

- SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KOMPRDA T., KLEJBUS B., KUBÁŇ V. (2003): Liquid chromatographic determination of biogenic amines in a meat product during fermentation and long-term storage. *Czech J. Food Sci.*, 21, s.167-175.
- DAMEZ J.L., CLERJON S.(2013): Quantifying and predicting meat and meat products quality attributes using electromagnetic waves: An overview. *Meat Science*, 95, s.879-896.
- DAMEZ J.L., CLERJON S., ABOUELKARAM S., LEPETIT J. (2007): Dielectric behavior of beef meat in the 1-1500 kHz range: Simulation with the Fricke/Cole-Cole model. *Meat Science*, 77, s.512-519.
- LEPETIT J., SALE P.(2002): Electrical impedance and tenderisation in bovine meat. *Meat Science*, 60, s.51-62.
- SWANTEK P. M., CRENSHAW J. D. , MARCHELLO M. J., LUKASKI H. C. (1992): Bioelectrical impedance: a nondestructive method to determine fat-free mass of live market swine and pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 70, s.169-177.
- DOMINIQUE C., OSSARTB F., GHOMMIDH C. (2006): Development of a non-destructive salt and moisture measurement method in salmon (*Salmo salar*) filets using impedance technology. *Food Control*, 17, s.342-347.

Note:

The FPQM software package is contractually licensed to Bentley Hungary Kft. and Bentley Instruments S.A.R.L. to be used in company R&D and actual and future instruments for milk analysis.

Methods and models presented in this article are results of R&D done under the project no. VG20102015023 and they represent different new ways how to use commonly used and developed spectral methods in practice in food safety and quality issues. They also represent the practical way of usage of instruments developed under the project.

Two users of software are licensed up to today - who are manufacturers of milk analyzers. We have estimated value of financial benefit for them as 16.200.000 CZK as a costs saved by R&D investments which should have been invested if FPQM package was not created and as income of instruments implementing models and methods to be sold with usage of competitive advantages given by implementation of package into the instruments.

Development of FQPM software package has been supported by project no. VG20102015023, in programme BV, funded by MV ČR.

Přijato do tisku: 10. 10. 2015

Lektorováno: 20. 11. 2015

VLIV KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK NA TVORBU NISINU PŘI FERMENTACI SYROVÁTKY KMENY LAKTOKOKŮ

Michael Binder¹, Antonín Nehyba¹,
Alexandra Šalaková¹, Vladimír Sedlařík²

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

² - Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Universitní institut,
Centrum polymerních systémů

**Influence of cultivation conditions on nisin
formation during fermentation of whey
by *Lactococcus* strains**

Abstrakt

Pro sledování tvorby nisinu u 3 vybraných kmenů *Lactococcus lactis* byla zvolena agarová difuzní metoda na

BHI agaru s indikátorovým kmenem *Micrococcus luteus* a optimalizovány podmínky metody. Testované kmeny byly pro matečnou kulturu kultivovány na M17 agaru, v mléce, v sladké syrovátce a v BHI bujonu, potom očkované do mléka a sladké syrovátky. Výrazně nejrychlejší koagulace byla zaznamenána u kmene CCDM 731 - po 16 hod. Kmen byl dále kultivován v sladké syrovátce stacionárně i s protřepáváním po dobu 0 až 42 hod. Aerace substrátu neměla vliv na tvorbu nisinu, maximální koncentrace nisinu byla zjištěna již po 4 - 8 hodinách. Při testování různých suplementů do syrovátky pro zvýšení tvorby nisinu se jako nejlepší ukázalo použití 0,1 % Tweenu 80.

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

Abstract

The agar diffusion method on the BHI agar with use of the strain indicator *Micrococcus luteus* was selected for monitoring of nisin produce by 3 strains of *Lactococcus lactis* and the method conditions were optimized. Tested strains were cultured for the mother culture on M17 agar and in BHI broth, milk and sweet whey, then inoculated to milk and sweet whey. The strain CCDM 731 after 16 hours appeared significantly the fastest coagulation. This strain was further cultured in sweet whey stationary or with shaking for 0 - 42 hours. The aeration of the substrate did not affect the formation of nisin, the maximum concentration was detected after 4 - 8 hours. Testing of various supplements in the whey to increase nisin produce proved the best result use of 0,1 % Tween 80.

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

Úvod

Bakteriocin nisin je přírodní látka s širokou antimikrobiální aktivitou vůči technologicky nežádoucí, ale i patogenní mikroflóře potravin. Jedná se o peptid, který je produkován bakterií mléčného kvašení *Lactococcus lactis*. Světovou zdravotnickou organizací (WHO) je schválen jako potravinářské konzervační aditivum. Nisin se používá zejména jako ochrana v tepelně ošetřených potravinách a v potravinách s nízkým pH. Výhodou ošetřených potravin je prodloužená doba minimální trvanlivosti a úspora výdajů ve výrobě - snížením teploty a zkrácením času tepelného ošetření. Významná je schopnost zajištění bezpečnosti potravin působením proti G+ bakteriím, jejich spórám a zejména proti významným patogenům *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum*. O bakteriocin nisin je mimo potravinářský průmysl zájem též v medicíně a v léčbě mastitid skotu (Lertchaowayuth a spol., 2013; Delves - Brouhton a spol., 1996).

Přestože je nisin již komerčně vyráběn, celá řada výzkumných prací se zabývá problematikou, jak nisin vyrobit levně a efektivně. Syrovátka je vhodným levným médiem. Dosud tato surovina není dostatečně využívána.

Syrovátka obsahuje řadu významných nutrientů: laktózu, syrovátkové bílkoviny, minerální látky a vitaminy. Z tohoto důvodu je vhodným kultivačním médiem pro celou řadu bakterií využívajících laktózu. Produkce nisinu je však významně ovlivněna vhodným výběrem vysokoprodukčních kmenů i kultivačními podmínkami fermentace, nutričními suplementy a celou řadou dalších faktorů (Kunová a spol., 2014; De Arauz a spol., 2008).

Tvorbu nisinu podporuje i kofermentace s dalšími mikroorganismy. Liu a spol. (2006) testoval společnou fermentaci *Lactococcus lactis* a *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinka použitá ve společné fermentaci využívá vyprodukovanou kyselinu mléčnou a není konkurentem nisinproduktujícího kmene, neboť nefermentuje laktózu a tím je hlavní nutrient syrovátky využit pro bakteriální růst a produkci nisinu. Společná kultivace podpořila produkci nisinu (150 g/l) oproti samostatné kultivaci *Lactococcus lactis*. Společnou kultivaci nisin-produkující bakterie *Lactococcus lactis* a kvasinky *Kluyveromyces marxianus* popisuje Shimizu a spol. (1999). Kvasinka v kultivačním médiu působí jako regulační agens pH média.

Pro zvýšení tvorby nisinu byla použita celá řada suplementů. Jako perspektivní je popisována sacharóza. Wu (2009) popisuje navýšení produkce nisinu suplementací sacharózou, a to nejen počáteční koncentrací ve fermentačním médiu, ale významný vliv má doba a poměr přídatku v průběhu fermentace. Jiní autoři popisují suplementaci sacharózou a zdrojem dusíku za zjištěného navýšení produkce nisinu (LV, 2004). González-Toledo (2010) experimentoval s fermentací sladké syrovátky s přídatkem Tweenu a některých solí.

Kromě další suplementace - např. odučněným mlékem, živnou půdou MRS - mají vliv i další fyziologické parametry. Důležitým zjištěním byl rozdíl v aplikované teplotě fermentace. Mall a spol. (2010) konstatovali na základě studia fyzikálních parametrů, že maximální produkce nisinu byla při teplotě 30 °C, zatímco optimální teplota pro nárůst biomasy byla teplota 37 °C. Vliv míchání a počet otáček míchadla byl studován a zjištěn optimální vliv 200 ot/min při 16 hodinové kultivaci při 30 °C (Tafreshi S. H. a kol, 2010).

Tento článek navazuje na Kunová a spol., 2014. Cílem naší práce bylo otestovat vhodné suplementy a optimalizovat kultivační podmínky fermentace.

Materiál a metody

Optimalizace použité metody

Stejně jako v první části práce byla použita pro sledování tvorby nisinu agarová difuzní metoda (Kunová a spol., 2014). Metoda je založena na inhibici růstu indikátorového gram-pozitivního kmene *Micrococcus luteus* nisinem, produkováním kmeny laktokoků za vzniku inhibičních zón růstu.

Metodu jsme modifikovali tak, aby velikost zón byla optimální a zóny byly co nejlépe měřitelné. K vytvoření jamek do ztuhlého agarů jsme použili korkovrt. Byla optimalizována i dávka inokula pipetovaná do jamek a výška

agaru na miskách. Na misku pak bylo dávkováno 0,25 ml, 0,5 ml a 1 ml této suspenze, zalito BHI soft agarem, vychlazené v chladničce a poté korkovrtem vytvořeny 4 jamky o průměru 12 mm, do kterých bylo dávkováno po 0,1 ml roztoku o různé koncentraci $10^2 - 10^5$ IU/g standardu nisinu od Sigma-Aldrich, ČR.

Do otvoru ve středu misek byla naplněna matečná kultura CCDM 731 a kultivováno při 30 °C po dobu 24 hodin.

Porovnáním mohutnosti nárůstu *M. luteus* jsme zjistili, že se dají odečítat všechny misky s obsahem 0,25 ml, 0,5 ml i 1 ml suspenze, která byla připravena rozpuštěním jedné kličky z nárůstu *M. luteus* na BHI agaru ve 2 ml sterilní vody.

Použité kmeny a substráty

Seznam použitých kmenů je uveden v tabulce 1. Kmeny laktokoků CCDM 71 a CCDM 731 pocházejí ze Sbírký mikroorganismů Laktoflora® a byly vybrány jako nejproduktivnější na základě předchozích výsledků. Kmen R5 NISO byl poskytnut VŠCHT a kmen *Micrococcus luteus* ATCC 10240 Sbírkou mikroorganismů v Brně (ČR).

Tab. 1 Seznam použitých kmenů

Sbírkové číslo	Druh	Poznámka
CCDM 71	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	vybraný kmen
CCDM 731	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	vybraný kmen
R5 NISO (VŠCHT)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	nový kmen
ATCC 10240	<i>Micrococcus luteus</i>	referenční grampozitivní kmen, nisin-senzitivní

Substrátem byla sladká syrovátka z výroby eidamu o pH 6,3.

Z matečných kultur 3 kmenů - CCDM 71 z obnovené mražené kultury v M17, CCDM 731 vedeného dlouhodobě v mléce a R5 NISO (VŠCHT) z nárůstu na Petriho misce s M17 půdou - byly naočkovány 4 řady matečných kultur:

1. řada byla naočkována kličkou na Petriho misky s agarovou půdou M17
2. řada byla naočkována 2 % inokula do mléka
3. řada byla naočkována 2 % inokula do sladké syrovátky
4. řada byla naočkována 2 % inokula do BHI bujonu.

Všechny řady byly kultivovány při teplotě 30 °C/18 hod. Výsledky jsou v tabulce 2.

Výběr nejvhodnějšího nisin-produkčního kmene

V této části práce byla pozornost zaměřena na porovnání vybraných kmenů a na základě jejich růstu a produkce nisinu bylo cílem vybrat nejvhodnější kmen pro další práci. Všechny tři kultury jsme zaočkovali do mléka a do sladké syrovátky a sledovali jsme čas vysrážení, hodnoty pH - viz tabulka č. 3, počty KTJ/ml v závislosti na čase - viz tabulka 4, a dále jsme porovnali produkci nisinu na základě velikosti inhibičních zón stanovených agarovou difuzní metodou - viz tabulka 5 a obr. 2 a 3.

Vliv aerace a doby kultivace na tvorbu nisinu

Vybraný kmen CCDM 731 byl kultivován po dobu 42 hodin na třepačce za provzdušňování a současně kla-

sicky stacionárně. V časových intervalech byly odebírány vzorky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6 a na obrázcích 4 a 5.

Vliv suplementů na tvorbu nisinu

Byly testovány přídatky různých suplementů, přičemž byly použity jednak suplementy již zkoušené v předchozí části práce, jednak suplementy nově vybrané.

Byly použity dvě větší Petriho misky o průměru 11 cm. Na každou z nich byla pro srovnání použita syrovátka zaočkovaná 1 % kultury CCDM 731 bez přídatku suplementů (vzorky 1/1 a 2/1). Další vzorky syrovátky byly očkované také 1 % kultury CCDM 731 a dále obohaceny o suplementy - viz tabulka 8 (vzorky na první misce 1/2 až 1/7 a vzorky na druhé misce 2/2 až 2/6). Vzorek 2/7 na druhé misce je vzorek v čase 0 po zaočkování syrovátky 1 % kultury CCDM 731, před kultivací. Kultivace probíhala po dobu 16 hodin do druhého dne. Po ukončení kultivace bylo u vzorku změřeno pH. Petriho misky se zkoušenými vzorky byly kultivovány při 30 °C do druhého dne po dobu 24 hodin. Výsledky po změření průměrů zón jsou uvedeny v tabulce 8.

Výsledky

Optimalizace použité metody

Jako nejvhodnější u ADM byl vybrán průměr otvorů pro inokulaci testovaných kmenů o průměru 12 mm, dávka inokula 100 µl a výška nalitého agaru 5 mm.

Největší zóny se tvořily na BHI agaru s 0,25 ml suspenze - viz obr. 1.

V mléce byly po 18 hodinách kultury CCDM 71 a CCDM 731 vysráženy a kultivace proto ukončeny, kultura R5 sražená nebyla.

Po 18 hodinách byla rovněž ukončena kultivace všech kultur v syrovátce i BHI bujonu. Kultura R5 v mléce byla podle mikroskopického obrázku narostlá, ale nevysrážena. Kultivace v mléce a syrovátce byla proto ukončena až po vysrážení, tj. po 40 hodinách.



Obr. 1 Zóny koncentrační řady standardu nisinu na BHI agaru s různou koncentrací přidané suspenze *Micrococcus luteus*

Tab. 2 Hodnoty pH a mikroskopický obraz po kultivaci v BHI bujonu

kultura	pH	mikroskopický obraz
CCDM 71	6,51	převážně koky, diplokoky
CCDM 731	6,31	koky, diplokoky, ojediněle krátké streptokoky
R5 NISO	6,55	koky, diplokoky, krátké streptokoky

Výběr nejvhodnějšího nisin-produkčního kmene

Výsledky porovnávacích kultivací v mléce a syrovátce měřením pH a KTJ jsou v tabulkách 3 a 4, měření koncentrace vyprodukovaného nisinu je v tab. 5 s fotodokumentací na obr. 2 a 3.

Tab. 3 Závislost pH kultur v mléce a syrovátce na čase

kultura	pH v mléce	pH v syrovátce	čas kultivace v hodinách
CCDM 71	4,40	4,6	42
CCDM 731	4,28	4,2	16
R5 NISO	5,04	4,9	42

Tab. 4 Závislost počtu KTJ/ml kultur na čase v mléce a syrovátce

	mléko			syrovátka		
	16 h	24 h	42 h	16 h	24 h	42 h
CCDM 71	-	3,0.10 ⁸	7,6.10 ⁸	-	3,2.10 ⁸	6,0.10 ⁸
CCDM 731	16.10 ⁸	-	-	7,5.10 ⁸	-	-
R5 NISO	-	1,0.10 ⁸	2,1.10 ⁸	-	1,0.10 ⁸	2,0.10 ⁸

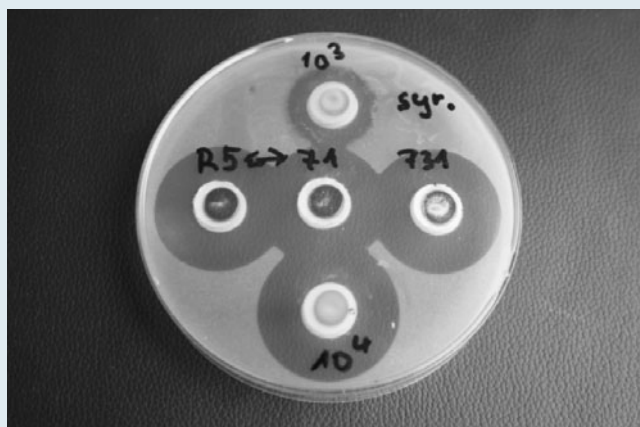
Tab. 5 Porovnání velikosti zón kultur v mléce a syrovátce a 2 koncentrací standardu nisinu

kultura	průměr zóny /mm/	
	mléko	syrovátka
CCDM 71	30	29
CCDM 731	29	30
R5 NISO	28	30
c nisinu 10 ³ IU/g	21	21
c nisinu 10 ⁴ IU/g	30	30

Z dosažených výsledků shrnutých v tabulkách 3, 4 a 5 je patrné, že ze zkoušených tří kmenů rostl nejrychleji kmen CCDM 731, u kterého došlo ke koagulaci za 16 hodin. Rovněž další parametr, tj. kyselost v mléce (pH 4,28) a v syrovátce (pH 4,2) byla u něj vyšší než u zbývajících dvou kmenů.



Obr. 2 Inhibiční zóny kmenů CCDM 71, CCDM 731, R5 NISO a standardu nisinu v mléce



Obr. 3 Inhibiční zóny kmenů CCDM 71, CCDM 731, R5 NISO a standardu nisinu v sladké syrovátce

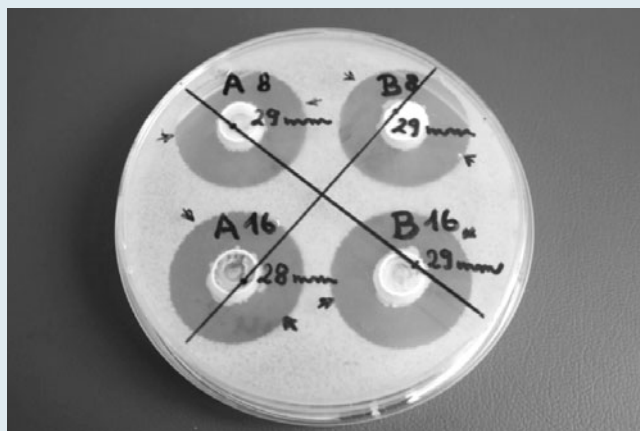
Také počty KTJ/ml $16 \cdot 10^8$ v mléce a $7,5 \cdot 10^8$ v syrovátce v závislosti na čase kultivace uvedené v tabulce 4 jsou po 16 hod. nejvyšší u kultury CCDM 731.

Porovnáním inhibičních zón v mléce dosahuje nejvyšší hodnoty 30 mm kmen CCDM 71, avšak až po 42 hod. V syrovátce dosahují nejvyšší hodnoty 30 mm kmene R5 (po 42 hodinách) a CCDM 731 (již po 16 hodinách). Kmen R5 přitom prokysal pouze na hodnotu pH 4,9 oproti hodnotě pH 4,2 u kmene CCDM 731.

Uvedené výsledky nás vedly k výběru kmene CCDM 731 jako nejrychleji rostoucího, s nejlepšími parametry (zvláště při růstu v syrovátce), a proto nejvhodnějšího pro využití v další práci.

Tab. 6 Kultura CCDM 731, očkováno 1 %, médium sterilizovaná syrovátka

Kultivace /hod/	Kultivace A s protřepáváním			Kultivace B stacionární - bez aerace		
	pH	KTJ/ml	inhibiční zóna /mm/	pH	KTJ/ml	inhibiční zóna /mm/
8	4,84	$3,2 \cdot 10^8$	29	4,61	$3,4 \cdot 10^8$	29
16	4,34	$4,6 \cdot 10^8$	28	4,33	$5,6 \cdot 10^8$	29
24	4,37	$5,6 \cdot 10^8$	28	4,26	$5,4 \cdot 10^8$	28
30	4,24	$5,5 \cdot 10^8$	28	4,13	$4,6 \cdot 10^8$	28
42	4,22	$4,1 \cdot 10^8$	28	4,10	$4,3 \cdot 10^8$	28



Obr. 4 Inhibiční zóny nisinu po kultivaci CCDM 731 8 a 16 hodin v sladké syrovátce

Vliv aerace a doby kultivace na tvorbu nisinu

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6 a na obrázcích 4 a 5.

Z výsledků je patrné, že aerace nemá vliv na tvorbu nisinu a proto byly další kultivace v syrovátce prováděny stacionárně. Na základě dosažených výsledků tvorby nisinu - s maximem již po 8 hod. - bylo rozhodnuto doplnit časovou řadu v rozmezí 0 až 8 hod. Podle výsledků uvedených v tabulce 7 vyplývá, že maximum nisinu se tvoří již mezi 4 až 8 hodinami kultivace.

Tab. 7 Kultura CCDM 731, očkováno 1 %, médium sterilizovaná syrovátka

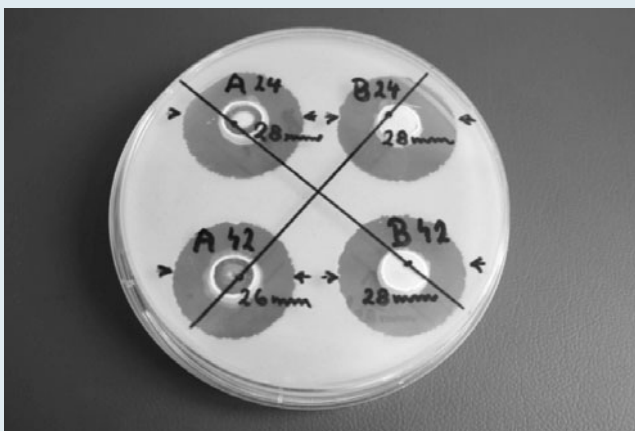
kultivace /hod/	pH	inhibiční zóna /mm/
0	5,5	28
2	5,36	29
4	5,13	30
6	4,67	30
8	4,44	30

Vliv suplementů na tvorbu nisinu

Nejvyšší hodnota nisinu byla pochopitelně naměřena u vzorku 1/7 s přidavkem 0,25 % nisinu. Druhé nejvyšší hodnoty bylo dosaženo přidavkem 0,1 % Tweenu 80 k použité syrovátce a byl proto vybrán jako nejvhodnější suplement (Tab. 8 a obr. 6 a 7).

Diskuse

Byla potvrzena (viz Kunová a spol., 2014) správná volba kmene CCDM 731 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* při fermentaci sladké syrovátky s ohledem na maximální tvorbu nisinu a v porovnání s kmenem R5 vedle již dříve testovaných. Jeho růst a schopnost prokysání byly potvrzeny jak v mléce, tak i syrovátce. Metoda kvantitativního stanovení množství nisinu - agarová difusní metoda - byla lépe aplikovatelná na Petriho miskách o větším průměru (11 cm), s větším průměrem jamek (12 mm), a s vyšší inokulační dávkou 100 μ l než podle původní metodiky (Kunová a spol., 2014). Aerace substrátu třepáním kultivační nádoby



Obr. 5 Inhibiční zóny nisinu po kultivaci CCDM 731 24 a 42 hodin v sladké syrovátce

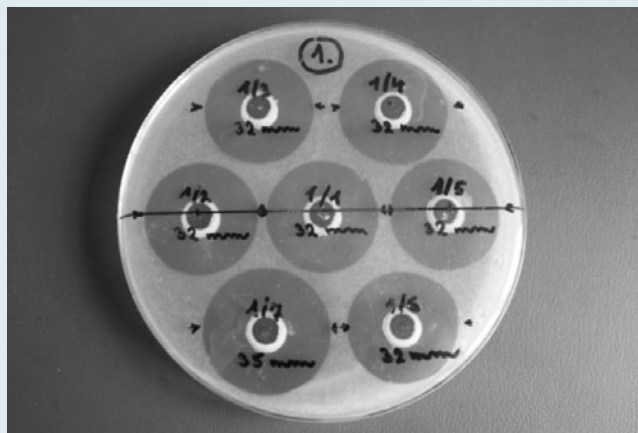
Tab. 8 Vyhodnocení vlivu suplementů na produkci nisinu kmene CCDM 731

vzorek		inhibiční zóna /mm/	pH
Miska č. 1			
1/1	+ 1 % CCDM 731	32	4,34
1/2	+ 1 % suspenze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32	4,41
1/3	+ 1 % <i>Kluyveromyces marxianus</i>	32	4,30
1/4	+ 4 % sacharózy	32	4,38
1/5	+ 1 % sójového peptonu	32	4,42
1/6	+ 1 % kvasničného extraktu	32	4,42
1/7	+ 0,25 % nisinu	35	5,32
Miska č. 2			
2/1	+ 1 % CCDM 731	32	4,34
2/2	+ 10 % mléka (1,5 % tuku)	32	4,40
2/3	+ 4 % laktózy	32	4,46
2/4	+ 4 % glukózy	31	4,43
2/5	+ 10 % tekuté živné půdy M17	32	4,37
2/6	+ 0,1 % Tweenu 80	33	4,46
2/7	+ 1 % CCDM 731 v čase 0 před kultivací	30	5,62

by neměla vliv na tvorbu nisinu, v literatuře je však míchání během stacionární (Tafreshi a kol., 2010) i v průběhu kontinuální (viz González-Toledo a kol., 2010) fermentace uváděno jako stimulační, avšak jen do jisté výše otáček nebo při určitém průtoku vzduchu. Klasickou šaržovou fermentací sladké sterilované syrovátky vybraným kmenem jsme dosáhli maximální koncentrace již po 4 hod., avšak vzhledem k nutnosti připravit nisin ve větším množství kontinuální fermentací s konstantním pH má toto zjištění význam jen pro popsané laboratorní podmínky. V další fázi projektu proto bude produkce nisinu již prováděna kontinuální metodou, pro niž literatura uvádí maximální produkci po 6 hod. (González-Toledo a kol., 2010) při konstantním pH. Ze suplementů na podporu tvorby nisinu se nám nejvíce osvědčil Tween 80 často doporučovaný v odborné literatuře (González-Toledo a kol., 2010).

Závěr

Rozšířili jsme portfolio dříve testovaných kmenů CCDM 71 a CCDM 731 o kmen R5 NISO (VŠCHT) a porovnali



jejich produkci nisinu pomocí optimalizované agarové difuzní metody za použití indikátorového kmene *Micrococcus luteus* ATCC 10240. Jako nejlepší nisin-produkční kmen byl na základě porovnávacích parametrů vybrán kmen CCDM 731, s kterým jsme provedli další pokusy směřující k optimalizaci produkce nisinu.

Prověřili jsme přidávky některých suplementů, včetně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, a vliv aerace na produkci nisinu během vsádkové fermentace. Kofermentace s kvasinkami nepotvrdila pozitivní vliv na produkci nisinu. Ze zkoušených suplementů měl největší vliv na tvorbu nisinu přírůstek Tweenu 80. Aerace za podmínek laboratorní kultivace na třepače neměla na tvorbu nisinu žádný vliv.

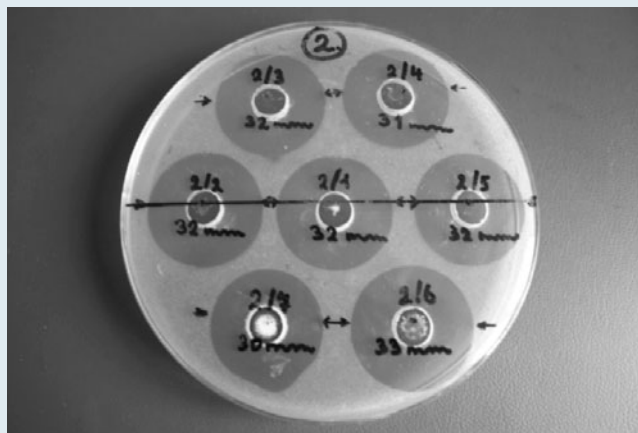
Získané poznatky budou následně ověřeny při kontinuální fermentaci v laboratorním fermentoru s následnou separací nisinu vhodnými izolačními technikami.

Poděkování

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

Literatura

- DE ARAUZ L. J., JOZALA A. F., PINHEIRO G. S., MAZZOLA P. G., JUNIOR A. P., VESSONI PENNA T. C. (2008): Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk they medium. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83, s.325-328.
- DELVES-BROUGHTON J., BLACKBURN P., EVANS R.J., HUGENHOLTZ J. (1996): Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(2), s.193-202.
- GONZÁLEZ-TOLEDO S.Y., DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ J., GARCÍA-ALMENDÁREZ B.E., PRADO-BARRAGÁN L.A., REGALADO-GONZÁLEZ C. (2010): Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *Journal of Food Science*, 75, 6: s.347-353.
- KUNOVÁ G., SEDLAŘÍK V., KLIMEŠOVÁ M., RAŠKOVÁ Z., HYRŠLOVÁ I., ŠALAKOVÁ A., DRÁB V. (2014): Využití syrovátky jako růstového média pro nisin produkční kmeny laktobacilů. *Mlékařské listy*, 146, s.I-IV.
- LERTCHAOWAYUTH T., NOONPAKDEE W., RENGPIPAT S. (2013): Inhibition of foodborne pathogens by nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC20 in two model foods. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 7,(3), s.181-195.
- LIU C., HU B., LIU Y., CHEN S. (2006): Stimulation of nisin production from whey by a mixed culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 131(1-3), s.751-61.



Obr. 6 a 7 Inhibiční zóny nisinu po kultivaci CCDM 731 16 hodin v sladké syrovátce s různými suplementy

- LV W., CONG W., CAI Z. (2004): Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* under nutritional limitation in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 26,3, s.235-238.
- MALL P., MOHANTY B. K., PATANKAR D. B., MODY R., TUNGA R. (2010): Physiochemical parameters optimization for enhanced nisin production by *Lactococcus lactis* (MTCC 440). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53, s.203-209.
- TAFRESHI S. H., MIRDAMADI S., NOROUZIAN D., KHATAMI S., SARDARI S. (2010): *African Journal of Biotechnology*, 9(9), s.1382-1391.
- WU Z., WANG L., JING Y., LI X., ZHAO Y. (2009): Variable volume fed-batch fermentation for nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* W28. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 19, 152 (3), s.372-382.

Poznámka: autorem obrázků je Antonín Nehyba
Přijato do tisku: 20. 10. 2015
Lektorováno: 16. 11. 2015

ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK KRAVSKÉHO A KOZÍHO MLEZIVA VŮČI NEŽÁDOUCÍM MIKROORGANISMŮM

Horáčková Šárka, Skalka Volodymyr, Solichová
Kateřina, Čurda Ladislav

Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
sarka.horackova@vscht.cz

Abstrakt

V práci byl testován růst nežádoucích a podmíněně patogenních mikroorganismů (*Escherichia coli* CNTC 6859, *Staphylococcus aureus* CCM 8851, *Bacillus cereus* 2007, *Enterobacter* spp. X1, *Listeria innocua* LN03) v kravském a kozím mlezivu v porovnání s mlékem. U jednotlivých vzorků kravského mleziva bylo zjištěno potlačení růstu mikroorganismů *E. coli*, *Enterobacter* spp. a *S. aureus*. Agarová difuzní metoda potvrdila stimulaci růstu všech testovaných mikroorganismů zřejmě v důsledku difúze nízkomolekulárních látek do agaru. U směsných vzorků kravského mleziva byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi mlezivem a mlékem pouze pro *S. aureus* (nižší nárůst v mlezivu). Všechny vzorky kozího mleziva vykazovaly statisticky významné potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů v porovnání s kravským mlékem.

Klíčová slova: kravské kolostrum, kozí kolostrum, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*

Antimicrobial effect of cow and goat colostrum against undesirable microorganisms

Abstrakt

The growth of undesirable and potential pathogenic microorganisms (*Escherichia coli* CNTC 6859, *Staphylo-*

coccus aureus CCM 8851, *Bacillus cereus* 2007, *Enterobacter* spp. X1, *Listeria innocua* LN03) in cow and goat colostrum compared with milk was tested in this work. Individual samples of cow colostrum inhibited the growth of *E. coli*, *Enterobacter* spp. and *S. aureus*. The agar diffusion method confirmed the growth stimulation of tested microorganisms presumably due to low molecular weight substances. For mixed samples of cow colostrum statistically significant difference between the growth in colostrum and milk was confirmed only for *S. aureus* (lower concentration in colostrum). All samples of goat colostrum showed statistically significant suppression of growth of undesirable microorganisms in comparison with cow milk.

Key words: cow colostrum, goat colostrum, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*

Úvod

Samotné mléko je zdrojem celé řady nutričně významných látek a jeho konzumace je navíc doporučována řadou odborníků i z hlediska přítomnosti mnoha biologicky aktivních sloučenin (bioaktivní peptidy, oligosacharidy, vápník, antimikrobiální látky apod.) (Mills a kol., 2011). Pozornost vědců se zaměřuje rovněž na výzkum složení a účinků různých druhů mleziva (kolostra), které se v posledních letech ve větší míře objevuje na našem trhu v podobě nejrůznějších doplňků stravy.

Mlezivo je první mléko produkované mléčnou žlázou savců přibližně 24 - 72 h po porodu, které má zásadní význam pro prvotní výživu a imunologickou ochranu mláďat (Hernández-Castellano a kol., 2015). Kromě základních nutrientů obsahuje složky ovlivňující imunitní systém (imunoglobuliny, laktoferin, laktoperoxidasa, lysozym) a tzv. růstové faktory (IGF-1, IGF-2, TGF- β , apod.), u kterých bylo prokázáno, že stimulují růst a dělení savčích buněk (Pakkanen a Aalto, 1997). Jako hlavní antimikrobiální látky mleziva se uplatňují laktoferin a jeho štěpné produkty a laktoperoxidasa. U laktoferinu byly popsány dva způsoby bakteriostatické a baktericidní aktivity. Prvním je silná schopnost laktoferinu vázat železo, které potřebují mikroorganismy ke svému metabolismu. Tento přímý bakteriostatický efekt laktoferinu byl prokázán v mnoha *in vitro* studiích. Laktoferin ale vykazuje i antimikrobiální aktivitu nezávislou na vázání železa, kdy se zřejmě přímo váže na mikrobiální membránu a ovlivňuje její permeabilitu. Stejně dobře je popsán i účinek laktoperoxidasového systému, který kromě laktoperoxidasy zahrnuje H₂O₂ a ionty SCN⁻, proti celé řadě mikroorganismů i virů. Koncentrace lysozymu v kravském kolostru je pravděpodobně příliš nízká, aby významně přispíval k antibakteriální aktivitě (Hooijdonk a kol., 2000; Tomita a kol., 1991). Další antimikrobiální účinek kolostra může spočívat v blokaci adheze nežádoucích mikroorganismů, jak bylo prokázáno v *in vitro* studii (Maldonado-Gomez a kol., 2015).