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
	sacharoza	0,0023	0,39	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
	L-arabinoza	0,0039	0,25	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
	D-ksyloza	0,0017	0,52	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
kwas mlekowy izomer D	glukoza	0,0155	0,46	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
	sacharoza	0,0155	0,41	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
	L-arabinoza	0,0909	0,81	brak istotnej różnicy
	D-ksyloza	0,0027	0,80	<i>L. plantarum</i> S KKP 880
kwas octowy	glukoza	0,0005	0,17	<i>L. fermentum</i> N KKP 2020
	sacharoza	0,8339	0,41	brak istotnej różnicy
	L-arabinoza	0,1554	0,49	brak istotnej różnicy
	D-ksyloza	0,0017	0,58	<i>L. plantarum</i> S KKP 880

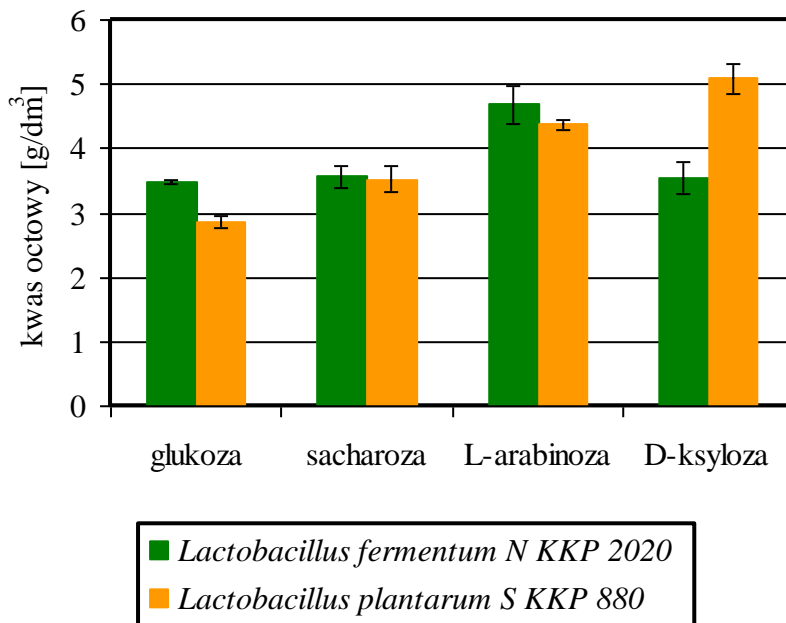
Szczepy bakterii fermentacji mlekowej o silnych właściwościach antybakteryjnych są zdolne do wytwarzania większych ilości kwasu mlekowego aniżeli szczepy o dużej aktywności przeciwgrzybiczej. Można zatem przypuszczać, iż efekt hamowania wzrostu

pleśni przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej nie dotyczy wyłącznie samego kwasu mlekowego. Właściwości fungistatyczne wykazuje także kwas octowy, który stanowi uboczny produkt heterofermentacji mlekowej prowadzonej przez komórki bakteryjne [Magnusson i Schnürer 2005]. Ocena ilości syntezowanego kwasu octowego przez wybrane szczepy z rodzaju *Lactobacillus* wykazała, że na ilość wytwarzanego metabolitu wpływają zarówno czas hodowli jak i zastosowany cukier. Na rysunku 4 przedstawiono ogólną ilość kwasu octowego wytworzonego po 72 h przez badane szczepy.

Szczep *L. fermentum* N KKP 2020 syntezował porównywalne ilości kwasu octowego w podłożu z glukozą, sacharozą oraz D-ksylozą (odpowiednio 3,48; 3,56 oraz 3,54 g/dm<sup>3</sup> po 72 h). Istotnie największą ilość kwasu octowego oznaczono w płynie pohodowlanym w wariacie doświadczenia z L-arabinozą (4,68 g/dm<sup>3</sup> po 72 h hodowli). Szczep *L. plantarum* S KKP 880 syntezował najwyższą ilość kwasu octowego w wyniku fermentacji D-ksylozy (5,09 g/dm<sup>3</sup> po 72 h), mniejszą istotnie jego zawartość obserwowano w płynie pohodowlanym z sacharozą (3,52 g/dm<sup>3</sup> po 72 h), a najmniejszą w podłożu z glukozą (2,86 g/dm<sup>3</sup>).

Porównując średnie stężenie kwasu octowego w kolejnych dobach hodowli stwierdzono, że szczep *L. fermentum* N KKP 2020 odznaczał się istotnie wyższą jego produktywnością w porównaniu do szczepu *L. plantarum* S KKP 880 w podłożu z glukozą. Odwrotną sytuację zaobserwowano w podłożu z D-ksylozą. Ilość produkowanego kwasu octowego w podłożu z sacharozą i L-arabinozą była statystycznie porównywalna w odniesieniu do obu badanych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (rys. 4).

Oba badane szczepy charakteryzowały się zadawalającą produktywnością badanych metabolitów i syntezowały od 0,14 do 0,53 % (*L. fermentum* N KKP 2020) oraz od 0,28 do 0,75 % (*L. plantarum* S KKP 880) kwasu mlekowego. Wyniki doświadczenia *in vitro* predysponują te szczepy do ich wprowadzenia do badań na materiale roślinnym, a wysoka synteza kwasu octowego (od 0,28 % do 0,51 % przez szczep *L. plantarum* S KKP 880) w podłożu hodowlanym może przełożyć się na dobre właściwości konserwujące kiszonych pasz i możliwość zabezpieczenia kiszonki przed rozwojem pleśni, jako że za minimalne stężenie kwasu octowego hamujące pleśnie z rodzaju *Aspergillus* uznaje się 0,5%, zaś w odniesieniu do *Penicillium roqueforti* 0,125 % kwasu octowego [Kluczek, Kojder, 2000].

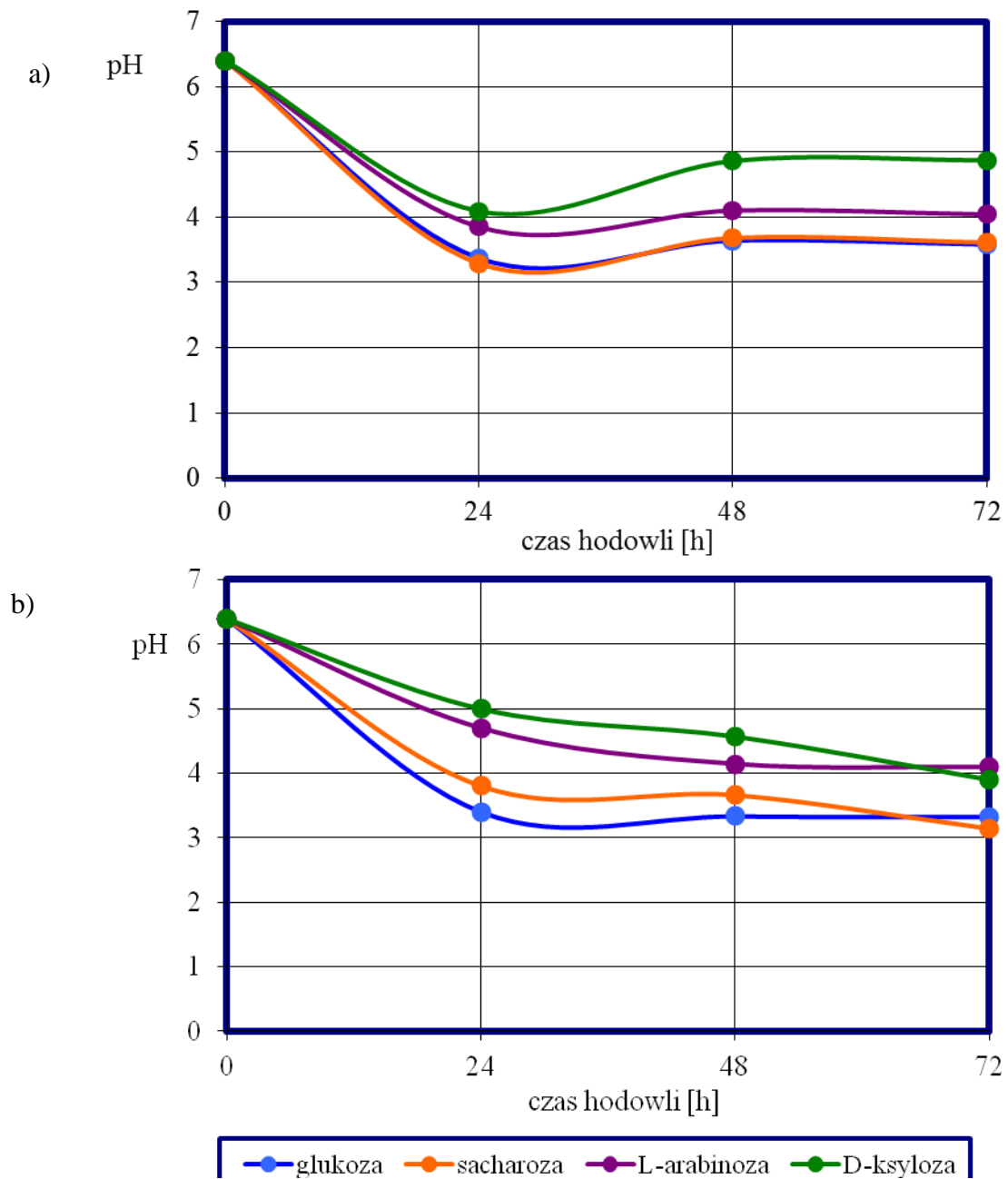


**Rysunek 4.** Wpływ źródła węgla na zawartość kwasu octowego w płynie pochodzącym po 72 h hodowli stacjonarnej szczepów *L. fermentum* N KKP 2020 oraz *L. plantarum* S KKP 880.

*Impact of carbon source on content of acetic acid in supernatant after 72 h culture of strains L. fermentum N KKP 2020 and L. plantarum S KKP 880.*

#### Zmiany pH podłoża w czasie hodowli szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w podłożach zawierających różne źródła węgla

Badane szczepy w szybkim czasie opanowują środowisko, o czym świadczą wyniki zmian pH podłoża w czasie prowadzonej hodowli (rysunek 5). Po pierwszych 24 h hodowli szczepu *L. fermentum* N KKP 2020 pH pożywki spadło z poziomu 6,4 do wartości 4,09 w przypadku podłoża z D-ksylozą i do wartości 3,29 w przypadku podłoża z sacharozą. Zaobserwowano, że pH podłoża stabilizowało się już po 48 h hodowli szczepu *L. fermentum* N KKP 2020 i nie podlegało istotnym zmianom w ostatniej dobie doświadczenia. pH podłoża w czasie hodowli szczepu *L. plantarum* S KKP 880 systematycznie spadało na podłożu z sacharozą oraz D-ksylozą aż do 3 doby hodowli. W odniesieniu do obu szczepów najintensywniejszy spadek pH następował w podłożu z glukozą i sacharozą, co ma ścisły związek z ilością syntezowanych kwasów organicznych w tych podłożach przez komórki bakterii.



**Rysunek 5.** Zmiany pH podłoża w czasie 72 h hodowli szczepu *L. fermentum* N KKP 2020 i *L. plantarum* S KKP 880 w zależności od zastosowanego źródła węgla.  
*Changes of medium pH during 72 h stationary culture of strains *L. fermentum* N KKP 2020 and *L. plantarum* S KKP 880 depending on carbon source.*

### Ocena plonu biomasy badanych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* hodowanych w fermentorze laboratoryjnym

Ważną cechą określającą przydatność danego szczepu bakterii do produkcji w skali technicznej jest uzyskiwany plon biomasy bakteryjnej. W prowadzonej hodowli w fermentorze laboratoryjnym nieznacznie wyższą wydajnością biomasy bakteryjnej charakteryzował się szczep *L. plantarum* S KKP 880 (9,60 g/dm<sup>3</sup>) w porównaniu do szczepu *L. fermentum* N KKP 2020 (9,34 g/dm<sup>3</sup>), biomasa szczepów nieznacznie różniła się poziomem suchej masy, który wyniósł odpowiednio 27,17% oraz 28,06%. Szczep *L. fermentum* N KKP 2020 cechował się nieznacznie wyższą liczbą bakterii w przeliczeniu na gram biomasy bakteryjnej, która wynosiła  $1,08 \times 10^{12}$  j.t.k./g, w porównaniu ze szczepem *L. plantarum* S KKP 880 ( $4,20 \times 10^{11}$  j.t.k./g). Wyniki doświadczenia zaprezentowano w tabeli 2.

**Tabela 2.** Plon biomasy po 24-godzinnej hodowli w fermentorze laboratoryjnym szczepów bakterii *L. fermentum* N KKP 2020 oraz *L. plantarum* S KKP 880.

*Bacterial biomass yield during cultivation in laboratory reactor for strains L. fermentum N KKP 2020 and L. plantarum S KKP 880.*

Szczep	Plon biomasy [g/dm <sup>3</sup> podłoża]	Sucha masa [%]	Liczba bakterii [j.t.k./g biomasy]
<i>Lactobacillus fermentum</i> N KKP 2020	9,34	28,06	$1,08 \times 10^{12}$
<i>Lactobacillus plantarum</i> S KKP 880	9,60	27,17	$4,20 \times 10^{11}$

Uzyskane wyniki doświadczeń pozwalają stwierdzić, że badane szczepy *Lactobacillus fermentum* N KKP 2020 oraz *Lactobacillus plantarum* S KKP 880 cechują się plonem biomasy na poziomie porównywalnym ze szczepami przemysłowymi stosowanymi w produkcji preparatów bakteryjnych prowadzonej w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, który wynosi średnio 10,0 g/dm<sup>3</sup> podłoża (na podstawie danych zawartych w raportach z produkcji preparatów).

## WNIOSKI

1. W podłożu zawierającym glukozę i sacharozę jako jedyne źródło węgla szczepy *Lactobacillus fermentum* N KKP 2020 i *Lactobacillus plantarum* S KKP 880 charakteryzują się syntezą kwasu mlekowego na poziomie 5,28 – 7,49 g/dm<sup>3</sup> oraz kwasu octowego na poziomie około 3,5 g/dm<sup>3</sup>
2. Badane szczepy bakterii charakteryzują się zdolnością do fermentacji D-ksylozy oraz L-arabinozy.
3. Plon biomasy szczepów bakterii *L. fermentum* N KKP 2020 oraz *L. plantarum* S KKP 880 wyrażony w g/dm<sup>3</sup> podłoża produkcyjnego jest porównywalny z plonem biomasy szczepów przemysłowych z rodzaju *Lactobacillus* stosowanych w produkcji preparatów bakteryjnych.
4. Na podstawie uzyskanych wyników badań dotyczących oceny wybranych cech stwierdzono, że charakteryzowane szczepy mogą być wykorzystane w produkcji preparatów bakteryjnych o działaniu antymikotoksynowych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J. (2007). Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(17), 5547-5552
2. El-Nezami H.S., Mykkanen H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J. (2000). Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B<sub>1</sub> from the chicken duodenum. *J. Food Protect.*, 63, 549-552
3. El-Nezami H.S., Polychronaki N.N., Ma J., Zhu H., Ling W., Salminen E.K., Juvonen R.O., Salminen S.J. (2006). Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *Am. J. Clin. Nut.*, 83, 1199-1203
4. Fazeli M. R., Hajimohammadali M., Moshkani A., Samadi N., Jamalifar H., Khoshayand M. R., Vaghari E., Pouragahi S. (2009). Aflatoxin B<sub>1</sub> binding capacities of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *J. Food Protect.*, 72(1), 189-192
5. Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1398-1407
6. Haskard A., El-Nezami H. S., Kankaanpää P. E., Salminen S., Ahokas T. (2001). Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (7), 3086-3091

7. Halttunen T., Collado M. C., El-Nezami H., Meriluoto J., Salminen S. (2007). Combining strain of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46, 160-165
8. Kabak B., Dobson A. W., Var I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46 (8), 593-612
9. Kankaanpää P., Tuomola E., El-Nezami H., Ahokas J., Salminen S. J. (2000). Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in Caco-2 model. *J. Food Protect.* 63(3), 412-414
10. Kapturowska A., Stecka K., Zielińska K., Kupryś M. (2010). Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w warunkach modelowych. W: Wielokierunkowość badań w rolnictwie i leśnictwie, Kraków: UR, t. 1, 107-112
11. Kluczek J. P., Kojder A. (2000). Mikotoksyny w zarysie. Bydgoszcz: Wyd. Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy,
12. Kultury starterowe bakterii fermentacji mlekowej do kiszenia pasz - od selekcji szczepów do aplikacji (2008). Pr. Zbior. pod red. K. Zielińskiej i A. Miecznikowskiego. Warszawa: Wyd. IBPRS
13. Magnusson J., Schnürer J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Tech.* 16, 70-78
14. Niderkorn V., Boudra H., Morgavi D.P. (2006). Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* 10, 1849-956
15. Niderkorn V., Morgavi D.P., Pujos E., Tissandier A., Boudra H. (2007). Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model. *Food Addit. Contam.* 24(4), 406-415
16. Rouse S., Van Sinderen D. (2008). Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *J. Food Protect.*, 71 (8), 1724-1733
17. Shahin A. A. M. (2007). Removal of aflatoxin B<sub>1</sub> from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *Int. J. Agr. Biol.* 9 (1), 71-75
18. Suterska A. M., Zielińska K. J., Grzybowski R. A., Stecka K. M., Miecznikowski A. H., Kupryś M. P. (2009). Wpływ wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* na ograniczenie skażenia pleśniami i ochratoksyną A kiszonek z runi łąkowej. *J. Res. Agr. Eng.* 53 (4), 125-129

19. Turbic A., Haskard A., Ahokas T. (2002):. Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit. Contam.* 19 (2):144-152
20. Zielińska K., Stecka K., Grzybowski R., Kupryś M., Kapturowska A. (2011). Ability of *Lactobacillus* species to decontaminate aflatoxin B<sub>1</sub> in environment. W: 10th Symposium on lactic acid bacteria. 28.08 – 1.09.2011. Egmond aan Zee, Holandia.