

IZOLACE PROTEINŮ ZE SYROVÁTKY S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM PRO KOSMETICKÉ APLIKACE

Zuzana Kolářová Rašková¹, Alexandra Šalaková²,
Vladimír Sedlařík^{1*}

¹ Centrum polymerních systémů, Univerzitní institut,
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, tř. T. Bati 5678, 760 01
Zlín

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6

* sedlarik@cps.utb.cz

Isolation of antimicrobial proteins from whey for cosmetic applications

Souhrn

Tato práce je zaměřena na využití specifických složek obsažených v syrovátce jako aktivních antimikrobiálních látek pro kosmetické aplikace. Studie se zabývá především izolací laktoferinu pomocí iontové výměnné chromatografie tak, aby byla co nejvíce zachována jeho antimikrobiální aktivita. Pro identifikaci proteinů byla použita tricinová polyakrylamidová gelová elektroforéza. Vybrané proteiny byly dále zakomponovány do hydrogelu na bázi kopolymeru kyseliny akrylové a byla studována jejich antimikrobiální aktivita v této hydrofilní polymerní matici. Bylo zjištěno, že proteiny získané ze syrovátky mají velmi dobrý antimikrobiální účinek již při nízkých koncentracích. Dále bylo potvrzeno synergické antimikrobiální působení laktoferinu a nisinu ve zkoumaných hydrogelových systémech.

Summary

Presented work is focused to the utilization of specific components present in whey as antimicrobial compounds for cosmetic applications. The study deals especially with the lactoferrin protein isolation that was performed by the means of ion exchange chromatography. The polyacrylamide gel electrophoresis electrophoresis was used for the protein identification. Isolated proteins were incorporated into the hydrogel based on copolymers of acrylic acid. The antimicrobial activity testing of the proteins in hydrogel matrix were provided. It was found that the isolated proteins have very good antimicrobial properties even at low concentrations. In addition, synergy in antimicrobial action of lactoferrin and nisin in the hydrogel matrix was observed.

Úvod

Syrovátka obsahuje řadu nutričních látek (především proteinů a peptidů), které lze dále průmyslově využít.

Hlavními komponentami syrovátkových bílkovin jsou β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin, imunoglobuliny a proteózo-peptonové frakce. Syrovátkové bílkoviny jsou komerčně získávány nejčastěji pomocí ultrafiltrace a následného sprejového sušení retentátu. Takto se vyrábí sušené koncentráty syrovátkových bílkovin (WPC - whey protein concentrate), kde je koncentrace bílkovin v rozsahu 35-80 %, avšak pro účely inkorporace proteinů do kosmetických prostředků jsou vhodnější čistější proteiny. Role α -laktalbuminů a imunoglobulinů je důležitá pro stimulaci imunitní funkce (Onwulata a kol., 2008, Motarjemi a kol., 2014). Velmi významnými proteiny jsou i laktoferin a laktoperoxidáza. Laktoferin (LF) je glykoprotein s molekulovou hmotností (MW) okolo 78 kDa, se širokospektrálním antimikrobiálním účinkem proti gram pozitivním i gram negativním bakteriálním kmenům, může být také imunomodulační látkou. LF je poměrně tepelně stabilní při pH 4 a snese pasteraci při 72 °C. V literatuře jsou zmíněny jeho unikátní účinky baktericidní, antiadhezivní a antiinvazivní, vliv na tvorbu biofilmu, antitumorové, antivirové, antiparazitické vlastnosti (Naidu, 2000). Bakteriostatická aktivita LF a laktofericinu (antimikrobiálního peptidu o MW cca 1,5 kDa, vzniklého štěpením LF při fermentačním procesu) je zkoumána pro případná užití jako konzervans (Panesar a kol., 2007). Má schopnost vázat železo, čímž zamezuje jeho přísun do bakterií a tím omezuje jejich růst (Liang a kol., 2006). V přítomnosti subinhibiční koncentrace LF (20 μ g/ml) bakterie nejsou schopny tvořit mikrokolonie a následně ani biofilm (Zohri a kol., 2010). Další vlastností LF je schopnost vázat toxiny, stimulovat růst probiotických kultur a protizánětlivé působení. Díky své schopnosti inhibovat Fentonovu reakci a tím i vznik volných radikálů, je využitelný jako antioxidant v různých potravinových produktech a může se tak doplňkově podílet na prodloužení doby použitelnosti. Laktoperoxidáza (MW ~ 74 kDa) je enzym vyskytující se v syrovátce a je přirozeným antimikrobiálním prostředkem. Vzhledem k významnému obsahu laktózy (70-72 % sušiny) může být syrovátka substrátem pro fermentaci. (Panesar a kol., 2007). Fermentačním procesem je možno získat řadu rozličných produktů, mezi nimi i látky použitelné jako aditiva v potravinářství nebo farmaceutickém průmyslu (kyselina mléčná, exopolysacharidy, galaktooligosacharidy, ribonukleotidy, aj.) (Prazeres a kol., 2012).

Potenciální využití produktů fermentace v kosmetice může být založeno na schopnosti bakterií mléčného kvašení produkovat antimikrobiální látky rozdílných struktur, především nízkomolekulární, mezi které patří především bakteriociny. Mezi nejznámější, nejvíce studovaný a v potravinářském průmyslu nejvíce používaný bakteriocin patří nisin (Stoyanova a kol., 2012). Tento antimikrobiální peptid je produkován bakteriemi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a kromě toho, že je využíván jako konzervant v potravinářství (E234), nachází uplatnění také ve farmacii, veterinářství a zdravotnictví (Evangelin a kol., 2015). Konkrétním příkladem využití v kosmetice může být patentovaná zvlhčující a kosmetická kompozice obsahující fer-

mentační metabolity, získané smíšenou kulturou BMK (Yoshihiro a kol., 2003).

Tato práce je zaměřena na izolaci proteinů (směsi proteinů), převážně laktoferinu z kyselé syrovátky, jeho následnou inkorporaci do hydrogelu a sledování synergického efektu antimikrobiální aktivity v LF s nisinem v hydrogelu.

Materiál a metodika

Použité chemikálie

TRIS, Pufferan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, P-Lab, Praha), TEMED (P-Lab, Praha), Tricine (P-Lab, Praha), Glycin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), akrylamid, bisakrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), peroxosíran amonný (APS), kyselina boritá, kyselina chlorovodíková, hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný, glycerol (IPL Lukeš, Uherský Brod), dodecylsírán sodný (SDS, P-Lab, Praha), merkaptoethanol (P-Lab, Praha), Mueller-Hintonův agar (MHA, HiMedia, Brno), tryptonesoya agar (TSA, HiMedia, Brno), kyselina octová (Penta, Praha), kyselina trichloroctová (TCA, Penta, Praha), Methanol (Penta, Praha), formaldehyd (Penta, Praha), coomasiebrilliant blue R250 (SERVA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), bromfenolová modř (P-Lab, Praha), hexakvanoželezitan draselný (IPL Lukeš, Uherský Brod), dusičnan stříbrný (IPL Lukeš, Uherský Brod), uhličitan sodný (IPL Lukeš, Uherský Brod), thiosíran sodný (Penta, Praha),

Nisin izolovaný z *Lactococcus lactis* (2,5% lyofilizát, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Laktoferin (lyofilizát, Lactoferrin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a markery molekulových hmotností pro elektroforézu 6,5 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Výchozí suroviny pro izolaci proteinů

Kyselé syrovátka (Mlékárna Bystřice pod Hostýnem): byla skladována při 4 °C maximálně po dobu 48 h. Vzorky, které nebyly zpracovávány bezprostředně po dodání, byly okyseleny na pH 4 a takto mohly být dlouhodobě skladovány při teplotě menší než -20 °C.

Zpracování syrovátky

Vzorky byly odstředěny při otáčkách 10000 x g a teplotě 4 °C po dobu 15 minut za účelem oddělení zbytkového tuku a sedimentu, pH supernatantu bylo upraveno na hodnotu 7,4 Tris-pufrem pro účely dalších analýz.

Syrovátka byla následně podrobena frakčnímu vysolení síranem amonným: nejprve 50 % vysolení za účelem oddělení většiny globulinové frakce od zbytku syrovátkových proteinů, poté 80 %-nímu vysolení (oddělení většiny albuminu). Dávkování na kolonu bylo provedeno po dialýze proti NaHCO₃.

Charakterizační techniky

Pro separaci proteinů bylo použito iontově výměnné chromatografie (IEC) na přístroji Shimadzu Prominence

LC 20AP/FRC-10A, vzorky byly dávkovány na kolonu (anex HiTrapCapto Q a následně na katex HiTrapCapto S) za účelem separace bílkovin. *Mobilní fáze:* A-25mM NaH₂PO₄, B-25mM NaH₂PO₄ a 0,4-1,5 M NaCl (lineární gradient), při průtoku 0,6 ml/min.

Frakce byly odebrány po 3 minutách a bezprostředně po odebrání byly stanoveny koncentrace dané bílkoviny nebo jejich směsi a to metodou podle Bradfordové při vlnové délce 595 nm spektrofotometricky (Bradford, 1976). Současně byly tyto frakce dávkovány na elektroforetický gel (5μl vzorku) pro identifikaci proteinů pomocí tricinové polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE), kdy směs proteinů z jednotlivých vzorků byla smíchána se stejným objemem vzorkového pufru, byla denaturována 5 minut při 80 °C a nanášena na SDS-PAA gel obsahující 10 % akrylamidu a 3 % síťovadla. Po elektroforéze byly proteiny na gelu fixovány 5 % glutaraldehydem a gel byl obarven barvivem - Coomassiebrilliant blue R-250, případně (při obsahu proteinu v bandu nižším než 0,5 μg) bylo použito barvení stříbrem (AgNO₃). Elektroforéza probíhala při 190V, 65 mA. Bylo použita sestava Bluestar (Blirt S.A.) a HU-Maxi standard horizontal, Scie-Plas, zdroj Consort EV 202.

Aplikace proteinů do hydrogelu:

Po izolaci proteinů a provedení jejich analýz byl vzorek lyofilizován, koncentrát poté dialyzován a po dialýze komponován do hydrogelu. Za účelem studia synergického efektu LF s nisinem byl připraven roztok komerčního nisinu, o koncentraci 41 mg/l v 0,02 M HCl.

Příprava hydrogelu:

Karbomer (Carbopol 940, Lubrizol, Wickliffe, USA) byl navážen do potřebného objemu deionizované vody tak, aby jeho množství činilo 0,8 hm. %, disperze byla ponechána bobtnat po dobu 24 h, poté bylo pH gelu upraveno na hodnotu 5,4 pomocí 10% roztoku NaOH. Objem vzorku hydrogelu byl rozdělen na 5 částí, do nichž byly přidávány další ingredience dle tabulky 1.

Tab. 1 Složení hydrogelů; uvedené koncentrace proteinů jsou vztaženy na objem hydrogelu

Označení vzorku	Složení
1	Referenční vzorek
2	Hydrogel s 1 hm. % syrovátkového izolátu (směs proteinů izolovaných z anexu i katexu)
3	Hydrogel + LF (izolát, 40 μg/ml LF)
4	Hydrogel + LF (izolát, 120 μg/ml)
5	Hydrogel + LF izolát (120 μg/ml) + komerční nisin (160μg/ml)

Mikrobiologické testy:

Jako testovací modelové mikroorganismy pro sérii antimikrobiálních testů byly zvoleny následující kmeny: *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961, *Aspergillus niger* CCM 8222, *Candida albicans* CCM 8215. Výše uvedené mikroorganismy byly

zakoupeny z České sbírky mikroorganismů, Masarykova univerzita v Brně, Česká republika.

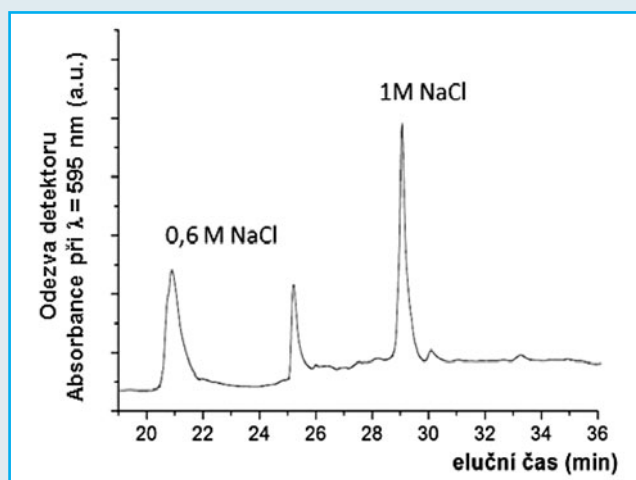
Pro vyhodnocení antimikrobiální stability hydrogelů byla použita metoda vyhodnocení antimikrobiální účinnosti konzervantů, dle Českého lékopisu (2005) na TS agaru. Inkubace u kmenů *Staphylococcus aureus* (koncentrace inokula: $1,4 \cdot 10^7$ cfu/ml) a *Pseudomonas aeruginosa* ($3,6 \cdot 10^8$ cfu/ml) trvala 24 hod při 35 °C a u kmenů *Aspergillus niger* ($5,8 \cdot 10^6$ cfu/ml) a *Candida albicans* ($1,5 \cdot 10^8$ cfu/ml) 5 dnů při 25 °C.

U směsi izolovaných proteinů (z katexu) byla vyhodnocována antimikrobiální aktivita pomocí difúzních agarových testů, které byly provedeny s bakteriemi *S. aureus* (CCM 4516) s koncentrací bakteriální suspenze $10^7 - 10^8$ cfu/ml, na Mueller - Hinton agaru. Byla vyhodnocována šířka inhibiční zóny u jednotlivých vzorků, pro různé koncentrace standardu a pro izolovanou frakci obsahující LF.

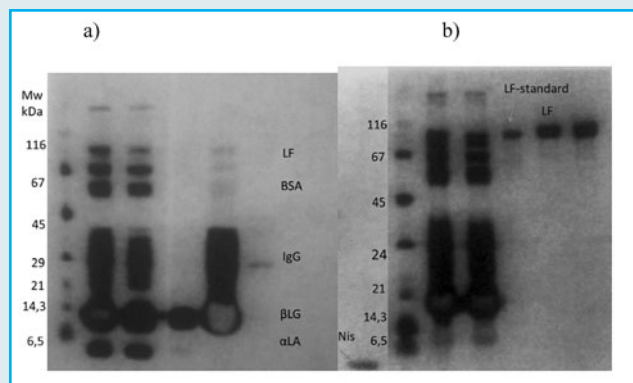
Výsledky a diskuse

V rámci separace pomocí IEC byly ve vzorcích připravených z mléka identifikovány především: α -laktalbumin (LA), β -laktoglobulin, BSA, LF a imunoglobulinová frakce. LF byl získán dělením na katexu (Obr. 1). Obsah LF v získané frakci po separaci kyselé syrovátky vyrobené z mléka na katexu činil $0,12 \pm 0,04$ mg/ml, ve frakcích získaných ze syrovátky $0,05 \pm 0,1$ mg/ml. Takto bylo získáno ($0,98 \pm 0,05$) mg sušiny LF z 5 ml dávkovaného vzorku. Na anexu byly odděleny α -laktalbumin (LA), který se vyskytoval v množstvích $0,9 \pm 0,3$ mg/ml a β -laktoglobulin (LG) $2,8 \pm 0,3$ mg/ml, imunoglobuliny (IgG), v koncentracích $0,5 \pm 0,1$ mg/ml. V syrovátce po výrobě sýra se vyskytoval navíc nisin a větší množství imunoglobulinů. Obsah nisinu byl stanoven na 0,013-0,019 mg/ml.

U vysolených a následně dialyzovaných bílkovin byla sledována jejich antimikrobiální aktivita mikrobiologickými metodami. Celková průměrná koncentrace syrovátkových bílkovin z frakcí byla stanovena na $4,18 \pm 0,04$ mg/ml.



Obr. 1 Frakce kyselé syrovátky dělená na katexu, obsahující LF, byla použita gradientová eluce pomocí NaCl (0,4-1,5M)

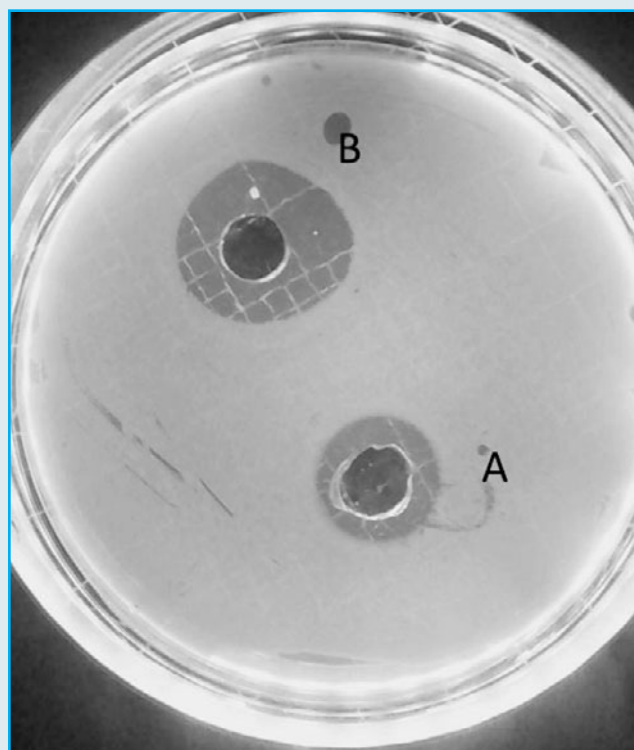


Obr. 2 Odebrané frakce stanovené pomocí Tricinové SDS-PAGE:

- a) 1 - MW marker, 2 - syrovátka po dělení na anexu v čase 8, 6 min, 3 - frakce z anexu v čase 11,5 min, 4 - frakce z anexu v čase 15,7 min, 6 - z anexu po 18,5 min, 7 - z anexu po 26 min
b) 1 - Nisin, čas 6,5 min, 2 - mw-marker, 3, 4 - odběr frakce z katexu ve 12,5 a 17,5 min, 5 - LF standard, 6 - frakce z katexu ve 20,6 min (LF), 7 - frakce z katexu ve 28,7 min (LF)

Na Obr. 2 jsou elektroforegramy po Tricinové SDS-PAGE, na kterou byly dávkovány frakce odebrané z kolony během separace v preparativním módu. Je zde patrné, že LF bylo možné separovat ve větším množství pouze na katexu, podobně tomu bylo u nisinu.

Za účelem ověření možnosti využití izolovaných proteinů jako antimikrobiální složky v kosmetických prostřed-



Obr. 3 Antimikrobiální účinnost hydrogelu proti kmeni *Staphylococcus aureus* CCM 4516 obsahující A) laktoferin izolovaný ze syrovátky (120 µg/ml) a B) komerční nisin (164 µg/ml) + laktoferin (120 µg/ml) izolovaný ze syrovátky

Tab. 2 Výsledky z testu antimikrobiálního účinku konzervantu (dle Českého lékopisu) u hydrogelů s obsahem izolovaných syrovátkových proteinů

vzorek	Počet cfu/ml			Počet cfu/ml		
	Čerstvě naočkovaný	Po 24h	Po 7 dnech	Čerstvě naočkovaný	Po 24h	Po 7 dnech
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961		
1	4,5.10 ⁵	3,8.10 ⁴	1,9.10 ⁴	1,6.10 ⁴	3,3.10 ³	2,5.10 ³
2	55	11	7	1,4.10 ²	44	2
3	25	6	0	2,6.10 ²	21	0
4	14	0	0	5,1.10 ²	21	0
5	8	0	0	4,3.10 ³	11	0
<i>Aspergillus niger</i> CCM8222				<i>Candida albicans</i> CCM 8215		
1	3,3.10 ³	5,1.10 ²	4,6.10 ²	3,7.10 ⁴	2,2.10 ⁴	1,4.10 ⁴
2	7,5.10 ²	42	3	2,8.10 ³	3,1.10 ²	8
3	6,8.10 ²	37	2	1,5.10 ²	85	3
4	63	27	0	81	51	0
5	54	18	0	67	3	0

cích byly dialyzované a lyofilizované frakce obsahující LF zakomponovány do hydrogelu. Z výsledků testování antimikrobiální aktivity je patrné, že gely obsahující směs všech izolovaných proteinů vykazují nižší antimikrobiální účinek než gely obsahující pouze LF frakci. Vzhledem k tomu, že z literatury bylo zjištěno, že minimální inhibiční koncentrace LF se pohybuje od 35 - 100 µg/ml (Naidu, 2000), v závislosti na druhu bakterií a způsobu aplikace, byla pro inkorporaci do hydrogelu zvolena koncentrace 40 a 120 µg/ml. Bylo zjištěno, že dostatečná koncentrace LF je minimálně 120 µg/ml v daném hydrogelu. Gely s takovýmto obsahem LF vykazují nejen bakteriostatický účinek (schopnost konzervace), ale i antibakteriální vlastnosti, především proti kmeni *S. aureus*, což bylo ověřeno difúzními agarovými testy. Byl rovněž prokázán i synergický efekt nisinu a LF proti tomuto kmeni (Obr. 3).

Závěr

Potenciál využití syrovátkových proteinů a peptidů jako konzervačních látek v kosmetických prostředcích lze vyhodnotit jako perspektivní. Bylo zjištěno, že pomocí relativně nenáročných metod separace lze získat dostatečné množství syrovátkových proteinů vykazujících antimikrobiální vlastnosti pro účely jejich aplikace v kosmetických prostředcích tak, aby byla zachována jejich stabilita, tedy jejich antimikrobiální, biologická aktivita. Ve vzorcích syrovátky bylo zjištěno až 0,5 % β-LG, 0,15 % LA, 0,05 % BSA a 0,006 % LF. Množství nisinu v dodané syrovátce bylo stanoveno na 0,0013 %. Čerstvá syrovátka, která je zpracována bezprostředně po odebrání je tedy vhodná pro izolaci biologicky aktivních proteinů. Vyskytuje se v ní i značné množství imunoglobulinů, laktoperoxidázy a laktoferinu, který vzniká při fermentaci syrovátky a je rovněž slibným peptidem s podobně širokospektrálními účinky jako LF. Výtěžek LF po dělení na katexu byl dostatečný pro aplikaci do vzorků hydrogelů. Při přípravě produktů se syrovátkovým koncentrátem je nevýhodou přítomnost dalších složek syrovátky, které naopak mohou

sloužit jako živiny pro mikroorganismy, tudíž antimikrobiální účinky produktu jsou pak nižší než při použití čistých proteinů nebo izolátu. Hydrogely se syrovátkovým koncentrátem byly vyhodnoceny jako mikrobiologicky méně stabilní, protože obsahují kromě antimikrobiálních proteinů i další složky. Vzorky s LF o koncentraci minimálně 120 µg/ml (v objemu gelu) vykazovaly kromě bakteriostatického účinku i účinek baktericidní. Rovněž byl pozorován i synergický efekt nisinu a LF. Stabilita gelu s obsahem LF a nisinu, tedy i jeho antimikrobiální aktivita byla stanovena pouze u čerstvě připravených gelů. Je tedy nutné provést i dlouhodobé stabilitní studie.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci řešení projektu QJ1310254 a projektu LO1504.

Literatura

- BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, s. 248-274.
- EVANGELIN Y., VENKATESWARULU T. C., BABU D. J., KASTURI K. (2015) Bacteriocins from lactic acid bacteria and its potential applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 32(1), s. 306-309.
- LIANG M., CHEN V.Y., LING C. H., WENLUNG C. (2006) A simple and direct isolation of whey components from raw milk by gel filtration chromatography and structural characterization by FT Raman spectroscopy, *Talanta*, 69, s. 1269-1277.
- MOTARJEMI Y., MOY G., TODD, E. (2013) *Encyclopedia of Food Safety*. Verlag, Academic Press Inc. ISBN 978-0-12-378612-8.
- NAIDU A.S. (2000) *Lactoferrin: Natural - Multifunctional - Antimicrobial*. Pomona, CRC Press, ISBN 978-1-42-004143-9.
- ONWULATA C.I., HUTH P.J. (2008) Whey processing, functionality and health benefits. Ames, John Wiley&Sons, ISBN 978-0-8138-0903-8.
- PANESAR P.S., KENNEDY J.F., GANDHI D.N., BUNKO K. (2007) Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, s. 1-14.
- PRAZERES A.R., CARVALHO F., RIVAS, J. (2012) Cheese whey management: A Review. *Journal of Environmental Management*, 110, s. 48-68.
- STOYANOVA L., USTYUGOVA E., NETRUSOV A. (2012) Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3), s. 229-243.
- YOSHIHIRO N., KOHEI H., HISAYASU S. (2003) *Humectant and Cosmetic Composition Comprising Lactic Acid Fermentation Metabolite*. Patent, JP2003081808 (A).
- ZOHRI M., ALAVIDJEH M., HARIRIAN I., EBRAHIMI S. (2010) Comparative study between antibacterial effect of nisin and nisin loaded chitosan/alginate nanoparticle on the growth of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk samples. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2, s. 258-266.

Přijato do tisku: 15. 10. 2015

Lektorováno: 10. 11. 2015