

**Literatúra**

- GOLNER F. VALÍK L. (2004): Aplikovaná mikrobiologie požívání. Bratislava, Malé centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- LEITE A.M.O., MAYO B., RACHID C.T.C.C., PEIXOTO R.S., SILVA J.T., PASCHOALIN V.M.F., DELGADO S. (2012): Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefirgrains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* 31, s. 215-221.
- LIU W., BAO Q., JIRIMUTU Q. M., SIRIGULENG C. X., SUN T., LI M., ZHANG J, YU J., BILIGE M., SUN T., ZHANG H. (2012): Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiol. Res.* 167, s. 110-115.
- MUYZER G., De WAAL E.C., UITERLINDEN A.G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, s. 695-700.
- SAMBROOK J., RUSSEL D.W. (2001): Molecularcloning: A laboratory manual (II), 3rded. New York, Cold Spring Laboratory Harbor Press, 2100 s. ISBN-13: 978-0879695774.
- SINDEN R. R. (1994): DNA Structure and Function, San Diego, Academic Press, s. 34. ISBN-10: 0-12-645750-6.
- RITTICH B., ŠPANOVÁ A., ŠÁLEK P., NĚMCOVÁ P., TRACHTOVÁ Š., HORÁK D (2009): Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethyleneglykol)-NaCl water solutions. *J. Magn. Magn. Mater.* 321, s. 1667-1670.

Přijato do tisku: 4. 11. 2014

Lektorováno: 29. 11. 2014

## ANTILISTERIÁLNÍ ÚČINKY Kyseliny fenylmléčné A JEJÍ PRODUKCE KMENEM *LACTOBACILLUS PLANTARUM* LPAL FERMENTACÍ SYROVÁTKY

Šárka Havlíková, Ladislav Bár, Eva Kvasničková

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

**Antilisterial activity of phenyllactic acid and their production by *Lactobacillus plantarum* LPAL during the fermentation of whey**

**Abstrakt**

Cílem této práce bylo ověřit antilisteriální aktivitu kyseliny fenylmléčné (PLA) vůči dvěma kmenům listerií v závislosti na koncentraci PLA, teplotě a pH. S klesající hodnotou pH a stoupající koncentrací a při teplotě 37 °C rostla i inhibiční aktivita.

Dále byly prováděny pokusné fermentace zahuštěné syrovátky s cílem vyprodukovat co nejvyšší množství PLA s využitím izolátu *Lactobacillus plantarum* LPAL. Nejvyšší dosažená koncentrace PLA byla 1,12 mg/ml při fermentaci o pH 4,4 a zaočkováním syrovátky kmenem *Lactobacillus plantarum* LPAL a *Geotrichum candidum* CCDM 870.

**Klíčová slova:** kyselina fenylmléčná, syrovátka, antilisteriální aktivita, laktobacily

**Abstract**

The aim of this work was to verify the activity of phenyllactic acid (PLA) against two strains of *Listeria*, depending on the concentration of PLA, temperature and pH. Inhibitory activity grew at 37 °C with decreasing pH and increasing concentration.

Further experiments used concentrated whey fermentation to produce the highest amount of PLA used an isolate of *Lactobacillus plantarum* LPAL. Highest concentration of PLA achieved was 1,12 mg/ml during the fermentation at pH 4,4 and whey inoculation with strains *Lactobacillus plantarum* LPAL and *Geotrichum candidum* CCDM 870.

**Key words:** phenyllactic acid, whey, antilisterial activity, laktobacilli

**Úvod**

Stále větší odpor k využívání čistě chemické konzervace potravin k prodloužení jejich trvanlivosti vede ke zkoumání látek, které jsou produkovány mikroorganismy používanými buď přímo v technologickém postupu výroby potravin, nebo mohou být přidávány jako produkt zpracování jiné potravin nebo odpadní suroviny při výrobě potravin bez spotřebitelem rozeznatelné změny typických vlastností dané potravin. Pro tento postup se vžilo označení biokonzervace, protože tyto látky nejsou produkty chemické syntézy, ale k jejich tvorbě dochází během biochemického procesu.

Jednou z těchto látek, jejichž vliv je zkoumán různými autory, je kyselina fenylmléčná (PLA). Produkce této organické kyseliny byla zjištěna u některých bakterií rodu *Lactobacillus* (Lavermicocca et al. 2003, Valerio et al. 2004), u některých bakterií rodu *Pediococcus* a *Geotrichum* (Ström et al. 2002, Dieuleveux et al. 1998a) a dalších. Prozkoumány byly její antifungální vlastnosti (Greifová et al. 2014). Je uváděna i její antilisteriální aktivita při koncentraci 13 mg/ml proti *Listeria monocytogenes* (Dieuleveux et al. 1998a). PLA způsobuje změny v chování listerií a jejich struktuře. Bakterie se shlukují, produkují polysacharidy a jejich buněčná stěna ztrácí pevnost. Nakonec dochází ke zvětšování buněk až k jejich úplné desintegraci (Dieuleveux et al. 1998a).

Naše práce byla zaměřena na testování jejího vlivu na růst listerií v závislosti na teplotě a pH potravin a na možnost produkce kyseliny fenylmléčné při fermentaci zahuštěné syrovátky kmeny, u nichž byla zjištěna nějaká antilisteriální aktivita. Vybrali jsme izolát s výraznou antilisteriální aktivitou, identifikovaný jako *Lactobacillus plantarum* s označením LPAL a kmen *Geotrichum candidum* CCDM 870 s předpokládanou produkcí PLA (Dieuleveux et al. 1998b), a použili jsme je při fermentaci zahuštěné syrovátky, jejímž využitím se dlouhodobě zabýváme.

**Materiál a metodika**

- BHI bujón (OXOID CM0225, UK)
- GKCH agar (MILCOM a.s., CZ)

- MRS5,7 agar (MERCK 1.10660, D)
- odpadní syrovátka z výroby sýrů zahuštěná reverzní osmózou, pH upraveno na hodnotu 4,4 a 6,0.
- fenylalanin (Sigma-Aldrich 147966, CZ)
- fenylpyruvát sodný (Sigma-Aldrich P8001, CZ)
- kyselina fenylmléčná (Sigma-Aldrich P7251, CZ)
- roztok NH<sub>4</sub>OH 5 mol/l (Sigma-Aldrich 318612, CZ)
- kmeny *Listeria innocua* Ln08 (izolát VŠCHT, CZ), CCM 4030 (CCM Brno, CZ)
- kmen *Lactobacillus plantarum* LPAL (izolát MILCOM a.s., CZ)
- kmen *Geotrichum candidum* CCDM 870 (CCDM Laktoflora®, CZ)
- laboratorní fermentor LABFORS 4 (INFORS AG, CH)
- stanovení aktivní kyselosti: laboratorním pH metrem inoLab pH 720 (WTW, Weilheim, D)
- stanovení nižších mastných kyselin izotachoforetickým analyzátozem EA 02 (VILLA Labeco, SK)
- kapilární elektroforéza HP Agilent G1600 s UV detektorem (Agilent Technologies, USA)

### 1. Ověření antilisteriálních účinků kyseliny fenylmléčné jamkovou difúzní metodou.

Pracovní postup:

Příslušným čerstvě nakultivovaným indikátorovým kmenem *Listeria innocua* bylo zaočkováno 150 ml BHI agaru o čtyřech různých hodnotách pH na koncentraci 10<sup>4</sup> KTJ/ml, promícháno a nalito na Petriho misku o průměru 18 cm. Po ztuhnutí agaru byly misky uloženy v chladu a po 1,5 - 2 h sterilním nebozozem vykrájeny otvory podle vzorníku. Do předem označených jamek byly napipetovány roztoky kyseliny fenylmléčné o koncentracích 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 a 10 mg/ml. Petriho misky byly uloženy 4 h v chladu a poté aerobně kultivovány 2 dny při teplotě 37 °C a 12 dnů při kultivační teplotě 7,5 °C. Po kultivaci byly změřeny případné inhibiční zóny.

### 2. Fermentace syrovátky kmenem *Lactobacillus plantarum* LPAL a kmenem *Geotrichum candidum* CCDM 870 při různých hodnotách pH, s přidavkem fenylalaninu a fenylpyruvátu

Pracovní postup:

Do sterilní nádoby fermentoru byla převedena syrovátka, sterilovaná při 110 °C po dobu 20 minut a přidán roztok fenylpyruvátu o koncentraci 25 mg/ml sterilovaný mikrofiltrací tak, aby jeho koncentrace v syrovátce byla 0,25 mg/ml. Dále byl přidán fenylalanin v množství 10 mg/ml syrovátky. Všechny fermentace (F213-F216) probíhaly při konstantní teplotě 30 °C a nastavené rychlosti míchání 250 ot/min. Před zahájením fermentace byla nakalibrována pH elektroda a pumpa pro úpravu pH. Hodnota pH syrovátky během fermentace byla upravována NH<sub>4</sub>OH a syrovátka zaočkována *Geotrichum candidum*

CCDM 870 na koncentraci 10<sup>2</sup> až 10<sup>3</sup> KTJ/ml a *Lactobacillus plantarum* LPAL na koncentraci 10<sup>5</sup> až 10<sup>6</sup> KTJ/ml podle uvedených kombinací:

- F213: pH 6,0, LPAL, CCDM 870
- F214: pH 6,0, LPAL
- F215: pH 4,4, LPAL, CCDM 870
- F216: pH 4,4, CCDM 870

V průběhu všech fermentací byly odebírány vzorky ke kontrole růstu mikroorganismů plotnovou metodou, stanovení organických kyselin izotachoforetickou metodou a stanovení obsahu kyseliny fenylmléčné metodou kapilární elektroforézy (Drbohlav et al. 2013). Dále byla u jednotlivých vzorků stanovována inhibiční aktivita vůči 2 kmenům *Listeria innocua* jamkovou difúzní metodou na BHI agaru při 37 °C.

## Výsledky a diskuse

### 1. Ověření účinnosti PLA proti kmenům *Listeria innocua* Ln08 a CCM 4030.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Při teplotě 37 °C byly po dvou dnech kultivace u obou indikátorových kmenů velikosti odečtených inhibičních zón při pH 5,0 shodné, a to se vzrůstající tendencí od koncentrace 5,0 mg/ml do 10 mg/ml PLA. U kmene CCM 4030 byla zjištěna slabá inhibice již při koncentraci 2,5 mg/ml PLA. Při pH 5,46 byly od koncentrace 5,0 mg/ml do 10 mg/ml PLA odečtené inhibiční zóny menší u obou kmenů a při pH 6,30 a 7,51 nebyla zjištěna žádná míra inhibice testovaných kmenů listerií.

Při nízké kultivační teplotě 7,5 °C byla naopak pozorována slabá inhibice po 12 dnech při koncentraci 7,5 a 10 mg/ml u kmene Ln08 a při koncentraci 7,5 mg/ml u kmene CCM 4030. Při hodnotách pH 5,0 a 5,46 nebyl zaznamenán žádný růst listerií a tudíž ani žádná inhibice.

Míra inhibice obou kmenů *Listeria innocua* kyselinou fenylmléčnou tedy závisí jak na teplotě a koncentraci, tak

**Tab. 1** Vliv pH, teploty a koncentrace kyseliny fenylmléčné na růst testovaných kmenů *Listeria innocua*

indik. kmen	koncentrace kys. fenylmléčné (mg/ml)	37 °C / 2 dny				7,5 °C / 12 dnů			
		pH/ inhibiční zóna (mm) 5,00	5,46	6,30	7,51	pH/ inhibiční zóna (mm) 5,00	5,46	6,30	7,51
Ln08	0,5	0	0	0	0	N	N	0	0
	1,0	0	0	0	0	N	N	0	0
	2,5	0	0	0	0	N	N	0	0
	5,0	5	3	0	0	N	N	0	0
	7,5	6,5	5,5	0	0	N	N	1,5***	0
	10,0	8,5	6,5	1	0	N	N	2***	0
CCM 4030	0,5	0	0	0	0	N	N	0	0
	1,0	0	0	0	0	N	N	0	0
	2,5	1	0	0	0	N	N	0	0
	5,0	5	3	0	0	N	N	0	0
	7,5	6,5	5	0	0	N	N	1,5*	0
	10,0	8,5	6,5	0	0	N	N	-	0

N....bez růstu

\*....v čiré zóně jednotlivé rezistentní kolonie

\*\*\*...slabě znatelná zóna, četné rezistentní kol.

**Tab. 2** Porovnání obsahu vytvořené kyseliny fenylmléčné kultivací kmene *Lactobacillus plantarum* LPAL a *Geotrichum candidum* CCDM 870 v zahuštěné syrovátce při 30 °C

číslo fermentace	pH	kys. fenylmléčná (mg/ml)		kys. mléčná (mg/ml)		LPAL (log KTJ/ml)		CCDM 870 (log KTJ/ml)	
		0 dní	7 dní	0 dní	7 dní	0 dní	7 dní	0 dní	7 dní
F213	6,0	0,14	0,40	22,28	48,79	6,93	9,02	3,21	5,62
F214	6,0	0,07	0,44	20,83	40,98	6,86	8,58	-	-
F215	4,4	0,10	1,12	22,92	23,15	5,93	8,24	2,45	4,72
F216	4,4	0,04	0,19	24,76	25,56	-	-	2,97	4,65

na pH substrátu. Bylo by tedy možné uvažovat o využití antilisteriálního účinku PLA v potravinách s nižším pH.

## 2. Fermentace zahuštěné syrovátky

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2. Při první fermentaci syrovátky zaočkované kmenem *Lactobacillus plantarum* LPAL a *Geotrichum candidum* CCDM 870 (F213) byl po sedmi dnech elektroforézou stanoven obsah PLA 0,40 mg/ml. Při druhé fermentaci pouze s kmenem *Lactobacillus plantarum* LPAL (F214) byl po sedmi dnech fermentace obsah PLA jen nepatrně vyšší. Lze předpokládat, že se použitý kmen *Geotrichum candidum* CCDM 870 na produkci PLA za podmínek fermentace (pH 6,0, 30 °C) nijak nepodílel. Produkce kyseliny mléčné a počty KTJ/ml laktobacilů byly v obou fermentacích F213 a F214 srovnatelné. Při fermentaci F215 s oběma mikroorganismy při pH fermentační směsi udržované na hodnotě 4,4 bylo stanoveno po 7 dnech kultivace nejvyšší množství PLA 1,12 mg/ml. Ke zjištění, do jaké míry se na tvorbě PLA za těchto podmínek podílel kmen *Geotrichum candidum* CCDM 870, byla provedena další fermentace F216 bez přítomnosti laktobacilů. Přestože zaočkovaný kmen za podmínek fermentace rostl, zvýšení obsahu PLA po sedmi dnech bylo zanedbatelné a na hranici detekce. Lze tedy předpokládat, že se kmen *Geotrichum candidum* CCDM 870 v syrovátce nijak významně nepodílel na tvorbě PLA ani při pH 4,4. Při žádné fermentaci se nepodařilo dosáhnout takového obsahu PLA, jaký je uváděn jako potřebný pro inhibici *Listeria monocytogenes* (Dieuleveux et al. 1998a) tj. 13 mg/ml. Pro inhibici nebo zpomalení růstu plísni by byly dostačující hodnoty pod 10 mg/ml (Greifová et al. 2014).

Fermentační přípravou PLA s využitím jiného kmene laktobacilu se zabývali (Wanmeng et al. 2009), kteří dosáhli fermentací syntetického substrátu bez kontroly pH výsledné koncentrace 2,42 mg/ml, a s udržováním pH na hodnotě 6,0 a periodickým doplňováním glukózy a fenylpyruvátu obsahu 17,38 mg/ml. Pro využití zahuštěné odpadní syrovátky se ale tento postup nejeví jako výhodný.

## Závěr

Výsledky jamkové difúzní metody inhibice kmenů *Listeria innocua* Ln08 a CCM 4030 kyselinou fenylmléčnou potvrdily vliv pH na míru inhibice. Inhibice při 37 °C

vrůstala s rostoucí koncentrací PLA od 5 do 10 mg/ml a klesala s rostoucím pH od 5,0 do 6,3. V případě možnosti povolení přídavku PLA do výrobků určených k lidské výživě a ověření jeho vlivu na mikroorganismy využívané v potravinářských technologiích by bylo výhodné použití pro výrobky s nižším pH.

Při testování využití zahuštěné syrovátky k získání dostatečného PLA fermentací pomocí bakteriálních kmenů *Geotrichum candidum* CCDM 870 a *Lactobacillus plantarum* LPAL bylo dosaženo ve fermentátu koncentrace PLA pouze 1,12 mg/ml, což je hodnota nižší než účinná podle testování provedeného v první části práce, přičemž bylo prokázáno, že kmen *Geotrichum candidum* CCDM 870 se na produkci PLA nepodílel.

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory VÚM s.r.o., rozhodnutí č. RO1414.

## Literatura:

- DIEULEVEUX V., LEMARINIER S., GUEGUEN M. (1998a): Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 40, s.177-183.
- DIEULEVEUX V., VAN DER PYL D., CHATAUD J., GUEGUEN M (1998b): Purification and Charakterization of Anti-Listeria Compounds Produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Mikrobiology*, 64(2), s.800-803.
- DRBOHLAV J., ELICH O., DRÁB V., ŠALAKOVÁ A. (2013): *Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy*. Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. Periodická zpráva za rok 2013 RO 0513 MZe.
- GREIFOVÁ M., MARUNOVÁ E., GREIF G., ZIMANOVÁ M. (2014): Antifungálna aktivita kyseliny D, L-fenylmléčnéj. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 25, s. VI.- X..
- LAVERMICOCCA P., VALERIO F., VISCONTI A. (2003): Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Mikrobiology*, 69, s.364-640.
- STRÖM K., SJÖRGEN J., BROBERG A., SCHNÜRER J. (2002): *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyllactic acid. *Applied and Environmental Mikrobiology*, 68, s.4322-4327.
- VALERIO F., LAVERMICOCCA P., PASCALE M., VISCONTI A. (2004): Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Mikrobiology Letters*, 235, s.289-295.
- WANMENG M., LIU F., JIA J., CHEN CH., TAO Z., BO J. (2009): 3-Phenyllactic acid production by substrate feeding and pH-control in fed-batch fermentation of *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresource Technology*, 100, s.5226-5229.

Přijato do tisku: 4. 11. 2014

Lektorováno: 27. 11. 2014