



Viti i XIII -te i Botimit, Nr.1,
Qershor 2021

PËRDORIMI I FERMENTEVE LAKTIKE SI NJE QASJE E RE NË MBROJTJEN E PËRBËRËSVE NATYRALË DHE ELEMINIMIN E EFEKTE TEVE ANËSORE NË SHËNDETIN E NJERIUT

Patricia Daliu *, Roberto Ciampaglia **, Antonello Santini **

*** Albanian University, Fakulteti i Shkencave Mjekësore, Departamenti i Farmacisë, Tiranë.**

**** Universiteti Frederico II, Departamenti i Farmacise, Napoli, Italy.**

Adresë kontakti: p.daliu@albanianuniversity.edu.al

Abstrakt

Në ditët e sotme interesi i vazhdueshëm në rritje i konsumatorëve për produkte bio dhe problemet që lidhen me përdorimin e pesticideve kimike dhe ruajtësve të ushqimit, e bënë të nevojshme kërkimin e alternativave të reja efektive dhe të pa dëmshme për shëndetin e popullatës. Si një qasje e re ky studim, propozon përdorimin e fermenteve laktike si agjent të bio kontrollit në sajë të produkteve dytësore të metabolizmit qelizor dhe aktivitetit sinergjik midis tyre. Në këtë kuadër nga vlerësimi in vitro dhe in vivo në laborator u arrit një frenim i rritjes së myqeve në vecanti të *Penicillium verucosum* spp dhe *Fusarium Sporotrichoide* spp në masën 66% dhe një zgjatje e jetëgjatësisë së produktit të pa kontaminuar. Këto të dhëna hedhin dritë në praktikën e mirë agro-ushqimore duke rritur paralelisht dhe sigurinë e konsumatorit.

Fjalët çelës: *fermente laktike, konservante natyral, agjent fungal, siguri ushqimore*

Patricia Daliu, Roberto Ciampaglia, Antonello Santini

THE USE OF LACTIC ACID BACTERIA AS A NEW APPROACH TO PROTECT THE NATURAL CROPS AND AVOID THE SIDE EFFECTS ON HUMAN HEALTH

Abstract

Nowadays the continuous growing interest of consumers for natural and safe products and the problems associated with the use of chemical pesticides and food preservative makes it necessary to search suitable protective alternatives. For this purpose this study aim to explore the possibility to use lactic bacteria as a bio-control agent against secondary metabolites from microfungi contaminating crops. In this context, the *in vitro* and *in vivo* evaluation in the laboratory achieved an inhibition of fungal growth in particular of *Penicillium verucosum* spp and *Fusarium Sporotrichoide* spp in the amount of 66% and an extension of the shelf life of the contaminated product. These data hold promise on good agro-food practice and increase consumer safety.

Key words: *lactic acid bacteria, natural bio-preservation, anti-fungal agent, safe food*

1. Hyrje

Në ditët e sotme interesi i vazhdueshëm në rritje i konsumatorëve për produkte bio dhe problemet që lidhen me përdorimin e pesticideve kimike dhe ruajtësve të ushqimit, e bën të nevojshme kërkimin e alternativave të reja efektive. Përfitimet shëndetësore të frutave dhe perimeve janë njohur gjerësisht në studimet e fundit ⁽¹⁾. Sidoqoftë, disa ndotës vegjetalë, si mikotoksinat, metabolitët dytësor të prodhuar nga myqet, mund të shkaktojnë probleme serioze shëndetësore që përfshijnë sistemin kardiovaskular, hormonal, e ndryshime metabolikë esenciale. Produktet dhe bimët medicinale që janë në dispozicion në treg nuk përmbushin gjithmonë standardet e cilësisë dhe sigurisë ⁽²⁻³⁾. Përvëç kësaj si cilësia ashtu edhe siguria e produkteve natyrore të ngrënshme janë të lidhura ngushtë me pajtuëshmërinë e parimeve të praktikës së mirë të kultivimit e ruajtjes në çdo hap të prodhimit. Midis ndotësve të mundshëm në këtë fushë, myqet janë një nga kërcënimet kryesore ⁽⁴⁻⁶⁾. Metabolitët dytësorë të prodhuara prej tyre mund të ndikojnë gjithashtu në fitokompleksin dhe / ose karakteristikat e ushqimit, pasi trajtimet teknologjike nuk i eliminojnë ato ⁽⁷⁾. Bazuar në këtë aspekt, objektivi i këtij kërkimi shkencorë është vlerësimi *in vitro* dhe *in vivo* i probiotikëve si agjentë të bio-kontrollit si një qasje e re dhe e sigurt për eliminimin e konservantëve sintetikë/pesticideve që sjellin efekte anësore në shëndetin e popullatës. Në këtë kuadër ky studim propozon përdorimin dhe testimin e dhjetë kulturave të *Lactobacillus spp* dhe *Bacillus spp*, identifikimin, përcaktimin sasiorë të metabolitëve sekundarë të prodhuar nga këto shtame, potencialisht përgjigjës për aktivitetin antifungalë, të tilla si acide organikë, acide fenolike dhe përbërje organikë të avullueshme (VOC) kundrejt dhjetë kulturave më të përhapura të myqëvë si *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Botrytis spp.*, *Alternaria spp.* Fermentet Laktikë, quhen të tilla pasi prodhojnë acid laktik si produkt të metabolismit qelizor ⁽⁸⁾, janë konsideruar mikroorganizma të sigurt sipas Organizatës Botërore të Shëndetësisë (OBSh) dhe gjejnë përdorim shumë të gjërë në disa procese industriale fermentimi si edhe në përbërjen e suplementeve farmaceutike për rregullim e florës intestinale ⁽⁹⁾.

2. Materialet dhe Metodat

2.1 Reagentët

Reagentët standard fenolik si: acid galic, acid klorogjenik, acid kafeik, acid vanilik, acid dihidroksibenzoik janë marrë nga Sigma–Aldrich (Italy). Të gjithë përbërësit për HPLC-DAD/MS kanë shkallën e pastërtisë $\leq 98\%$. Terrenet e kulturavë bakterore (PDA, MRS), glucose janë marrë nga Liofilchem (Torino, Italy). Uji i bi-distiluar dhe pastuar ($<18 \text{ Mq cm}^{-1}$) nga sistemi (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Patricia Daliu, Roberto Ciampaglia, Antonello Santini

2.2. Koleksioni i baktereve dhe myqeve

Penicillium verrucosum VTT D-01847 marrë nga VTT Culture Collection (Finland), *Botrytis cinera* (CECT 20973) marrë nga Spanish Type Culture Collection (Spain), *Aspergillus flavus* ITEM 8111, *Fusarium* strains (*Fusarium proliferatum* ITEM 12072), *Fusarium graminearum* ITEM 126, *F. verticillioides* ITEM 12044, *F. sporotrichioides* ITEM 12168, *F. langsethiae* ITEM 11031, *F. poae* ITEM 9151), *Alternaria alternata* (ITEM 8122) marrë nga (Italy).

2.3 Përgatitja e kulturave mikrobike

Bazuar në afinitetin specific, dy kulturat e fermenteve laktike u përgatitën si më poshtë dhe janë prezantuar ne Tabelën 1.

Tabela 1. Lista e agjentëve të bio-kontrollit dhe kushtet e rritjes

	Emri	Kodi	Terreni	Temperatura (°C)	Grupi
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	PP155	MRS	30	1
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	PA850	MRS	30	
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MP1691	MRS	30	
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	PCH 375	MRS	30	
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	TR710	MRS	30	
6	<i>Bacillus licheniformis</i>	BL20	NB	37	2
7	<i>Bacillus megaterium</i>	BM44	NB	30	
8	<i>Bacillus subtilis</i>	BS499	NB	30	
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BA493	NB	37	
10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	BT197	NB	30	

2.3.1 Përbërësit e terrenit

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS broth): (peptone mishi 10.0 gL⁻¹; dextrose 20.0 gL⁻¹; yeast extract 5.0 gL⁻¹; ekstrakt proteinash 10.0 gL⁻¹; disodium phosphate 2.0 gL⁻¹; sodium acetate 5.0 gL⁻¹; citrate amoniumi 2.0 gL⁻¹; sulfat magnesi 0.1 gL⁻¹; sulfat mangani 0.05 gL⁻¹; Tëen 80 1.0 gL⁻¹). Përgatitja: 26 g tretur ne 1L uje te distiluar

Nutrient broth (NB): peptone mishi 10.0 gL⁻¹; ekstrakt proteinash 10.0 gL⁻¹; klorur natriumi 5.0 gL⁻¹;

Përgatitja: 28 g tretur në 1L ujë të distiluar

2.4 Përgatitja e kampionit për testim

Fermentet janë rritur në 200 mL MRS/ Nutrin Broth 25-37 °C për (12 h) deri në një përqëndrim 10^7 CFU mL⁻¹ inkubuar në 37 °C për 72 h. Pas fermentimit LAB janë ndarë me centrifugim 4000 rpm për 10 min. Qelizat e lira në lëngun sipërfaqësor quajtur Cell-free supernatants (CFS) janë rruajtur në -80 °C për 24 h duke u pasuar me sublimimin në Liofilizator (Free Zone 2.5 L, Labconco, Kansas City, MO, USA).

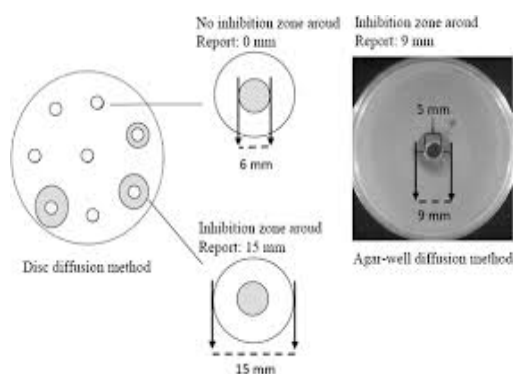
2.5 Përcaktimi cilësor i efektit antimykotik në fazë të ngurtë

2.5.1 Difuzioni në agar

Të gjitha eksperimentet janë përformuar nën kushtë sterile (HEPA-Filter) me fluks laminar ajri. Difuzioni në agar është përdorur për të përcaktuar në mënyrë të drejtëpërdrejtë efektin e qelizave CFS kundrejt myqeve. Në terrenin Potatoes dextrose agar (PDA) me ndihmën e një pambuku steril është aplikuar kultura e myqeve. Më pas, në të njëjtin terren pas hapjes së hap-siravë (6,0 mm) më gjilpëra sterile është aplikuar 100 µL e CFS në një përqëndrim 250 mg mL⁻¹. Si kontroll negativ është përdorur uji i distiluar. Kampionët janë inkubuar në 25 °C për 48 h. Diametri më i madh se 8 mm është konsideruar si kontroll pozitivë për veprimin antingal⁽¹⁰⁾.

Metologjia është e paraqitur në Figurën 1.

Figura 1. Skematikisht mënyra e aplikimit



2.5.2 Metoda e shtrirjes së përbashkët (Dual Culture - Over lay)

Për realizim e këtij eksperimenti *in vitro* dhjetë kultura myqesh janë përdorur sic është përshkruar në Tabelën 2 të mëposhtëme. Në të njëjtën terren me PDA është aplikuar agjenti i bio-controllit në trajtë të lëngët (CFS) dhe kultura e mykut si paraqitet në Figurën 2. Pas 7 ditësh targeti i këtij eksperimenti është matje e % së frenimit të rritjes së mykut nën presencën e agjentit të testuar.

Patricia Daliu, Roberto Ciampaglia, Antonello Santini

Figura 2. Skematikisht mënyra e aplikimit

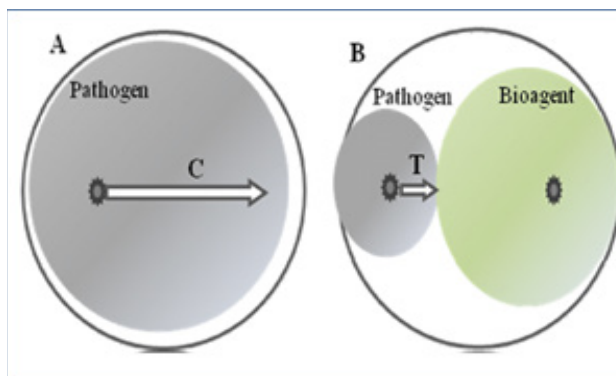
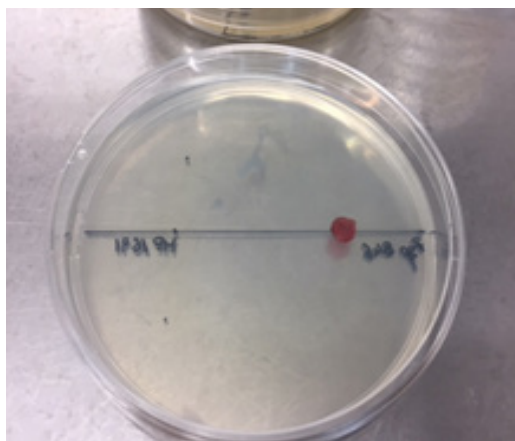


Tabela 2. Lista e myqeve dhe kodet përkatëse sipas sistemit të klasikimit ITEM

Emri	Kodi
<i>Alternaria alternata</i>	646
<i>Botrytis cinerea</i>	181
<i>Penicillium verrucosum</i>	49
<i>Aspergillus flavus</i>	146
<i>Fusarium proliferatum</i>	880
<i>Fusarium verticilloides</i>	883
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	846
<i>Fusarium langsethiae</i>	850
<i>Fusarium poae</i>	902
<i>Fusarium graminearum</i>	838

2.6 Percaktimi sasior i metaboliteve dytësor prodhuar nga agentet e bio kontrollit

2.6.1 Acidet Organike

Për analizën e acideve organike ekstrakti i qelizave sipërfaqësore (CFS) i liofilizuar u hollua në ujë dhe u injektua në sistemin e kromatografisë së lëngshme me performancë të lartë (HPLC) (Agilent 1100 Series HPLC System, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), e pajisur me një pompë kuaternare dhe një detektor DAD duke përdorur një mostër 20 µL. Ndarja analitike u arrit me një kolonë ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 µm) (Eaters Corp., Milford, MA, USA) duke përdorur një fazë të lëvizshme izokratike të ujit të acidifikuar (pH 2.1) me fluks 0.6 mL min⁻¹ për 25 min. Kromatograma u monitorua në 210 nm. Të dhënat u morën nga sistemi HP-CORE ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.6.2 Acidet Fenolike

Për identifikimin e acideve fenolike, CFS u pastrua duke përdorur metodën QuEChERS për të hequr ndërhyrjet e mundshme para analizës kromatografike (Brosnan, Coffey, Arendt, & Furey, 2014). 10 mL CFS të fermentuar u ekstraktuan me 10 mL acetat etil, 1% acid formik, 4 g MgSO₄ dhe 1 g NaCl, më pas u vorbullua për 1 min. Ekstrakti u centrifugua 10 min në 4000 rpm/min. Supernatanti u kombinua me 150 mg C18-resinë dhe 900 mg MgSO₄. Sistemi HPLC i përdorur për përcaktimin kromatografik ishte një Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara) i pajisur me një degëzues vakumi dhe pompë binare. Kolona e përdorur C18 (50 mm × 2 mm, 100 Å, madhësia e grimcave 3-µm; Phenomenex). Fazat e lëvizshme përbëheshin nga uji si tretës A, ACN si tretës B, të dy të acidifikuar (0,1% acid formik).

2.6.3 Komponimet e avullueshme

Kampionet e liofilizuara (200 mg) u tretën me 2 ml ujë të distiluar dhe u vendosën në një shishe kë qelqi 10-ml. Komponimet e avullueshme u identifikuan nga kromatografia e gazt me një analizë të vetme të detektorit të spektrometrit në masë quadrupole (GC / MS). Sistemi GC ishte i pajisur me një kolonë kapilare HP-5MS (30m × 0.25 mm, 0.25 µm 5% difenil / 95% dimetil-poliziloksan) (J&E Scientific, Folsom, CA, USA). Rezultatet u shprehën në përqindje duke u krahasuar me tretësirën standarte.

2.7 Vlerësim *in vivo*: *Lactobacillus plantarum* PP155 dhe *Lactobacillus plantarum* 850 si konservues natyral në domate

Për të vlerësuar aktivitetin antifungal duke përdorur CFS të fermentuar nga *L. Plantarum* PP155 dhe *L. Plantarum* 850, domatet ishin kontaminuar me *A.flavus* ISPA 8111 (prodhues i aflatoksinës B1) dhe *P. expansum* CECT 2278. Kampionet u ndanë në tre grupe, njëzet u trajtuan me tretësirë sterile MRS (kontroll), njëzet me CFS të fermentuar nga *L.Plantarum* PP155, dhe njëzet me CFS të fermentuar nga *L.Plantarum* 850. Së pari, domatet u pastruan me etanol 70% dhe më pas u lanë me ujë steril. Një mL tretësirë që përmban 10⁴ mL⁻¹ spore të kërpudhave u spërkat në domate dhe u tha për 1 orë në një kabinet steril me fluks laminar (Telstar MH 100, Terrassa, Spanjë). Më në fund, kampionet u trajtuan me 10 mL CFS në një përqendrim përfundimtar prej 12.5 g CFS të liofilizuar dhe u ruajtën në temperaturë dhomë për 9 d. Në fund të magazinimit, dhjetë domate nga çdo trajtim u ndanë dhe u ngrinë për përcaktimin e mikotoksinave, dhe dhjetë u ekzaminuan për numerin e sporeve. Të gjitha eksperimentet u përsëritën tre herë.

Patricia Daliu, Roberto Ciampaglia, Antonello Santini

2.8 Të dhënat statistikore

Të dhënat u vlerësuan statistikisht duke përdorur versionin InfoStatsoftëare 2008. Dallimet midis grupeve u analizuan nga ANOVA njëkahëshe, e ndjekur nga testi post hoc i Tukey HSD për krahasime të shumëfishta. Niveli i rëndësisë ishte vendosur në $p \leq 0,01$.

3. Rezultatet

3.1 Rezultatet e mbivendosjes (Dual Culture-Over lay)

Disa ekstrakte të qelizave sipërfaqësore të *Lactobacillus spp* dhe *Bacillus spp* në fazë të lëngët shfaqën aktivitet antifungal ndaj myqeve toksinogjen. Aktiviteti ishte më i shprehur në vecanti kundrejtë *Fusarium spp.* (*F. sporotrichoid* , *F. graminearum* *F. verticillioides*) dhe *Botrytis cynera*. Përqindja e inhibimit varionte nga 16.2% ±0.1 në 55.4% ± 0.1 si është paraqitur në Tabelën 1 dhe Figurën 1 si më poshtë. Për këtë qëllim u përdor formula:

$$\% \text{ frenimit} = (\text{Dm ctrl} - \text{Dm kampion}) / \text{Dm ctrl} - 0.5$$

Ku Dm ctrl-diametri i kontrollit (cm)

Dm kampion- Diametri i agentit (cm)

0.5-diametri i mykut ditën e 1 të nisjes së provës

Tabela 1: Aktiviteti antifungal i bakteve të izoluar kundër specieve *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* dhe *Alternaria* me anë të provës së mbivendosjes. Vlerat shprehen si % e frenimit pas 7 ditësh me devijim standard. ND- Nuk zbulohet aktivitet.

Pathogen	F.sp846	F.883	F.pr 880	F.po902	F.ve838	F.la 850	P.ve 49	B.ci 181	A.fl 146	A.al 646	
Diameter plate control (cm)	8.5		6.5	7.4	6.6	5	5.3	1.6	7.7	7.5	5.5
Biocontrol											
PP 155	45.2± 0.1	50.5± 0.1	48.2 ±0.1	48.2 ±0.	40.3±0.	46 ± 0.2	19±0.2	38.3± 0.1	ND	34.3±0.1	
PA850	55.4± 0.1	40.3± 0.1	37.6 ±0.3	20.3 ±0.1	21.2±0.1	16.6± 0.1	ND	25.3 ± 0.3	ND	22.2± 0.1	
MP1691	45.1±0.2	40.3 ±0.2	50.1 ±0.3	40.2 ±0.1	39.2±0.1	40.2±0.2	20±0.2	43.6±0.4	ND	20.3 ±0.3	
PCH 3	18.2 ± 0.2	17.4± 0.2	19.2 ±0.2	28.2 ±0.1	26.3±0.1	25.1 ±0.2	ND	20.2 ± 0.1	ND	19.3 ± 0.3	
TR71	16.5 ± 0.1	15.4±0.1	16.6 ±0.1	18.7 ±0.2	16.2±0.2	19.4 ±0.2	ND	16.5 ± 0.4	ND	17.8 ± 0.2	
BL 20	16.3 ± 0.2	17.5±0.2	18.7 ±0.2	16.9 ±0.1	ND	16.4 ±0.1	ND	16.2 ± 0.1	ND	18.7 ± 0.1	
BM 44	16.2 ± 0.1	19.2 ±0.1	18.5 ±0.1	17.4 ±0.3	ND	18.3 ±0.2	ND	20.2 ± 0.3	ND	16.3 ± 0.3	
BS 499	25.8 ± 0.3	20.2 ±0.3	21.2 ±0.3	25.2 ±0.2	ND	18.3 ±0.1	ND	21.5 ± 0.2	ND	19.9 ±0.2	
BA493	25.3 ± 0.2	19.2 ±0.2	22.8 ±0.2	22.2 ±0.2	20.2±0.1	16.2 ±0.2	ND	33.2* ± 0.1	ND	20.3 ± 0.2	
BT197	17.2 ± 0.1	19.9 ±0.1	18.2 ±0.1	16.4 ±0.3	ND	17.3 ±0.2	ND	21.2 ± 0.3	ND	16.3 ± 0.1	

PËRDORIMI I FERMENTEVE LAKTIKE SI NJE QASJE E RE NË MBROJTJEN E PËRBËRËSVE NATYRALË DHE ELEMENIMIN E EFEKTEVE ANËSORE NË SHËNDETIN E NJERIUT

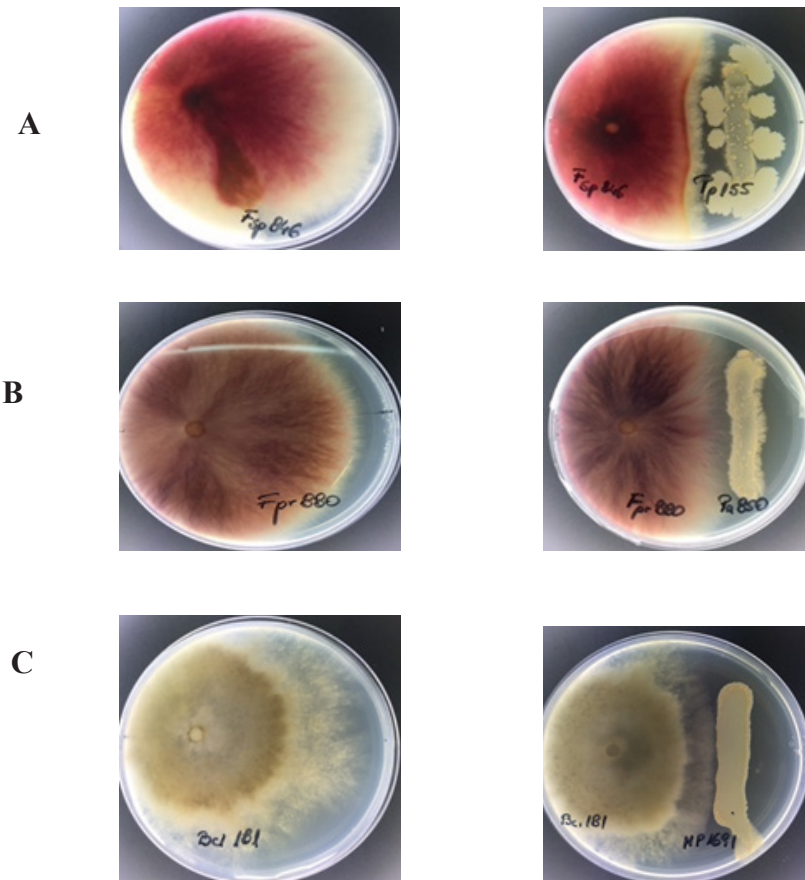


Figura 1. Shembuj të aktiviteti antifungal të përcaktuar me provë mbivendosje krahasuar me kontrollin e: A) *Lactobacillus plantarum* PP155 kundër *Fusarium sporotrichioides* (846) ITEM 12168; B) *Lactobacillus plantarum* PA 850 kundër *Fusarium graminearum* (880) ITEM 126; C) *Lactobacillus plantarum* MP1691 kundër *Botrytis Cinera* (181) (CECT 20973).

3.2. Difuzioni në fazë të ngurtë në agar

Midis dhjetë shtameve të vlerësuara, aktiviteti më i lartë antifungal u vu re në supernatantë me qeliza (CFS) të *Lactobacillus plantarum* 850 dhe *Lactobacillus brevis* PCH 375, i cili frenoi rritjen e gjeneve të kërpudhave të testuara në mjedis të ngurtë siç tregohet në Tabelën 2 dhe Figurën 3, përkatësisht. Vetëm rrathë më të mëdha se 8 mm janë konsideruar si rezultat pozitiv.

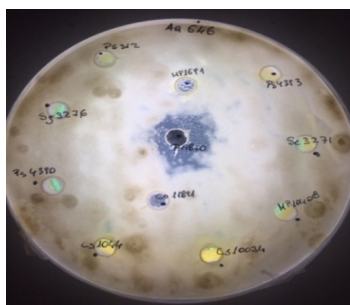
SHKENCAT MJEKËSORE

Patricia Daliu, Roberto Ciampaglia, Antonello Santini

Myku Target	Agjentet e bio kontrollit										
	PP	PA	BT	PCH	PA	BL	BM	BS	BA	TR	MP
	155	850	197	375	2	20	44	499	493	71	1691
<i>Alternaria alternata</i>	++	-	-	++	-	-	-	-	+	+++	-
<i>Botrytis cinerea</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
<i>Penicillium verrucosum</i>	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
<i>Fusarium verticilloides</i>	-	-	-	+++	-	+	-	-	-	+	-
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
<i>Fusarium langsethiae</i>	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	++	-
<i>Fusarium poae</i>	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+	-
<i>Fusarium graminearum</i>	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-

Tabela 2. Aktiviteti antifungal i CFS kundër llojeve *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* *Botrytis* dhe *Alternaria* me metodën e difuzionit në agar. –Nuk ka aktivitet; + më pak aktivitet; ++ aktivitet i mesëm; +++ aktivitet i fortë.

Figura 3. A) *Lactobacillus plantarum* PA850 kundër *Alternaria alternata* ITEM 8122, B) *Lactobacillus brevis* PCH 375 kundër *Fusarium graminearum* ITEM 126.



3.3 Identifikimi i metabolitëve dytesorë

Sipas literaturës, veprimtaria antifungale e agjentëve të biokontroll nuk është vetëm për shkak

SHKENCAT MJEKËSORE

PËRDORIMI I FERMENTEVE LAKTIKE SI NJE QASJE E RE NË MBROJTJEN E PËRBËRËSVE NATYRALË DHE ELEMENIMIN E EFEKTEVE ANËSORE NË SHËNDETIN E NJERIUT

të një lloji të përbërjes por gjithashtu varet nga veprimi sinergjik midis të gjitha substancave metabolike të pranishme në ekstraktin e fermentuar (Croëley et al., 2013). Nga eksperimentet tona, u përcaktuan gjithsej katër acide organike, përkatësisht, acid laktik, acid acetik, acid sukcinik dhe acid malik. Sipas rezultateve siç tregohet më poshtë në Tabelën 4a) të gjitha shtamet e izoluar prodhuan acid laktik dhe acid acetik me përqendrim në diapazonin $24\text{--}282 \pm 0.64$ Kg-1 dhe $21\text{--}77 \pm 0.32$ g Kg-1, përkatësisht. LAB me prodhimin më të lartë të acidit laktik ishin: *L. Plantarum* PP155 (282.31 ± 0.84 g Kg-1), *L. Plantarum* PA850 (227.74 ± 0.29 g Kg-1), *L. Plantarum* MP1691 (143.83 ± 0.45 g Kg-1). Këto vlera mund të shpjegojnë faktin se aktivitetet e lartë antifungale është zbuluar nga këto lloje. Prodhimi i acidit suksinik ($14\text{--}45$ g Kg-1) dhe acidit malik ($6\text{--}13$ g Kg-1) u përcaktua vetëm në pesë dhe gjashtë CFS, përkatësisht. Për më tepër, këto dy acide kishin një përqendrim mesatar më të ulët se acidi laktik dhe acidi acetik. Acidet fenolike të zbuluara në CFS e fermentuar u renditen në Tabelën 4b. Midis tetëmbëdhjetë përbërjeve të analizuar, gjashtë acide fenolike u zbuluan dhe vlerësuan në CFS (acid benzoik, 1-2-dihidroksibenzen, acid DL-3-fenilaktik (DLA), acid p-kumarik, 3-4-dihidroksidrokinamik, acid vanilik). Këto përbërës janë raportuar si agjentë antifungal të prodhuar nga LAB (Omedi et al., 2019). Ashtu si prodhimi i acidit organik, të dhënat e acideve fenolike ndërlidhen me aktivitetin e vërejtur antifungal të CFS. Është dokumentuar një sinergjizëm midis acidit laktik dhe acidit acetik, si dhe midis këtyre dhe DLA në efektin e mundshëm antifungale (Lavermicocca et al., 2003). Një total prej pesëdhjetë VOC-ve janë identifikuar në CFS e lyofilizuar e të fermentuar nga LAB siç tregohet në Tabelën 4b). Përbërjet u klasifikuan në gjashtë grupe sipas klasës së tyre kimike, përkatësisht alkooleve, aldehideve, acideve, ketoneve, pirazinave dhe të tjera. Rezultatet tona në lidhje me frenimin e rritjes së kërpudhave nga VOCs të prodhuara nga bakteret janë në përputhje me të dhënat e raportuara së fundmi.

Acidet	Fermente Laktike									BM 44
	PP155	PA850	PCH375	MP1691	TR71	BL20	BA499	BS 493	PA2	
Lactic acid	282.1 ± 0.84^e	227.74 ± 0.29^d	160.10 ± 0.46^{bc}	143.83 ± 0.45^b	125.10 ± 0.12^b	143.68 ± 1.06^b	24.04 ± 0.08^a	200.26 ± 0.33^{cd}	194.46 ± 0.57^{cd}	34.04 ± 0.08^a
Acetic acid	42.53 ± 0.49^{cd}	76.93 ± 0.78^f	20.77 ± 0.28^a	29.90 ± 0.35^{ab}	30.50 ± 0.49^b	37.49 ± 0.78^{bc}	52.02 ± 1.41^d	66.14 ± 1.49^e	43.18 ± 0.49^{cd}	52.02 ± 1.41^d
Succinic acid	32.31 ± 1.44^b	45.46 ± 1.76^c	28.17 ± 0.56^b	31.97 ± 0.48^b	nd	nd	nd	nd	13.77 ± 0.40^a	nd
Malic acid	9.83 ± 1.81^{ab}	9.17 ± 0.74^{ab}	5.75 ± 0.20^a	Nd	6.85 ± 0.26^a	nd	13.40 ± 2.15^b	Nd	8.03 ± 0.34^a	19.30 ± 2.18^b

Tabela 4a). Identifikimi dhe përcaktimi sasior i acideve organike (g kg-1) të prodhuara nga LAB në CFS. Rezultatet shprehen si devijim mesatar standard. Dallimet statistikisht të rëndësishme për secilin fermentim tregohen me shkronja të ndryshme ($p < 0,01$).

SHKENCAT MJEKËSORE

Patricia Daliu, Roberto Ciampaglia, Antonello Santini

Acide fenolike (mg/mL)

Shtamet	Benzoic acid	DL-3-Phenyl-lactic acid	1-2-Dihydroxy benzene	p-Coumaric acid	3-4-Dihydroxy-hydro Cinnamic	Vanillin acid
PP 155	0.060±0.006	0.184 ± 0.003	0.044± 0.002	Nd	Nd	Nd
PA 850	0.062±0.001	0.297 ± 0.002	Nd	Nd	0.022 ± 0.006	Nd
PCH 375	0.023±0.001	Nd	0.040 ± 0.001	Nd	Nd	Nd
TR71	0.015 ± 0.003	0.844 ± 0.006	Nd	0.002 ± 0.001	Nd	Nd
MP 1691	0.044 ± 0.001	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
BA 493	0.004 ± 0.002	Nd	0.023 ± 0.002	Nd	Nd	0.011 ± 0.001
BS 499	0.051± 0.001	0.377 ± 0.002	0.045± 0.001	0.012 ± 0.001	0.029 ± 0.004	0.023± 0.001
BM 44	0.015± 0.002	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
PA 2	0.021± 0.003	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
BL 20	0.019± 0.002	0.257 ± 0.005	0.015± 0.004	0.002 ± 0.004	0.008± 0.002	Nd

Tabela 4b). Identifikimi dhe sasia e acideve fenolike (mg mL⁻¹) prodhuar nga LAB në CFS.

VOC	PP155	PA850	PCH375	MP1691	TR71	PA2	BL20	BS493	BA499	BM44
ALCOHOLS	4.92± 0.01 ^g	4.84± 0.03 ^g	2.37 ± 0.07 ^d	1.89 ± 0.01 ^c	3.34 ± 0.01 ^f	2.75 ± 0.02 ^c	0.72 ± 0.01 ^b	0.51 ± 0.01 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	1.09 ± 0.01 ^c
Ethanol	0.63 ± 0.01	nd	1.54 ± 0.04	1.32 ± 0.01	0.7 ± 0.01	nd	Nd	nd	nd	1.02 ± 0.01
3-methyl-1-butanol	nd	0.77 ± 0.01	Nd	1.24 ± 0.01	nd	nd	Nd	nd	nd	1.04 ± 0.01
3-methylacetate-1-butanol	nd	nd	Nd	0.25 ± 0.01	nd	nd	Nd	nd	nd	0.15 ± 0.01
2-ethyl-1- hexanol	4.29 ± 0.01	1.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01	1.72 ± 0.02	1.95 ± 0.01	2.56 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.34 ± 0.01	1.02 ± 0.02
2-nonanol	nd	nd	0.76 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.7 ± 0.01	nd	Nd	nd	0.15 ± 0.01	0.23 ± 0.01
2-undecanol	nd	nd	Nd	nd	nd	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	nd	nd	nd
ALDHEYDES	11.89±0.04 ^c	7.67 ± 0.03 ^d	17.86 ± 0.5 ^g	11.93 ± 0.04 ^c	14.21 ± 0.05 ^f	6.88 ± 0.07 ^c	6.04 ± 0.08 ^b	3.97 ± 0.03 ^a	4.44 ± 0.04 ^a	8.93 ± 0.04 ^c
Exanal	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
3-methyl butanal	0.67 ± 0.01	1.21±0.01	1.34 ± 0.04	1.45 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.29 ± 0.01	1.45 ± 0.01
2-methyl butanal	0.35 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.57 ± 0.03	0.55 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.2 ± 0.01
3-methyl-2-hexanal	nd	nd	1 ± 0.03	0.15 ± 0.01	1 ± 0.01	0.17 ± 0.01	Nd	nd	0.58 ± 0.01	nd
2- ethyl- hexanal	0.67 ± 0.01	nd	Nd	0.14 ± 0.01	nd	0.37 ± 0.01	Nd	nd	0.14 ± 0.01	nd
Benzaldehyde	4.58 ± 0.01	2.57 ± 0.01	6.41 ± 0.16	3.82 ± 0.02	4.96 ± 0.01	2.12 ± 0.04	2.32 ± 0.03	1.6 ± 0.02	1.63 ± 0.02	1.32 ± 0.03
Benzene	4.13 ± 0.03	2.19 ± 0.02	6.35 ± 0.19	4.2 ± 0.02	4.94 ± 0.02	2.37 ± 0.01	2.55 ± 0.03	1.46 ± 0.01	1.41 ± 0.01	1.55 ± 0.03
Acetaldehyde										
Methional	0.95 ± 0.01	0.67 ± 0.01	1.61 ± 0.05	1.2 ± 0.01	1.47 ± 0.01	nd	Nd	0.43 ± 0.01	nd	nd
Nonanal	0.57 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.62 ± 0.03	0.46 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.68 ± 0.01
ACIDS	9.45 ± 0.01 ^a	11.12 ± 0.04 ^b	18.75 ± 0.46 ^f	13.36 ± 0.02 ^d	18.14 ± 0.09 ^f	20.81 ± 0.22 ^g	13.96 ± 0.13 ^c	12.71 ± 0.09 ^e	9.2 ± 0.08 ^a	9.96 ± 0.13 ^c
acetic acid	6.5 ± 0.01	7.97 ± 0.01	11.69 ± 0.29	9.45 ± 0.01	11.53 ± 0.04	14.25 ± 0.2	9.78 ± 0.06	8.22 ± 0.04	7.31 ± 0.07	9.78 ± 0.06
3-methyl-butanoic acid	1.66 ± 0.01	1.73 ± 0.03	3.4 ± 0.07	2.15 ± 0.01	3.02 ± 0.04	3.36 ± 0.02	1.6 ± 0.02	2.09 ± 0.04	1.13 ± 0.01	1.6 ± 0.02
2-methyl-butanoic acid	1.29 ± 0.01	1.23 ± 0.01	2.37 ± 0.06	1.56 ± 0.01	2.2 ± 0.01	2.27 ± 0.01	1.2 ± 0.02	1.51 ± 0.01	0.78 ± 0.01	1.1 ± 0.02
octanoic acid	Nd	0.2 ± 0.01	1.3 ± 0.04	0.22 ± 0.01	1.4 ± 0.01	0.47 ± 0.01	1.4 ± 0.05	0.91 ± 0.01	nd	1.4 ± 0.05
2-methyl propanoic acid	Nd	nd	Nd	nd	nd	0.48 ± 0.01	Nd	nd	nd	nd
KETONES	Nd	0.16 ± 0.01 ^a	Nd	nd	0.4 ± 0.01 ^b	1.51 ± 0.02 ^d	1.29 ± 0.01 ^c	2.44 ± 0.04 ^c	0.11 ± 0.01 ^a	1.29 ± 0.01 ^c
2-heptanone	Nd	nd	Nd	nd	0.4 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.65 ± 0.01	1.41 ± 0.03	nd	0.65 ± 0.01
Acetophenone	Nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-undecanone	Nd	0.16 ± 0.01	Nd	nd	nd	0.54 ± 0.01	0.65 ± 0.01	1.04 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.65 ± 0.01
PYRAZINES	50.31 ± 0.04 ^e	64.61 ± 0.17 ^f	39.14 ± 3.35 ^b	47.79 ± 0.11 ^c	36.47 ± 0.24 ^b	53.55 ± 0.29 ^d	62.04 ± 0.3 ^c	70.77 ± 0.69 ^f	74.01 ± 0.77 ^f	62.04 ± 0.3 ^c
methyl-pyrazine	1.79 ± 0.01	3.06 ± 0.02	2.73 ± 0.08	1.5 ± 0.02	2.9 ± 0.03	2.02 ± 0.02	2.18 ± 0.02	1.75 ± 0.01	1.66 ± 0.01	2.18 ± 0.02

Tabela 4c) Identifikimi dhe sasia e komponimeve organike të avullueshme (VOC) (%) të prodhuara nga LAB në CFS.

3.4 Vlerësim *in vivo*: *Lactobacillus plantarum* PP155 dhe *Lactobacillus plantarum* PA850 si një agjent bio konservant në kulturën e domateve.

Meqenëse aktiviteti antimikotik është vërejtur me i shprehur vetëm për *Lactobacillus plantarum* PP155 dhe *Lactobacillus plantarum* PA850 këto dy shtame janë konsideruar si rast studimi duke përdorur domate si matricë ushqimore. Grafiku 1a) dhe 1 b) tregon efektin bio-ruajtës të CFS të fermentuar nga *L. plantarum* PP155 dhe *L. plantarum* PA850 në domatet e inokuluara me *A. flavus* dhe *P. expansum*, gjatë ruajtjes. Në veçanti, afati i ruajtjes së domates së inokuluar me *A. flavus* nuk paraqiti një rritje të konsiderueshme ($p > 0.01$) krahasuar me kontrollin. I gjithë trajtimi evidentoi $> 70\%$ domate të infektuara pas inkubacionit për 7 d. Analiza mikrobiologjike e popullatës së kërpudhave konfirmoi mungesën e frenimit të rritjes së kërpudhave në domate të trajtuara me CFS PP 155. Sidoqoftë, domatet e inokuluara me *P. expansum* dhe të trajtuara me CFS PP850 treguan një jetëgjatësi të përmirësuar dukshëm siç tregohet në Figurën 3. Në eksperimentin e kontrollit, përqindja e domateve të infektuara në ditën 9 të inkubacionit ishte 100%, ndërsa, kur aplikuan CFS nga *L. plantarum* PP155 dhe *L. plantarum* PA850, vlerat ishin përkatësisht 29% dhe 65%. Të dhënat e vëzhguara të afatit të ruajtjes së domateve të inokuluara me *P. expansum* dhe të trajtuara me CFS u konfirmuan nga analiza mikrobiologjike. Eksperimenti i kontrollit në 9 d të inkubacionit, paraqiti një popullatë kërpudhore prej 7.56 spore $\log_{10} g^{-1}$, ndërsa në domatet e trajtuara me CFS të fermentuara nga *L. plantarum* PP155, u vu re reduktim ($p < 0.01$) i kërpudhave prej 5.58 spore $\log_{10} g^{-1}$. Në trajtimin me CFS të fermentuar nga *L. plantarum* PP850, domatet e infektuara të inkubuara për 9 d, paraqitën një reduktim të konsiderueshëm sporesh ($p < 0.01$) prej 3,67 \log_{10} spore g^{-1} .

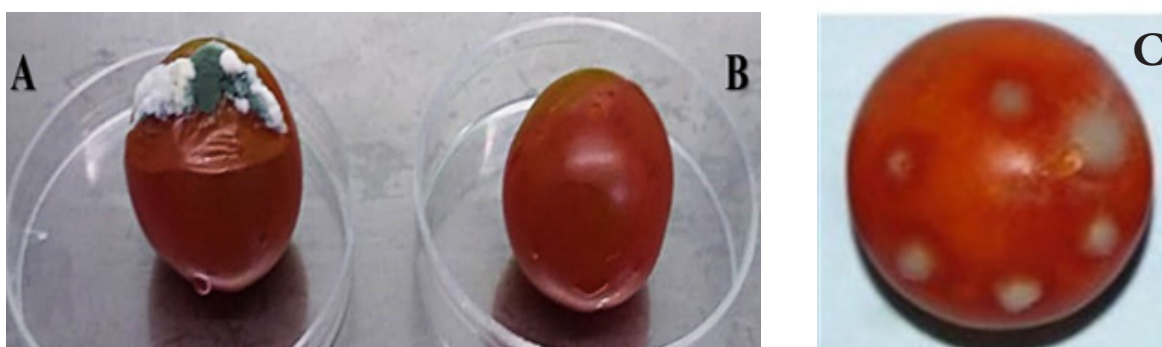


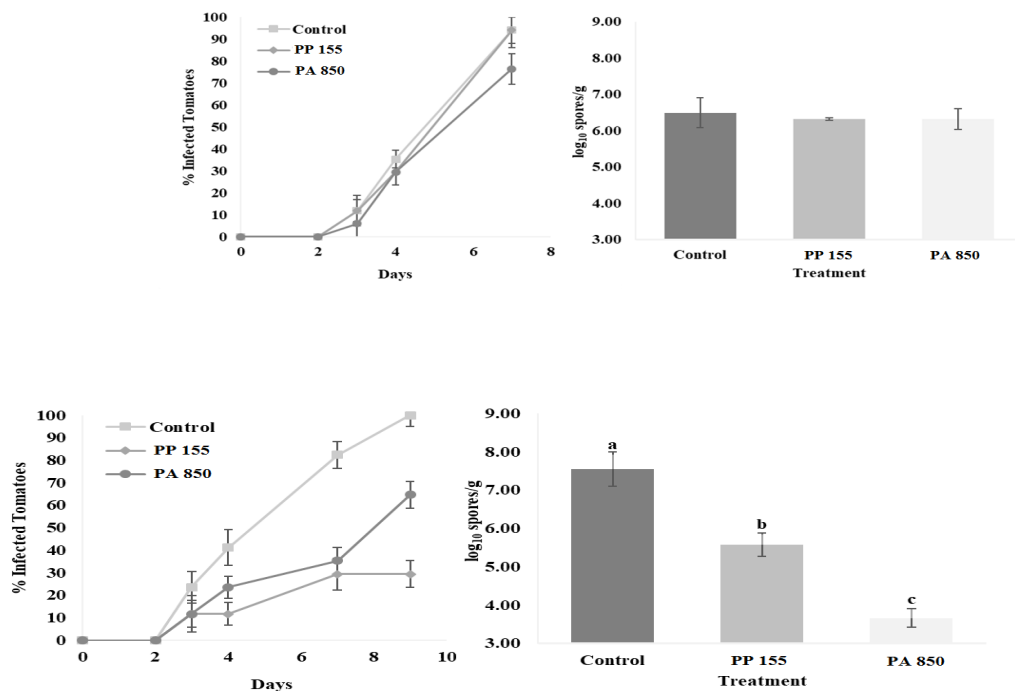
Figura 3. Rritja e kërpudhave të *Penicillium expansum* në domate të trajtuara me

(A) sterile MRS Broth Medium

(B) *Lactobacillus plantarum* PP850 CFS

(C) *Lactobacillus plantarum* PP155 CFS pas 9 d inkubimi

Patricia Daliu, Roberto Ciampaglia, Antonello Santini



Grafiku 1: A) Efektet e *Lactobacillus plantarum* PP155 dhe *Lactobacillus plantarum* PP850 CFS në rritjen e *Aspergillus flavus* ITEM 8111 dhe B) *Penicillium expansum* CECT 2278 në domatet. Rezultatet shprehen si% e domateve të infektuara dhe numërimet mikrobiologjik (log₁₀sporet g⁻¹). Dallimet statistikiisht të rëndësishme për secilin trajtim tregohen me shkronja të ndryshme (p <0,01). Rezultatet shprehen si devijim standard.

4. Diskutime

Ndotja e mundshme e mikotoksinave në lëndët e para dhe / ose në ushqimet e kultivuara është një rrezik serioz për shëndetin e popullatës ¹¹. Shfaqja e mundshme e mikotoksinave në produkte me origjinë vegjetale mund të ndikojë në proceset e nxjerrjes dhe përqendrimit të përbërësve aktivë, duke përfaqësuar një pikë kritike për t'u monitoruar e për të siguruar ushqim të sigurt. Megjithatë efikasitetin e përbërjeve kimike sintetike në eliminimin e kërpudhave që prodhojnë mikotoksina, mbetjet e shumë kimikateve paraqesin rreziqe shëndetësore për njerëzit dhe kafshët. Për shkak të toksicitetit të këtyre ksenobiotikëve ekzogjenë të përdorur për të zvogëluar prodhimin e mikotoksinës dhe rritjen e kërpudhave, janë kryer studime të shumta për të identifikuar qasje të reja natyrore efektive ¹²⁻¹³. Ky kërkim shkencor hedh dritë duke testuar për herë të parë shtamet e vecanta të gjinisë *Lactobacillus spp* dhe *Bacillus spp* si alternativa të përshtatshme me qëllim zvogëlimin e rrezikut të mundshëm toksikologjik. Nga kjo pikëpamje e studimit përdoren vetitë e agjentëve të bio-kontrollit. Eksperimentet antifungale *in vitro* demonstrojnë se CFS e fermentuara nga shtame të ndryshme të *Lactobacillusn* PP155 dhe PP850 kanë aktivitet të rëndësishëm antifungale kundër një spektri të gjerë të kërpudhave toksigjene. Këto efekte mund të vijnë nga bakteriocinat të cilat janë substanca dytësore metabolike të prodhuar nga shtamet e fermenteve laktike. Për më tepër, aplikimi i CFS si një bio-konservues i ri në domate, i zgjedhur si një rast studimi, ku rezultatet e të cilit mund të shtrihen në matricat e tjera ushqimore vegjetale, evidentuan një reduktim të rritjes së *Penicillium expansum* shoqëruar me zgjatje të jetëgjatësisë së produktit. Aplikimi premtues i paraqitur në këtë studim për të zvogëluar ndotjen e mikrofungjeve dhe për të rritur afatin e ruajtjes pas vjeljes së domateve, është efikas për të mbrojtur nga ndotja e mikotoksinave. Kjo kontribuon në plotësimin e kërkesës së konsumatorëve për të zvogëluar përdorimin bujqësor të përbërjeve sintetike dhe për të rritur zgjedhjen e alternativave të përshtatshme natyrore. Shtamet e vlerësuara në këtë studim mund të konsiderohen si një strategji për frenimin e kërpudhave toksigjene dhe si një zëvendësim për përbërjet sintetike në ruajtjen e ushqimit dhe përgatitjet ushqyese.

Referencat

1. Woo, Sh. L. Pepe, O. *Microbial Consortia: Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture*. *Front. Plant Sci.* 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.01801.
2. Verbeker, W. *Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants*. *Food quality and preference*. 2005.16. 45-57.
3. Pleadin, J., Perši, N., Mitak, M., Terzić, S., Milić D., Vulić A., Brstilo M. *Biochemical changes in pig serum after ochratoxin A exposure*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2012.88:1043–1047.
4. Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J. *Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. 67. 3630–3635.
5. Saladino, F., Luz, C., Manyes, L., Fernández-Franzón, M., Meca, G. *In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement*. *Food Control*. 2016. 67, 273-277.
6. Yang, J., Li, J., Jiang, Y., Qu, H., Yang, B., Chen, F., Sivakumar, D. *Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014. 54, 64–83.
7. Zain, M.E., *Impact of mycotoxins on humans and animals*. *J. Saudi Chem. Soc.* 2011.15, 129–144.
8. Rodríguez-Carrasco, Y., Moltó, J.C., Mañes, J., Berrada, H., 2014. *Exposure assessment approach through mycotoxin/creatinine ratio evaluation in urine by GC–MS/MS*. *Food Chem. Toxicol.* 72, 69-75.
9. Jabłońska-Trypuć, A., Wołejko, E., Wydro, U., Butarewicz, A. *The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor*. *J. Environ. Sci. Heal. B.* 2017. 52, 483-494.
10. Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E. *Potential of a new strain of Bacillus amyloliquefaciens BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases*. *Food Microbiol.* 2017. 63, 101-110.
11. Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., Barat, J.M. *Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: A review*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017. 58, 2002-2016.
12. Croëley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D. *Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives*. *Trends Food Sci. Technol.* 2013. 33, 93-109.
13. Chenoll, E., Moreno, I., Sánchez, M., Garcia-Grau, I., Silvia, A., González-Monfort, M., Genovés, S., Vilella, F., Seco-Durban, C., Simón, C., Ramón, D. *Selection of New Probiotics for Endometrial Health*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019, 9, 114.