

VYUŽITÍ SYROVÁTKY JAKO RŮSTOVÉHO MÉDIA PRO NISIN PRODUKČNÍ KMENY LAKTOKOKŮ

Gabriela Kunová¹, Vladimír Sedlařík²,
Marcela Klimešová¹, Zuzana Rašková², Ivana Hyršlová¹,
Alexandra Šalaková¹, Vladimír Dráb¹

1 - Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

2 - Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Use of whey as a growth medium for nisin producing bacteria

Abstrakt

Nisin je nejstarším a nejvíce prostudovaným bakteriocinem patřícím do skupiny lantibiotik. Vyrábí se komerčně a je schválen Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jako tzv. potravinářské konzervační aditivum. Předmětem studie bylo otestovat produkci nisinu u souboru pěti kmenů laktokoků (CCDM 414, 416, 418, 71 a 731) ze Sbírký mikroorganismů Laktoflora[®], u kterých již byla prokázána přítomnost nisinového operonu. Produkce nisinu byla testována agarovou difúzní metodou, přičemž, sledována byla závislost na růstovém médiu, pH, teplotě a některých dalších podmínkách. Z růstových médií se jevil jako nejvhodnější BHI bujón (resp. agar), kultivační teplota 30 °C a podmínky kultivace s provzdušňováním. Z pěti testovaných kmenů druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, pouze 2 kmeny aktivně produkovaly nisin, a to kmeny CCDM 71 a CCDM 731. U těchto dvou kmenů byl sledován jejich růst v sladké a kyselé syrovátce. Sladká syrovátka byla vyhodnocena jako velmi dobrý růstový substrát pro oba testované kmeny.

Klíčová slova: nisin, laktokoky, syrovátka, nisin produkční kmeny

Abstract

Nisin is one of the most-studied bacteriocins belonging to the group of lantibiotics. It is produced commercially and is approved by the World Health Organisation (WHO) as a food preservative. The aim of this study was to test the nisin production in a group of five strains of lactococci (CCDM 414, 416, 418, 71 and 731) from the Collection of dairy microorganisms Laktoflora[®]. In these strains, the presence of nisin operon, using PCR methods, has been demonstrated previously. The agar diffusion method was used for nisin production testing, wherein, different cultivation conditions (temperature, pH, growth media etc.) were tested. The best cultivation conditions were evaluated as follows: BHI broth as a growth medium, temperature of 30 °C and culture conditions with aeration. Only two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 71 and CCDM 731) were able to actively produce nisin. In these

strains, the growth in both sweet and sour whey was tested. Sweet whey was evaluated as very good growth substrate for both strains tested.

Key words: nisin, lactococci, whey, nisin producing strains

Úvod

Syrovátka je stále z velké části nedostatečně využívána, ačkoli obsahuje významné nutriční látky a je výborným fermentačním médiem pro řadu mikroorganismů, především těch, které využívají laktózu. Předmětem této aktivity je výzkum fermentačního procesu mikroorganismů, které jsou schopné využívat syrovátku jako růstové médium k produkci antimikrobiálních látek, konkrétně nisinu. Produkce těchto látek a jejich aktivita je významně ovlivněna podmínkami kultivace produkčních mikroorganismů. Jedná se především o optimální teplotu, pH, délku kultivace, složení růstového média, fáze růstu, koncentraci testované a indikátorové kultury apod. Bakteriociny představují antimikrobiální substance produkované některými bakteriemi mléčného kvašení (BMK). Bakteriociny se využívají v medicíně, dále mohou být aplikovány v potravinářství ke konzervaci potravin (při výrobě sýrů apod.). V současnosti je nejznámějším bakteriocinem nisin, který je zároveň jako jediný ze skupiny bakteriocinů považován za bezpečný (GRAS - generally recognized as safe) podle FDA (FDA, 2001). Nisin patří do skupiny lantibiotik a je produkován některými kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči gram pozitivním bakteriím rodů *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* a dalším (Montville a kol., 1999). Existuje několik forem nisinu, a to Nisin A, Z, F a Q, které jsou produkovány druhy *Lactococcus lactis* a Nisin U a U2 produkovány druhy rodu *Streptococcus* sp. (Piper a kol., 2010). Nisin je účinný vůči výše zmiňovaným gram pozitivním bakteriím, zatímco na gram negativní bakterie, viry, kvasinky a plísňe přímo nepůsobí (Li a kol., 2005). Jeho použití v potravinách upravuje Nařízení komise č. 1129/2011, které povoluje nisin (E234) jen v některých výrobcích a omezuje i maximální koncentraci. Z chemického hlediska se jedná o látku bílkovinné povahy, polypeptid (Stoyanova a kol., 2005), který způsobuje rozrušení cytoplazmatické membrány citlivých bakteriálních buněk (Roces a kol., 2012). Nisin se vyrábí komerčně, a to řízenou fermentací kmenů laktokoků druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* za regulovaných podmínek (De Vuyst a Vandamme, 1994). Optimální podmínky pro biosyntézu nisinu (růstové médium, pH, kultivační podmínky, přídavek suplementů atd.) jsou v odborné literatuře hodně diskutovány. V rámci řešení projektu Mze č. QF3163 (2003-2007), jehož cílem bylo hledání producentů nisinu s detekcí nisinového operonu (využitím PCR) u kmenů laktokoků pocházejících ze Sbírký Laktoflora[®] (ČR), bylo vybráno 7 kmenů druhu *Lactococcus lactis* u kterých se přítomnost genu odpovědného za produkci nisinu potvrdila (Dušková a kol., 2009). Přítomnost samotného operonu

však nemusí zákonitě znamenat, že ve skutečnosti daný kmen nisin produkuje, příp. ne za jakýchkoliv okolností. Cílem této práce bylo pomocí agarové difuzní metody otestovat skutečnou produkci nisinu a vytipovat aktivní nisin-produkující kmeny laktokoků. V další aktivitě byly odzkoušeny sladká a kyselá syrovátka, jako růstová média pro bakterie s ohledem na produkci nisinu.

Materiál a metodika

Použité kmeny

Seznam použitých kmenů je uveden v tabulce 1. Kmeny laktokoků pocházejí ze Sbírký mikroorganismů Laktoflora® (ČR) a kmeny mikroků byly obstarány ze Sbírký mikroorganismů v Brně (ČR).

Tab. 1 Seznam použitých kmenů

Sbírkové číslo	Druh	Poznámka
CCDM 71	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	přítomný nisin ⁺ gen
CCDM 731	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	přítomný nisin ⁺ gen
CCDM 418	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	přítomný nisin ⁺ gen
CCDM 414	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	přítomný nisin ⁺ gen
CCDM 416	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	přítomný nisin ⁺ gen
S 32	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	použití jako negativní kontrola, nisinový operon není přítomný
ATCC 10240	<i>Micrococcus luteus</i>	referenční grampozitivní kmen, nisin-sensitivní
CCM 732	<i>Micrococcus luteus</i>	referenční grampozitivní kmen, nisin-sensitivní

Testování souboru laktokoků z hlediska produkce nisinu

Tvorba nisinu byla sledována pomocí agarové difuzní metody (Chumchalová a kol., 1995; Tramer a Fowler, 1964; Dodd a kol., 1996). Tato metoda se zakládá na inhibici růstu indikátorového grampozitivního kmene *Micrococcus luteus* nisinem, produkovaným testovanými kmeny laktokoků za vzniku inhibičních zón růstu. Čerstvě narostlá suspenze kmene *Micrococcus luteus* byla smíchána se živným agarem v Petriho misce. Do ztuhlého agaru byly napipetovány supernatanty (50 µl), získané ze suspenzí testovaných kmenů. Suspenze testovaných kmenů byla připravena po kultivaci v M17 bujonu (Merck, Německo) při teplotě 30 °C po dobu 24 hod. Po kultivaci bylo růstové médium okyseleno přídatkem HCl tak, aby se pH média pohybovalo v rozmezí 2-3. Následně byla směs tepelně ošetřena při 98 °C po dobu 5 min a odstředěna (6 000 g, 7 min). Společně s takto získanými suspenzemi byla do jamek odpipetována koncentrační řada nisinového preparátu "Nisin from *Lactococcus lactis*" (Sigma-Aldrich, ČR) o deklarované síle preparátu 1000 000 IU/g. Přípraveny byly roztoky o síle 10² - 10⁶ IU/g rozpuštěním preparátu ve sterilní vodě. Misky byly následně uloženy do lednice při 4 °C po dobu 2 hod a poté kultivovány v termostatu při 37 °C/ 24 hod. Po inkubaci byly odečítány průměry inhibičních zón (uváděny v mm).

Stanovení podmínek růstu laktokoků

Za účelem stanovení optimálních podmínek pro produkci nisinu u jednotlivých kmenů byl odzkoušen vliv různých podmínek (médium, pH, teplota, doba kultivace apod.). Pro kultivaci byla odzkoušena kultivační média M17 bujon (Merck, Německo) a BHI bujon (HiMedia, Indie). Laktokoky byly kultivovány na třepače a v promývače při 36 °C a 30 °C po dobu 24 hod, a to inokulací 1 kličky čerstvě narostlé kultury do 100 ml pomnožovacího média. Dále byly kmeny testovány dle výše uváděného postupu, tj. agarovou difuzní metodou a také metodou aplikací disků na povrch kultivačního média. Disky byly ponořeny do připravených očkovacích médií s laktokoky a nisinem, po zatuhnutí agaru s indikátorovým kmenem *M. luteus* ATCC 10240 byly aplikovány na povrch kultivačního média, uloženy do lednice při 4 °C po dobu 2 hod a poté kultivovány v termostatu při 37 °C/ 24 hod. Kvůli možnému inhibičnímu účinku byl otestován i vliv přídatku HCl. Do 10 ml destilované vody bylo přidáno 350 µl HCl a poté sterilizováno v autoklávu při 100 °C/5 min. Do jamek bylo následně aplikováno 0,2 ml suspenze, misky byly uloženy do lednice na 2 hod a poté kultivovány v termostatu při 37 °C/24 hod.

Testování produkce nisinu v syrovátce

Pro testování produkce nisinu v syrovátce byly vybrány na základě výsledků předchozí aktivity dva aktivní nisin-produkční kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 71 a CCDM 731. Jako růstové substráty byly použity sladká a kyselá syrovátka, bez přídatku suplementů a jako srovnávací médium byl použit M17 bujon (Merck, Německo). Do příslušných substrátů byly zaočkovány oba testované kmeny laktokoků (inokulum 2%) nacházejících se v exponenciální růstové fázi. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C/24 hod.

Výsledky a diskuze

Testování laktokoků z hlediska produkce nisinu

Výsledky produkce nisinu u souboru testovaných laktokoků za použití referenčního kmene ATCC 10240 jsou uvedeny v Tabulce 2. Testovány byly dva typy agarů, a to M17 a BHI agar. Produkce nisinu byla testována za použití výše zmíněné agarové difuzní metody, přičemž do jamek byly aplikovány jak tepelně neupravené supernatanty bakteriálních suspenzí, tak okyselené (pomocí HCl) a následně tepelně ošetřené supernatanty. Testované kmeny laktokoků mohou produkovat i jiné typy bakteriocinů než nisin, příp. látky s antimikrobiálními účinky, jako např. organické kyseliny (kys. mléčná), lysozym a další, které v konečném důsledku mohou také způsobit rozpad grampozitivních bakteriálních buněk.

Z tabulky 2 je zřejmé, že ze souboru testovaných kmenů laktokoků vykazovaly inhibiční účinek pouze dva kmeny, a to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 71. Průměry inhibičních zón (v mm) dosahovaly vyšších hodnot za použití BHI agaru, ve srovnání s M17 agarem. Ostatní

Tab. 2 Produkce nisinu u souboru laktokoků (údaje jsou vyjádřeny jako průměry inhibičních zón v mm ze 3 měření \pm SD)

	M17 agar supernatant	M17 agar okyselený supernatant	BHI agar supernatant	BHI okyselený supernatant
S32	-	-	-	-
CCDM 416	-	-	-	-
CCDM 731	12,0 \pm 3,5	12,0 \pm 1,7	16,7 \pm 4,2	13,7 \pm 1,5
CCDM 71	11,7 \pm 1,5	11,7 \pm 1,5	19,0 \pm 4,4	14,7 \pm 2,3
CCDM 418	-	-	-	-
CCDM 414	-	-	-	-

kmeny (CCDM 416, CCDM 418 a CCDM 414) rostly pomalu nebo vůbec a opakovanou kultivací přestaly růst i při provzdušňování v promývacích lahvích. Kmen S32 sloužil jako negativní kontrola, inhibiční zóny pozorovány nebyly.

Z výsledků je také patrné, že po okyselení a následném tepelném ošetření bakteriálních suspenzí jsou vzniklé inhibiční zóny menší ve srovnání se zónami vzniklými kolem tepelně neošetřených supernatantů. Lze předpokládat, že aktivita kmenů v případě neošetřených supernatantů byla způsobena jinými bakteriálními metabolity než je nisin, např. organickými kyselinami. U okyselených a tepelně ošetřených supernatantů byly tyto metabolity eliminovány a z tohoto důvodu byly i průměry zón menší. Použitá metodika agarové difúzní metody s využitím centrifugace, okyselení a tepelného ošetření supernatantu testované bakteriální suspenze je založena na principu stability nisinu v kyselém prostředí (Garcera a kol., 1993).

Co se týká výběru kultivačního média a postupu kultivace laktokoků, v testovaných kultivačních bujonech (M17 a BHI) byly počty laktokoků vyšší v BHI bujonu. Srovnáním kultivace laktokoků (KTJ/ml) na třepačce a v promývacích lahvích byly prokázány mnohem lepší výsledky v promývacích lahvích za stálého provzdušňování růstového média a to při teplotě 30 °C. Rozdíly ve velikosti inhibičních zón u kmene CCDM 731 považované ve vodní lázni a v autoklávu byly nepatrné. Je zřejmé, že nedošlo k žádným výrazným změnám mezi použitými postupy. Rovněž nebyly pozorovány změny mezi použitím centrifugace 4000 nebo 8000 ot/min.

Kmeny upravené kyselinou chlorovodíkovou vykazovaly o něco menší inhibiční zóny. Je však nutno dodat, že inhibiční zóny způsobené HCl nebyly ve srovnání se suspenzí s nisinem tak průzračně jasné a ostře ohraničené. Přesto se dá z výsledků usuzovat, že použití HCl k úpravě testovaných kmenů *L. lactis* může mít vliv na velikost inhibiční zóny.

Produkce nisinu v syrovátce

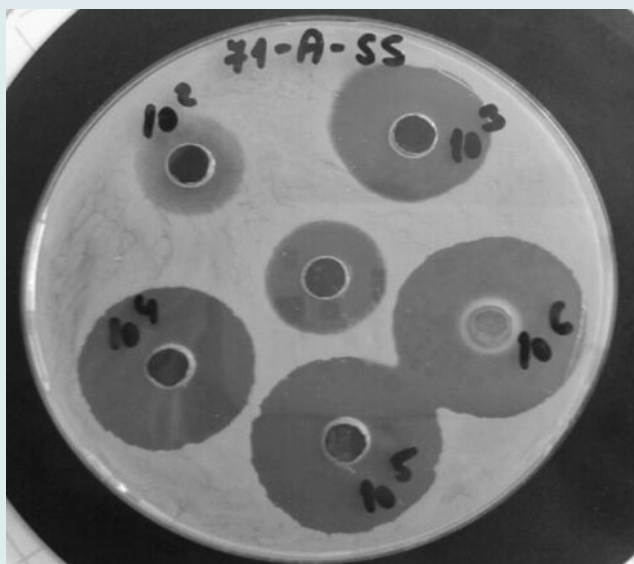
Prokysání substrátů v závislosti na poklesu hodnot pH je uvedeno v tabulce 3. U obou testovaných kmenů laktokoků bylo nejnižšího pH dosaženo v sladké syrovátce (4,27 u kmene CCDM 71 a 4,16 u kmene CCDM 731). Nepatrně slabší pokles byl dosažen po 24-hodinové kultivaci v bujonu M17 (4,79 a 4,83), zatímco nejmenší pokles pH byl zaznamenán v kyselé syrovátce, kde hodnoty pH zůstaly těsně nad hodnotou 5. Výchozí pH bylo upraveno

na hodnotu 6 jak u kyselé, tak u sladké syrovátky. Z výsledků lze konstatovat, že sladká syrovátka se jeví jako vhodný růstový substrát pro oba testované kmeny laktokoků.

Tab. 3 pH médií po 24-hodinové fermentaci

Vzorek	pH
71-SS	4,27
731-SS	4,16
731-KS	5,05
71-KS	5,18
71-M17	4,79
731-M17	4,83

KS - kyselá syrovátka, SS - sladká syrovátka, M17 bujon
731, 71 - kmeny laktokoků (CCDM 71 a CCDM 731)



Obrázek 1 Znázornění produkce nisinu pomocí agarové difúzní metody u kmene CCDM 71 v sladké syrovátce (centrální jamka) ve srovnání s koncentrační řadou nisinového preparátu o síle 10^2 - 10^6 IU/ml

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že ze souboru pěti testovaných laktokoků druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pouze 2 kmeny aktivně produkují bakteriocin nisin, a to CCDM 71 a CCDM 731. V dalších pokusech a aplikacích budou tedy využívány zejména tyto kmeny. Pro kultivaci kmenů laktokoků je nejvhodnější BHI bujon (resp. agar), teplota kultivace 30 °C a podmínky kultivace s provzdušňováním. Pro testování inhibičních účinků je možné využít jak metodu difúzních jamek, tak metodu pomocí disků. Z indikátorových kmenů bude pro další experimentální aktivity používán kmen *Micrococcus luteus* ATCC 10240, u kterého byla potvrzena vyšší citlivost vůči nisinu. Výsledky naznačují, že sladká syrovátka se jeví jako vhodný růstový substrát pro oba testované kmeny zkoumaných laktokoků.

Poděkování

Práce vznikla za podpory MZe, NAZV program KUS, č. projektu QJ1310254.

Literatura

- De VUYST, L., VANDAMME (1994): Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. *Blackie Academic and Professional*, London, s. 151-221.
- DODD, H.M., HORN, N., GIFFARD, C.J., GASSON, M.J. (1996): A gene replacement strategy for engineering nisin. *Microbiology*, 142, s. 47-55.
- DUŠKOVÁ, M., ŠPANOVÁ, A., DRÁB, V., RITTICH, B. (2009): Searching for genes of *Lactococcus lactis* encoding the bacteriocin nisin using DNA/DNA hybridization. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, s. 366-368.
- FDA (2001): Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000065: August 2005. Washington, D.C.: Department of Health and Human Services. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g065.html>.
- GARCERA, M.J.G., ELFERINK, M.G.L., DRIESSEN, A.J.M., KONINGS, W.N. (1993): In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. *European Journal of Biochemistry*, 212, s. 417-422.
- CHUMCHALOVÁ, J., JOSEPHSEN, J., PLOCKOVÁ, M. (1995): Characterization of acidocin CH5, a saccharolytic sensitive bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 17, s. 145-150.
- LI, T., TAO, J., HONG, F. (2005): Study on The Inhibition Effect of Nisin. *The Journal of American Science*, 1(2), s. 33-37.
- MONTVILLE, T.J., CHUNG, H.J., CHIKINDAS, M.L., Chen, Y. (1999): Nisin A depletes intracellular ATP and acts in a bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*. *Letters in Applied Microbiology*, 28, s. 189-193.
- PIPER, C., HILL, C., COTTER, P.D., ROSS, R.P. (2010): Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbial Biotechnology*, 4(3), s. 375-382.
- ROCES, C., COURTIN, P., KULAKAUSKAS, S., RODRIGUEZ, A., CHAPOT-CHARTIER, M.P., MARTINEZ, B. (2012): Isolation of *Lactococcus lactis* Mutans Simultaneously Resistant to the Cell Wall-Active Bacteriocin Lcn972, Lysozyme, Nisin, and Bacteriophage c2. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (12), s. 4157-4163.
- STOYANOVA, L.G., SULTIMOVA, T.D., BOTINA, S.G., NETRUSOV, A.I. (2005): Isolation and Identification of New Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Milk. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(5), s. 492-499.
- TRAMER, J., FOWLER, G.G. (1964): Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15, s. 522-528.

Přijato do tisku: 13. 9. 2014

Lektorováno: 28. 9. 2014

PLOTNOVÁ DIFUZNÍ METODA PRO STANOVENÍ REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉČE

Pavína Navrátilová¹, Jana Vyháňková¹,
Jaroslava Jeřábková²

¹ Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, Brno

² Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93, Jihlava

THE PLATE DIFFUSION METHOD FOR DETERMINING INHIBITORY SUBSTANCE RESIDUES IN MILK

Souhrn

Pro ochranu zdraví spotřebitele i pro zajištění kvalitní suroviny pro výrobu mléčných výrobků je nezbytná kontrola přítomnosti reziduí inhibičních látek v mléce.

Plotnová difuzní metoda zaujímá po řadu let významné postavení v systému kontroly reziduí antimikrobiálních látek v surovinách a potravinách živočišného původu v ČR i ve světě. Článek poskytuje informaci o historii vývoje plotnových metod a o jejich využití v současnosti.

Klíčová slova: plotnová difuzní metoda, využití, princip

Summary

To protect the health of a consumer and to ensure the quality of raw milk in the production of dairy products, it is necessary to monitor the presence of inhibitory substance residues in milk. The plate diffusion method holds an important position in the monitoring system for antimicrobial substance residues in raw materials and foodstuffs of animal origin in the Czech Republic and in the world. This article provides information about the historical development of the plate diffusion method and informs about its current use.

Key words: plate diffusion method, use, principle

Úvod

Z historického hlediska je analýza reziduí antimikrobiálních látek v potravinách relativně mladá disciplína. První znepokojení vztahující se k přítomnosti reziduí antibiotik v potravinách bylo vysloveno zpracovateli mléka, kteří si všimli, že mléko kontaminované antibiotiky inhibuje růst startovacích kultur používaných v mlékárenském průmyslu a také ovlivňuje výsledek testu s metylenovou modří. Impuls pro vývoj a zavedení metod pro kontrolu reziduí inhibičních látek (RIL) vyšel od zpracovatelů mléka. V období 1947-1967 se intenzívně pracovalo na vývoji metod a následně byla řada metod pro detekci RIL v mléce uvedena do praxe. K prvním metodám využitým pro kontrolu přítomnosti reziduí antimikrobiálních látek v potravinách patřily mikrobiologické metody, i když byly původně vyvinuty pro aplikaci v klinické medicíně. Do skupiny mikrobiologických inhibičních metod řadíme plotnové difuzní metody, které zaujímají od 60. let 20. století důležité postavení v systému kontroly reziduí antimikrobiálních látek v surovinách a potravinách živočišného původu (Mitchell a kol., 1998, de Brabander a kol., 2009).

Již v roce 1952 byl aplikován první mikrobiologický inhibiční test s testovacím kmenem *Bacillus subtilis*. V roce 1978 byla vyvinuta standardní plotnová metoda s kmenem *Bacillus stearothermophilus* (Mitchell a kol., 1998) a v roce 1980 byla v Německu představena Bogaertsem a Wolfem 4-plotnová metoda, která se dodnes využívá a je součástí multi-plotnových metod. IDF se koncem 70. let 20. století začala intenzívně věnovat problematice RIL v mléce. V roce 1987 bylo vydáno speciální číslo bulletinu (Bulletin 283/1993) zaměřené na význam RIL v mléce a metody detekce RIL. Plotnové difuzní metody byly zařazeny mezi screeningové metody a doporučeny i jako post-screeningové konfirmační metody. Na základě doporučení IDF byly v praxi aplikovány následující plot-