

Seznam literatury

- DOREAU M; MARTIN-ROSSET W. (2003): Horse. In: Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (edit.): *Encyclopedia of Dairy Sciences* (1. ed.). (pp. 630-637). New York, Academic Press.
- MALACARNE M., MARTUZZI F., SUMMER A., MARIANI P. (2002): Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, 12, s. 869-877.
- PARK YW, ZHANG H., ZHANG B., ZHANG L. (2006): Mare milk. In: Park YW and Haenlaein GFW. (edit.): *Handbook of milk of non-bovine mammals* (1. ed.). (pp. 275-296). London, UK, Blackwell Publishing Professional.
- PIESZKA M., ŁUSZCZYŃSKI J., ZAMACHOWSKA M., AUGUSTYN R., DŁUGOSZ B., HEĐRZAK M. (2016): Is mare milk an appropriate food for people? - A review. *Annals of Animal Science*, 16, s. 33-51.
- UNIACKE-LOWE T., HUPPERTZ T., FOX P.F. (2010): Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance. *International Dairy Journal*, 20, s. 609-629.

Přijato do tisku: 12. 9. 2016

Lektorováno: 3. 10. 2016

SEMI-KONTINUÁLNÍ FERMENTACE SLADKÉ SYROVÁTKY ZA ÚČELEM PRODUKCE NISINU KMENEM *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 731

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

Semi-continuous fermentation of sweet whey by strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 to produce nisin

Abstrakt

V této studii byla ověřována semi-kontinuální fermentace sladké čerstvé a obnovené syrovátky pro produkci nisinu za udržování konstantního pH. K fermentaci syrovátky byl použit kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 s vysokou produkcí nisinu. Vliv provzdušňování na produkci bakteriocinu nebyl při předchozí vsádkové fermentaci potvrzen, proto při semi-kontinuální fermentaci nebylo provzdušňování aplikováno. Substrát byl v pravidelných intervalech odebírán a analyzován na aktivitu nisinu pomocí agarové difuzní metody. Úbytek fermentu byl vždy nahrazen čerstvou syrovátkou. Souběžně se semi-kontinuální fermentací byla provedena jako srovnávací fermentace vsádková. Bylo zjištěno, že za optimalizovaných podmínek (30 °C a přídatku 0,1 % Tweenu 80) byla produkce nisinu maximální již po 6 hodinách a poté již byla konstantní.

Klíčová slova: Nisin, laktokoky, sladká syrovátka, semi-kontinuální fermentace

Abstract

The production of nisin in semi-continuous fermentations of fresh and reconstituted sweet whey was tested in this study. The selected nisin-high-producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 was used for these fermentations realized at constant pH. The effect of aeration was not confirmed during batch fermentation and therefore aeration was not further applied. In semi-continuous process, a portion of the culture was withdrawn at regularly intervals and analysed on nisin activity by agar diffusion method. Culture depletion was always substituted by fresh medium. The parallel batch fermentation was performed to compare the effect on the production of nisin. Higher nisin production was investigated in semi-continuous fermentation and the maximum nisin activity was reached for 6 hours at optimised conditions: 30°C, addition of 0.1% Tween 80. The nisin activity stayed constant after this time.

Keywords: Nisin, lactococci, sweet whey, semi-continuous fermentation

Úvod

Nisin je přírodní bakteriocin přidávaný do potravin, farmaceutických a dentálních výrobků pro jejich konzervaci. Inhibuje klíčení spór bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium* a růst některých gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Bakteriocin nisin je produkován určitými kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Ross a kol., 2002).

Ačkoliv je nisin již komerčně vyráběn, celá řada výzkumných prací se zabývá problematikou, jak ho vyrobit levně a efektivně. Nedostatečně využitým vhodným levným médiem je syrovátka. Surovátka obsahuje řadu významných nutrientů: laktózu, syrovátkové bílkoviny, minerální látky a vitamíny, a proto je vhodným kultivačním médiem pro celou řadu bakterií využívajících laktózu.

Produkce nisinu je však významně ovlivněna vhodným výběrem vysokoprodukčních kmenů i kultivačními podmínkami fermentace – pH, teplotou, mícháním a provzdušňováním, dále substrátem, nutričními suplementy a produktovými inhibicemi, tj. adsorpcí nisinu na produkční buňky a enzymatickým štěpením (Parente a Ricciardi, 1999). Mall uvádí (Mall a kol., 2010), že maximální produkce nisinu byla při teplotě 30 °C, zatímco optimální teplotou pro nárůst biomasy byla teplota 37 °C. Obecně platí, že pH 6,0 vede k adsorpci nisinu na buňky a pH 2,0 podporuje jeho maximální separaci od buněk (Yang a kol., 1992). Dále na pH roztoku závisí rozpustnost, stabilita a biologická aktivita nisinu. Při fermentaci za pH pod 6,0 je více než 80 % vyprodukovaného nisinu volně v médiu, při pH nad 6,0 je většina nisinu navázána na buněčné membrány, ne však cytoplasmu. S klesajícím pH významně roste rozpustnost i stabilita, naopak v neutrální a alkalické oblasti je nisin z větší části nerozpustný (Vessoni a kol., 2005).

Materiál a metody

Laboratorní stolní bioreaktor Labfors 4, pracovního objemu 1,5 l, s X-DDC jednotkou a s řídicím PC softwarem pro otáčky, teplotu a udržování nastaveného pH, s poloautomatickým odběrem vzorků a dávkováním ingrediencí, stolní pH-metr WTW, přenosný pH-metr zn. SPEAR, třepačka GFL 3017, SRN; vzorkovnice plastové 2 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, Erlenmayerovy baňky, lahve pro sterilaci, termostat 30 °C, pipety a běžné vybavení laboratoře.

Tween 80, Sigma Aldrich; hydroxid sodný p. a.; kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, Sběrka mlékařských mikroorganismů Laktoflora®; suspenze byla připravena po kultivaci v M 17 bujonu (Merck, Německo) při teplotě 30 °C po dobu 24 hod., indikátorový kmen *Micrococcus luteus* ATCC 10240, Sběrka mikroorganismů v Brně, kultivace na BHI agaru (Merck, Německo), standard Nisin, 1 g odpovídá 1 000 000 IU, Sigma Aldrich ČR; půda MRS, MILCOM a.s., Tábor.

Vsádkové fermentace pro zjištění vlivu aerace

Byly provedeny 2 souběžné vsádkové fermentace po dobu až 42 h, jedna (A) se simulací aerace pomocí třepačky vedle kontrolní (B) bez třepání substrátu. Médiem byla sterilizovaná obnovená sladká syrovátka, očkovací dávka byla 1 % a inkubace při 30 °C. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 a na obrázcích 1 a 2.

Následovaly dvě fermentace v bioreaktoru. Substrátem ve fermentaci č. 1 byla čerstvá syrovátka odebraná při prvním odpouštění při výrobě Eidamu 30 % t.v s. v závodě MADETA a.s., Planá n. Lužnicí, ve fermentaci č. 2 byla médiem obnovená sladká syrovátka, výrobce sušené syrovátky Moravia Lacto a.s., závod Jihlava.

Semi-kontinuální fermentace č. 1 sladké syrovátky kmenem CCDM 731

Čerstvá syrovátka nebyla filtrována nebo odstředována, ale zpracována podle tohoto postupu: Do 2 litrů syrovátky rozdělených po 1 litru bylo přidáno 0,1 % Tweenu 80 a zahřáto na 50 °C pro jeho rozpuštění, pH syrovátky bylo upraveno po zchlazení na 6,45 a poté vše sterilováno při 110 °C / 20 min. Do 1,5 litru syrovátky určené k udržení konstantního objemu vždy po odběru 100 ml vzorku po 3 hodinách bylo přidáno 0,1 % Tweenu 80, rozplněno po 100 ml do 300 ml lahví a sterilováno 110 °C / 20 min. Po vychlazení po sterilaci bylo přidáno do každého litru 1 % (10 ml) kultury CCDM 731. 1 litr byl použit pro stacionární kontrolní fermentaci a 1 litr pro vsádku fermentoru. Obě fermentace byly spuštěny současně.

Parametry semi-kontinuální fermentace:

- Otáčky míchadla: 60 ot. / min.
- Provozdušňování: ne
- Teplota: 30 °C, chlazení pitnou vodou
- pH: udržováno na 6,1 úpravou 0,5 M NaOH při poklesu o 0,1 pH (pH syrovátky v čase 0 bylo 6,45), celková spotřeba 0,5 M NaOH / 24 h byla 323 ml

- doba fermentace: 24 h
- odběr vzorků: po 3 hodinách á 100 ml pro stanovení nisinu agarovou difuzní metodou (skladováno v chladu při 2 °C až 8 °C) a ke koncentraci a čištění (odstředěním, vysolováním, zahušťováním aj.), skladováno při - 20 °C.

Parametry kontrolní vsádkové fermentace:

- Míchání: ne
- Teplota: 30 °C, termostat
- pH: neudržováno, měřeno každé 3 hodiny
- doba fermentace: 24 h
- odběr vzorků: po 3 hodinách 1 ml pro stanovení nisinu agarovou difuzní metodou (ADM)

Semi-kontinuální fermentace č. 2 obnovené sladké syrovátky kmenem CCDM 731

- Byly připraveny 4 litry obnovené sladké syrovátky (7,5 g do 92,5 ml vody)
- Složení substrátu po obnovení: tuk 0,04 %; protein 1,1 %; laktosa 6,04 %; celková sušina 7,62 %.
- 1 litr byl určen do fermentoru a 3 litry na doplňování po odebrání vzorků, přičemž do každé části bylo přidáno 0,1 % Tweenu 80 a vysterilováno při 0,12 MPa/15 min, společně s 0,5 litrem 1 M NaOH rozplněného do tří 200 ml lahvíček k automatické úpravě pH. 1 litr sterilního substrátu byl vytemperován na 30 °C a zaočkován 1 % CCDM 731.
- Pro urychlení fermentace byla vsádka předkultivována při 30 °C po dobu 3,5 h. Měřením pH syrovátky byly zjištěny hodnoty: po předkultivaci 5,7, před sterilací 6,5, po sterilaci 6,1.
- Byly odebírány 100 ml vzorky vždy po 1 h. Po každém odběru bylo doplněno 100 ml čerstvé syrovátky. Současně bylo udržováno pH pomocí 1 M NaOH na hodnotě 6,0 a teplota 30 °C.
- Na začátku fermentace bylo pH 5,56. Otáčky míchadla: 60 ot. / min. Stejně jako ve fermentaci č. 1 nebylo použito provozdušňování.
- Skutečná celková spotřeba 1 M NaOH zjištěná odměřením zbytku louhu po skončení fermentace byla 59 ml.
- Vzorky byly ihned vychlazené a poté zamrazeny do doby analýzy metodou ADM, výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tvorba nisinu byla sledována pomocí agarové difuzní metody ADM (Kunová a kol., 2014; Chumchalová a kol., 1995).

Tab. 1 Parametry fermentace č. 2

Číslo vzorku	Čas odběru /h/	1M NaOH* /ml/	pH
1	1	17,8	6,03
2	2	22,6	6,00
3	3	29,7	6,00
4	4	37,1	6,00
5	5	45,3	6,00
6	6	54,3	5,99
7	7	63,2	5,98

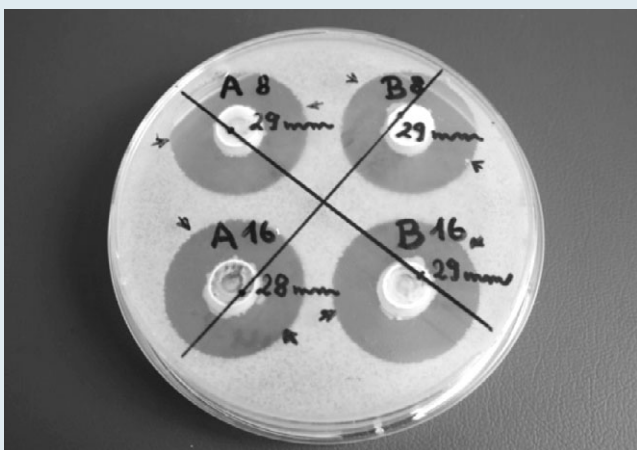
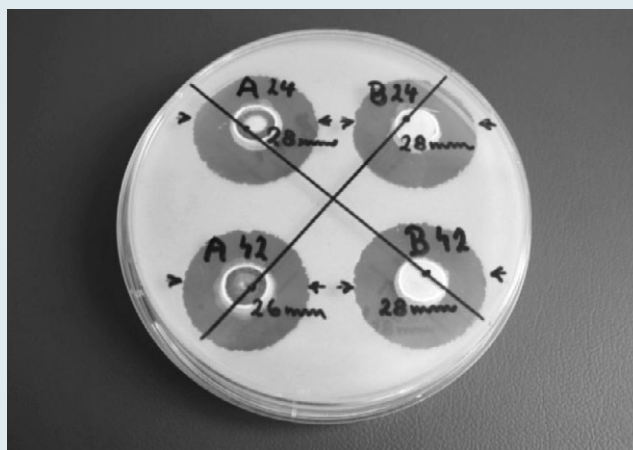
* digitální výstup PC

Výsledky

Vliv aerace a doby kultivace na tvorbu nisinu

Tab. 2 Vsádkové fermentace pro ověření vlivu provzdušňování, kultura CCDM 731, očkováno 1 %, médium sterilizovaná sladká syrovátka, inkubace 30 °C

Kultivace /h/	Kultivace A s protřepáváním			Kultivace B stacionární - bez aerace		
	pH	KTJ/ml	inhibiční zóna /mm/	pH	KTJ/ml	inhibiční zóna /mm/
8	4,84	3,2.10 ⁸	29	4,61	3,4.10 ⁸	29
16	4,34	4,6. 10 ⁸	28	4,33	5,6. 10 ⁸	29
24	4,37	5,6. 10 ⁸	28	4,26	5,4. 10 ⁸	28
30	4,24	5,5. 10 ⁸	28	4,13	4,6. 10 ⁸	28
42	4,22	4,1. 10 ⁸	28	4,10	4,3. 10 ⁸	28

**Obr. 1** Inhibiční zóny nisinu po kultivaci CCDM 731 8 h a 16 h v sladké syrovátce**Obr. 2** Inhibiční zóny nisinu po kultivaci CCDM 731 24 h a 42 h v sladké syrovátce

Z výsledků je patrné, že aerace neměla vliv na tvorbu nisinu, a proto byly další kultivace, včetně kontinuálních, prováděny bez provzdušnění. Na základě analýzy odebraných vzorků metodou ADM bylo zjištěno maximum tvorby nisinu již po 8 hodinách, proto bylo rozhodnuto fermentovat syrovátku a sledovat produkci nisinu v rozmezí 0 až 8 hodin.

Tab. 3 Vsádková fermentace, kultura CCDM 731, očkováno 1 %, médium sterilizovaná syrovátka, inkubace 30 °C

kultivace /h/	pH	inhibiční zóna /mm/
0	5,50	28
2	5,36	29
4	5,13	30
6	4,67	30
8	4,44	30

Podle výsledků uvedených v tabulce 3 vyplývá, že za daných podmínek se maximum nisinu tvořilo již mezi 4. až 8. hodinou kultivace.

Semi-kontinuální fermentace č. 1 sladké syrovátky kmenem CCDM 731

V tabulce 4 jsou zaznamenány důležité parametry této fermentace spolu s parametry souběžně provedené vsádkové fermentace a zjištěné zóny jednotlivých vzorků podle

agarové difusní metody odpovídající koncentraci přítomného nisinu.

Vzorky byly ihned vychlazeny a poté zamrazeny do doby analýzy metodou ADM.

Produkce nisinu po 12 hodinách již dále nestoupala, proto opakovaná fermentace č. 2 byla provedena s kratší dobou kultivace, kvůli standardnosti substrátu s obnovenou sladkou syrovátkou a s nově připravenými kulturami

Tab. 4 Porovnání vsádkové a semi-kontinuální fermentace č. 1 a inhibiční zóny podle ADM

Vzorek číslo	Čas /h/	Vsádková fermentace		Semi-kontinuální fermentace č. 1	
		pH	zóna /mm/	spotřeba 0,5 M NaOH /ml/	zóna /mm/
0	0	5,80	18	0	18
1	3	5,75	20	3,8	20
2	6	5,0	21	23,2	22
3	9	4,50	21	65,8	22
4	12	4,30	21	116,1	22
5	15	4,20	20	162,5	22
6	18	4,16	20	211,0	22
7	21	4,12	20	260,7	22
8	24	4,10	20	269,0	22
nisin 10 ³ IU.ml ⁻¹			23		23
nisin 10 ⁴ IU.ml ⁻¹			28		28

CCDM 731 a *Micrococcus luteus*. Podmínky kultivace byly stejné jako u fermentace č. 1.

Semi-kontinuální fermentace č. 2 sladké syrovátky kmenem CCDM 731

Tab. 5 Inhibiční zóny vzorků ze semi-kontinuální fermentace č. 2, metoda ADM

Popis vzorku	Zóny /mm/	koncentrace nisinu* /mg . l ⁻¹ /
Standard nisinu 10 ² IU/ml	19	2,5
Standard nisinu 10 ³ IU/ml	28	25
Standard nisinu 10 ⁴ IU/ml	32	250
Vzorek 0 h (předkultivovaný substrát s kulturou)	26,5	23-24*
Vzorek 1 h	27	25*
Vzorek 2 h	27	25*
Vzorek 3 h	27	25*
Vzorek 4 h	27	25*
Vzorek 5 h	27	25*
Vzorek 6 h	27	25*
Vzorek 7 h	27	25*

* přepočten 1 mg.l⁻¹ = 40 IU.g⁻¹

*orientační hodnoty

Při semi-kontinuální fermentaci č. 2 byla zjištěna aktivita nisinu pomocí metody ADM v porovnání s fermentací č. 1 vyšší, průměr zón dosáhl 27 mm. Bylo zde použito obnovené syrovátky pro lepší opakovatelnost pokusu a zároveň jsme použili předkultivování substrátu, což obojí zřejmě mělo příznivý vliv na kvantitu nisinu. Koncentrace nisinu zůstala od 4. až 5. hodiny (se započtením předkultivace) stabilní a potvrdil se obdobný výsledek z fermentace č. 1, že nejvyšší produkce nisinu je do 6. hodiny kultivace a pak zůstává konstantní.

Diskuse

Na základě stacionárních fermentací s kulturou CCDM 731 při fermentaci sladké syrovátky při 30 °C jsme zjistili, že aerace neměla vliv na tvorbu nisinu, a proto byly další kultivace v syrovátce prováděny bez ní. Na základě výsledků dosažených při stacionární fermentaci s maximem tvorby nisinu do 8 hodin byly uskutečněny dvě semi-kontinuální fermentace s udržováním konstantního pH 6,0 v bioreaktoru a doplňováním čerstvé syrovátky za fermentát odebraný v pravidelných intervalech. Některé zdroje (Nagalakshmi kol., 2013; Senan a kol., 2016) doporučují pro fermentační podmínky i pH 6,5 nebo teplotu 37 °C, popř. i vyšší otáčky míchadla.

Produkce nisinu v první fermentaci s čerstvou syrovátkou po 12 hodinách již dále nestoupala, proto další fermentace byla provedena s kratší dobou kultivace a kvůli standardnosti substrátu s obnovenou sladkou syrovátkou při zachování podmínek kultivace. Antimikrobiální aktivita však nemusí být výsledkem aktivity pouze bacteriocinu nisinu, může být ovlivněna i působením dalších složek.

Pokračováním studie bude zkoncentrování a izolace nisinu z fermentátu vzniklého za výše uvedených optimalizovaných podmínek za účelem přípravy preparátu s obsahem antimikrobiálních látek, nikoliv čistého nisinu.

Závěr

Na základě optimalizace podmínek stacionární fermentace sladké syrovátky jako zdroje živin pro nisin-produkující kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 byly odzkoušeny kontinuální fermentace v bioreaktoru s regulovanou hodnotou pH 6,0 a při teplotě 30 °C, za míchání, ale bez provzdušňování. Produkce nisinu vzrůstala do 6. hodiny procesu a s přibývajícím časem byla již konstantní, jak bylo prokázáno v průběžně odebíraných vzorcích metodou agarové difuzní metody. Nezbytným návazným krokem je však výzkum a aplikace dalších separačních postupů vedoucích k získání koncentrovaného preparátu o vyšší antimikrobiální aktivitě.

Poděkování

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

Literatura

- CHUMCHALOVÁ J., JOSEPHSEN J., PLOCKOVÁ M. (1995): Characterization of acidocin CH5, a saccharolytic sensitive bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 17: s. 145-150.
- KUNOVÁ G., SEDLAŘÍK V., KLIMEŠOVÁ M., RAŠKOVÁ Z., HYRŠLOVÁ I., ŠALAKOVÁ A., DRÁB V. (2014): Využití syrovátky jako růstového média pro nisin produkční kmeny laktobaciliů. *Mlékařské listy* 146, I-IV.
- MALL P., MOHANTY B. K., PATANKAR D. B., MODY R., TUNGA R. (2010): Physicochemical parameters optimization for enhanced nisin production by *Lactococcus lactis* (MTCC 440). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53: 203-209.
- NAGALAKSHMI P. K., SUMATHI R., KANIMOZHI K., SIVAKUMAR T. (2013): Isolation of bacteriocin nisin producing *Lactococcus lactis* from dairy products. *J. Acad. Indus. Res.*, Vol. 1(10), s. 627-630.
- PARENTE E., RICCIARDI A. (1999): Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, s. 268-272.
- ROSS R. P., MORGAN S., HILL C. (2002): Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, s. 3-16.
- SENAN S., EL-AAL H. A., DAVE R., HASSAN A. (2016): Production and stability of nisin in whey protein concentrate. *Food Science and Technology*, 71, s. 125 - 129.
- VESSONI PENNA T. C., JOZALA A. F., NOVAES L. C., PESSOA JR. A., CHOLEWA O. (2005): Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, s. 619-637.
- YANG R., JOHNSON M. C., RAY B. (1992): Novel method to extract large amount of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, s. 3355 - 3359.

Přijato do tisku: 10. 9. 2016

Lektorováno: 5. 10. 2016