

- MARTINEAU F., PICARD J.F., ROY H.P., OUELLETTE M., BERGERON M.G. (1998): Species-specific and ubiquitous DNA-based assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clinical Microbiol.*, 36, s. 618-623.
- MARTINS K.B., FACCIOLI P.Y., BONESSO M.F., FERNANDES S., OLIVEIRA A.A., DANTAS A., ZAFALON L.F., CUNHA M.R.S. (2017): Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 100/3, s. 2184-2195.
- MONDAY S.R., BOHACH G.A. (1999): Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clinical Microbiol.*, 37, s. 3411-3414.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- SEDLÁČEK O. (2007): *Taxonomie prokaryot*, Masarykova univerzita Brno, s. 241-242, ISBN 80-210-4207-9.
- SNEL G.G.M., MALVISI M., PILLA R. (2014): Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk. *Vet. Microbiol.*, 174, s. 489-495.
- TAPONEN S., PYÖRÄLÄ S. (2009): Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis - Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.*, 134, s. 29-36.

Korespondující autor: Ing. Irena Němečková, Ph.D.,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a, 160 00
Praha 6, nemeckova@milcom-as.cz

Přijato do tisku: 11. 9. 2017

Lektorováno: 1. 10. 2017

VLIV SUPLEMENTACE SACHARIDY A DUSÍKATÝMI LÁTKAMI NA PRODUKCI NISINU V SYROVÁTKOVÝCH MÉDIÍCH

Marie Marková¹, Alexandra Šalaková¹, Michael Binder¹,
Antonín Nehyba¹, Jitka Peroutková¹, Vladimír Sedlařík²,
Jan Drbohlav¹

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

2 - Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Centrum polymerních
systémů

Effect of Carbohydrate and Nitrogen Supplementation on Nisin Production in Whey Films

Abstrakt

Nisin je polypeptid významný pro svoji antibakteriální aktivitu. U vybraného kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 produkujícího nisin byl testován přídavek různých zdrojů dusíku a uhlíku na produkci nisinu. Byly odzkoušeny přídavky peptonu, sojového peptonu a kyselého kaseinového hydrolyzátu v dávce 2 % a laktóza a maltodextrin v dávce 5 % a 10 %. Produkce nisinu byla sledována agarovou difúzní metodou. Jako indikátor inhibice růstu byl použit kmen *Micrococcus luteus* ATCC

10240. Současně byly provedeny paralelní pokusy se všemi kombinacemi ve sladké a sladké demineralizované syrovátce. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u varianty kyselý kaseinový hydrolyzáte 2 % a maltodextrin 10 %. Vyšší výtěžnost nisinu byla stanovena u sladké demineralizované syrovátky.

Klíčová slova: syrovátka, demineralizovaná syrovátka, nisin

Abstract

Nisin is a polypeptide important for its antibacterial activity. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 was selected as nisin-producing strain. It was tested by the addition of various sources of carbon and nitrogen for the production of nisin. It was selected addition of peptone, soya peptone and acid hydrolysate of casein at 2 %, and lactose and maltodextrin at 5 % and 10 %. Production of nisin was monitored by agar diffusion method. *Micrococcus luteus* ATCC 10240 strain was used as an indicator of growth inhibition. Parallel experiments were performed with all combinations in sweet whey and sweet demineralized whey at the same time. The best results were obtained with the acid hydrolysate of casein 2 % and 10 % maltodextrin. Higher yield of nisin was determined for sweet demineralized whey.

Keywords: whey, demineralized whey, nisin

Úvod

Syrovátka vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, tvarohu a kaseinu. Je snaha co nejvíce syrovátku využívat, a tím zajistit lepší ekonomickou bilanci výroby. K prodloužení trvanlivosti syrovátky se používá sušení, které sníží náklady na přepravu. Možnosti výroby i využití do krmiv a do potravin negativně ovlivňuje poměrně vysoký obsah solí v syrovátce, proto se používá demineralizace použitím gelové filtrace, ionexů, elektrodialýzy nebo nanofiltrace. Míra odstranění solí závisí na další aplikaci produktu (pro zkrmování stačí 60% odsolení, pro lidskou výživu se používá vyšší stupeň odsolení). Demineralizovaná syrovátka se buď zahušťuje, příp. suší, nebo se z ní separují významné složky (Suková, 2006). Syrovátka se přidává do mnoha potravinářských výrobků (nápojů, sýrů, mléčných výrobků a mražených krémů, do chleba a pečiva, do cereálních snacků, do masných výrobků, vyrábějí se z ní analogy masa, fortifikují se s ní potraviny a doplňky stravy a vyrábějí se z ní fólie na bázi syrovátky). V poslední době se zvyšuje i využití syrovátky jako růstového média mikroorganismů za účelem produkce průmyslově využitelných látek. Drbohlav a kol. (2009) sledoval schopnost tvorby kyseliny mléčné u vybraných kmenů laktobacilů ve sladké syrovátce za účelem dalšího studia zpracování syrovátky na biologicky odbouratelné polymery pro obalové materiály. Kavková a kol. (2017) sledovala antifugální vliv přípravku s obsahem propionátu na bázi fermentované syrovátky na trvanlivost toustových chlebů.

Syrovátku lze využít i pro aplikace spojené s výrobou antimikrobiálních látek, které je možné použít k inhibici některých nežádoucích mikroorganismů. Příkladem významné látky s antimikrobiálními účinky je polypeptid nisin. Je zcela bezpečný (FDA, 2001) a je povolen jako konzervační látka v některých potravinářských výrobcích tak, jak upravuje Nařízení komise č. 1129/2011.

Nisin má velmi dobré účinky proti řadě patogenních bakterií. Nisin je produkován některými kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, které mají přítomen operon pro produkci nisinu. Produkci nisinu však významně ovlivňují i podmínky kultivace. Jedná se především o optimální teplotu, pH, délku kultivace, složení růstového média, fázi růstu, koncentraci testované a indikátorové kultury apod. (Guerra a kol., 2001; Papagianni a kol., 2007). Tyto jsou dlouhodobě diskutovány, testovány a upravovány. Nisinprodukční kmeny *Lactococcus lactis* subs. *lactis* sledovala Stoyanova a kol. (2006). Všechny sledované kmeny inhibovaly kmeny *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Micrococcus flavus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*. Některé nisinprodukční kmeny inhibovaly i některé gramnegativní bakterie: *Alcaliginens faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas fluorescens*. Vlivem nutričních faktorů na produkci nisinu kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 v syrovátkovém médiu se zabýval Guerra a kol. (2001). Zkoumáním vztahu mezi koncentrací glukózy a produkcí nisinu se zabýval Papagianni a kol. (2007). Další možnosti využití nisinu shrnuje Arauz a kol. (2009).

Cílem práce bylo porovnat vliv přídavku vybraných nutrientů na produkci nisinu v médiu ze sladké syrovátky a ze sladké demineralizované syrovátky. Pro optimalizaci separace nisinu ze syrovátkového média byla vybrána a testována i sladká demineralizovaná syrovátka s vysokým stupněm demineralizace. Byla vybrána syrovátka obsahující pouze 10 % minerálních látek běžně obsažených v syrovátce, protože vysoký obsah minerálních látek bývá příčinou horší zpracovatelnosti tohoto substrátu pro další aplikace např. hydrogelové

Maltodextrin - Glucidex19 D (Roquette)

Pepton (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)

Sojový pepton (HiMedia Laboratories)

Kyselý kaseinový hydrolyzát (HiMedia Laboratories)

Tween 80 (Carl Roth GmbH + Co KG)

Nisin from *Lactococcus lactis* (Sigma-Aldrich)

Příprava substrátů

Substráty byly připraveny ze sladké syrovátky a ze sladké demineralizované syrovátky. K fortifikaci byly použity nutrienty: pepton, sojový pepton a kyselý kaseinový hydrolyzát o koncentraci 2 % a laktóza a maltodextrin o koncentraci 5 % a 10 %. Sušená sladká a sušená sladká demineralizovaná syrovátka byla obnovena na koncentraci 7,5 %. Vzorčky obou druhů syrovátek byly doplněny o 0,1 % Tweenu 80.

Tab. 2 Varianty pokusu

Přidávky nutrientů do syrovátkových základů	Označení
Pepton 2 % + laktóza 5 %	PL5
Pepton 2 % + laktóza 10 %	PL10
Pepton 2 % + maltodextrin 5 %	PM5
Pepton 2 % + maltodextrin 10 %	PM10
Sojový pepton 2 % + laktóza 5 %	SPL5
Sojový pepton 2 % + laktóza 10 %	SPL10
Sojový pepton 2 % + maltodextrin 5 %	SPM5
Sojový pepton 2 % + maltodextrin 10 %	SPM10
Kyselý kaseinový hydrolyzát 2 % + laktóza 5 %	KL5
Kyselý kaseinový hydrolyzát 2 % + laktóza 10 %	KL10
Kyselý kaseinový hydrolyzát 2 % + maltodextrin 5 %	KM5
Kyselý kaseinový hydrolyzát 2 % + maltodextrin 10 %	KM10

Kultivační podmínky

Připravené substráty byly zaočkovány kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 (očkovací dávka 1 %, kultivace při 30 °C/18 hod).

Testování z hlediska produkce nisinu

Po ukončení fermentace byl stanoven obsah nisinu optimalizovanou difúzní metodou (Chumchalová a kol., 1995; Kunová a kol., 2014; Binder a kol., 2015). Metoda využívá inhibičního vlivu nisinu na indikátorový kmen *Micrococcus luteus* ATCC 10240. Indikátorový kmen byl odebrán sterilní kličkou do fyziologického roztoku. Rozmíchaná suspenze byla promíchána s rozehrátým BHI agarem a nalita na Petriho misky. Na pokus byly použity misky o průměru 17,5 cm viz obr. 1. Po zatuhnutí byly v agaru vytvořeny otvory sterilním korkovrtem. Do hotových otvorů byly pipetovány připravené substráty - roztoky syrovátky se suplementy inkubované s *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, standardy a kontrolní vzorek. Jako kontrola byla použita sterilní sladká demineralizovaná syrovátka s Tweenem 80 bez přídavku cukrů a bílkovin a sterilní sladká syrovátka s Tweenem 80. Misky byly kultivovány 16 - 18 hodin při 30 °C. Druhý den byly odečteny průměry inhibičních zón, které byly přepočteny podle kalibrační křivky na IU nisinu/ml.

Materiál a metody

Použitý materiál

Tab. 1 Seznam použitých kmenů

Sbírkové číslo	Druh	Poznámka
CCDM 731	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	vybraný kmen s produkcí nisinu
ATCC 10240	<i>Micrococcus luteus</i>	referenční grampozitivní kmen

Syrovátka sladká sušená (Moravia Lacto a.s.) obnovena na sušinu 7,5 %.

Sušená syrovátka sladká demineralizovaná D 90 %

(Moravia Lacto a.s.) obnovena na sušinu 7,5 %.

Laktóza (Urseta, s.r.o.)



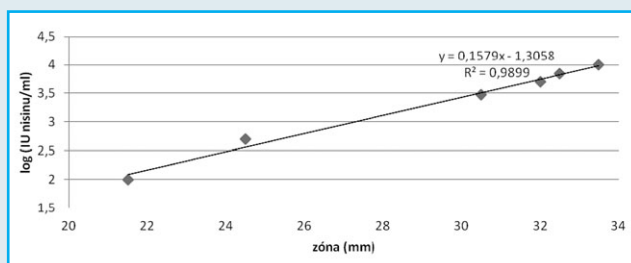
Obr. 1 Inhibiční zóny - demineralizovaná syrovátka - 2. opakování (Vzorek č. 1 - standard $7 \cdot 10^3$, č. 2 - standard $1 \cdot 10^2$, č. 3 - standard $5 \cdot 10^3$, č. 4 - standard $5 \cdot 10^2$, č. 5 - standard $3 \cdot 10^3$, č. 6 - standard $1 \cdot 10^3$, č. 7 - PL5, č. 8 - PL10, č. 9 - PM5, č. 10 - PM10, č. 11 - SPL5, č. 12 - SPL10, č. 13 - SPM5, č. 14 - SPM10, č. 15 - KL5, č. 16 - KL10, č. 17 - KM5, č. 18 - KM10, č. 19 - kontrola)

Výsledky a diskuse

Při výběru nisin-produkčního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 byly použity 4 kmeny, které měly přítomný nisinový operon. 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. Jako negativní kontrola použit kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S32, který nemá přítomný nisinový operon, u kterého inhibiční zóny pozorovány nebyly (Kunová a kol., 2014). Z indikátorových kmenů byl vybrán kmen *Micrococcus luteus* ATCC 10240, u kterého byla potvrzena vyšší citlivost vůči nisinu (Kunová a kol., 2014).

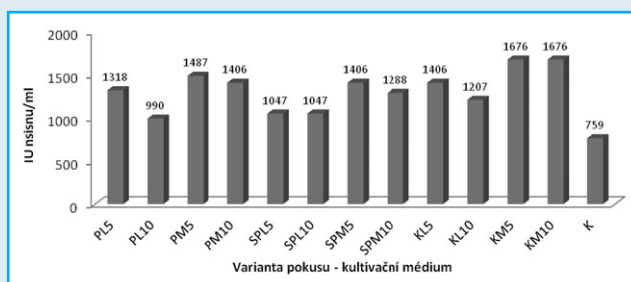
Z dříve odzkoušené řady suplementů sacharidů, dusíkatých látek i jejich kombinací byla nejvyšší produkce nisinu ze sacharidů u laktózy a maltodextrinu a z bílkovinných látek u peptonu, sojového peptonu a kyselého kaseinového hydrolyzátu. Byl testován vliv nejlepších kombinací přísad ve sladké syrovátce a provedeno srovnání všech vybraných kombinací ve sladké demineralizované syrovátce. Na základě dřívějších pozitivních výsledků (Binder a kol., 2015) byly vzorky obou druhů syrovátek doplněny o 0,1 % Tweenu 80. Pro sledování tvorby nisinu byla použita agarová difuzní metoda (Chumchalová a kol., 1995; Kunová a kol., 2014; Binder a kol., 2015).

Pro stanovení množství nisinu byly vytvořeny kalibrační křivky nisinu. Pomocí nisinového preparátu Nisin from *Lactococcus lactis* (Sigma-Aldrich, s.r.o., ČR) o deklarované síle preparátu 1 000 000 IU/g byla připravena koncentrační řada. Připraveny byly roztoky o síle $1 \cdot 10^2$, $5 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $3 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $7 \cdot 10^3$, $8 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$ IU nisinu/ml rozpuštěním preparátu ve sterilní vodě. Z grafu kalibrační křivky viz obr. 2 byla odvozena rovnice k přepočtu velikostí naměřených inhibičních zón na IU nisinu/ml.



Obr. 2 Graf kalibrační křivky - demineralizovaná syrovátka - první opakování

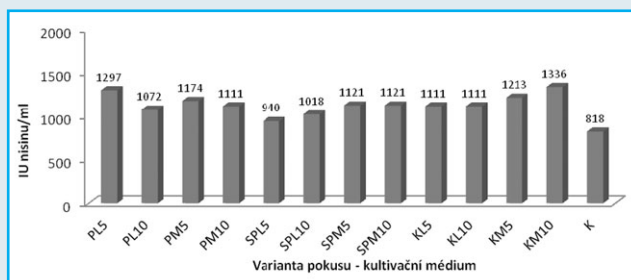
Zhodnocení výsledků testování růstových médií na bázi sladké demineralizované syrovátky s přidavkem sacharidů a dusíkatých látek



Obr. 3 Vliv růstových médií na bázi sladké demineralizované syrovátky s přidavky sacharidů a dusíkatých látek na produkci nisinu

Při stanovení vlivu fortifikace ve sladké demineralizované syrovátce obohacené kombinací sacharidů a dusíkatých látek viz obr. 3 byl nejvyšší obsah nisinu (1676 IU/ml) u variant kyselý kaseinový hydrolyzáte 2 % a maltodextrin 5 % a kyselý kaseinový hydrolyzáte 2 % a maltodextrin 10 %. Nejnižší obsah nisinu (990 IU/ml) byl naměřen u vzorků obsahující pepton 2 % a laktózu 10 %. U všech variant přísad sacharidů a dusíkatých látek ve sladké demineralizované syrovátce byl stanoven vyšší obsah nisinu než u kontroly (759 IU/ml) obsahující pouze demineralizovanou syrovátku a Tween 80.

Zhodnocení výsledků testování růstových médií na bázi sladké syrovátky s přidavkem sacharidů a dusíkatých látek

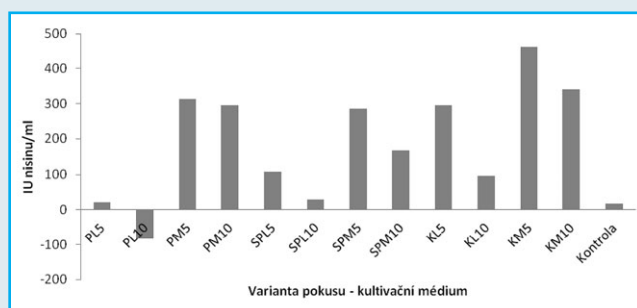


Obr. 4 Vliv růstových médií na bázi sladké syrovátky s přidavky sacharidů a dusíkatých látek na produkci nisinu

Při stanovení vlivu fortifikace kombinací sacharidů a dusíkatých látek byl ve sladké syrovátce viz obr. 4 nejvyšší obsah nisinu 1336 IU/ml u varianty kyselý kaseinový

hydrolyzát 2 % a maltodextrin 10 % Nejnižší obsah nisinu u suplementovaných vzorků (940 IU/ml) byl naměřen u vzorku obsahující sojový pepton 2 % a laktóza 5 %. Také u všech variant přísad sacharidů a dusíkatých látek ve sladké syrovátce byl stanoven vyšší obsah nisinu než u kontroly (818 IU/ml) obsahující pouze sladkou syrovátku a Tween 80.

Porovnání výsledků testování růstových médií ve sladké demineralizované syrovátce s přísadkou sacharidů a dusíkatých látek a ve sladké syrovátce s přísadkou sacharidů a dusíkatých látek



Obr. 5 Porovnání rozdílů mezi sladkou demineralizovanou syrovátkou a sladkou syrovátkou s přísadkou sacharidů a dusíkatých látek na produkci nisinu

Při porovnání sladké demineralizované syrovátky a sladké syrovátky viz obr. 5 bylo dosaženo lepších výsledků ve sladké demineralizované syrovátce v průměru o 194 IU nisinu/ml. U vzorku obsahující pepton 2 % a laktózu 10 % byly stanoveny vyšší hodnoty ve sladké syrovátce. U všech ostatních vzorků bylo dosaženo lepších výsledků ve sladké demineralizované syrovátce.

Závěr

V této práci byly rozšířeny dříve získané výsledky o zjištění vlivu přísad vybraných nutrientů na produkci nisinu v médiu na bázi sladké demineralizované syrovátky.

Při sledování vlivu přísad sacharidů a dusíkatých látek byly ověřeny dříve získané výsledky a u obou variant růstového média byl stanoven nejvyšší obsah nisinu u varianty kyselý kaseinový hydrolyzát 2 % a maltodextrin 10 %. Vyšší obsah nisinu v průměru o 194 IU nisinu/ml byl stanoven ve sladké demineralizované syrovátce.

Získané poznatky jsou využívány 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:

ARAUZ L. J., JOZALA A. F., MAZZOLA P. G., VESSONI PENNA (2009): Nisin biotechnological production and application: a review, *Food Science and Technology*, s.146-154.

- BINDER M., NEHYBA A., ŠALAKOVÁ A., SEDLAŘÍK V. (2015): Vliv kulturačních podmínek na tvorbu nisinu při fermentaci syrovátky kmeny laktokoků, *Mlékařské listy*, 153, s. XIV-XIX.
- DRBOHLAV J., ŠALAKOVÁ A., SEDLAŘÍK V., NEHYBA A., CICVÁREK J. (2009): Využití kyseliny mléčné ze syrovátky pro přípravu polylaktátu a tvorbu biodegradovatelných plastů, *Mlékařské listy* 115, s. 13-18.
- 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>.
- GUERRA N. P., RUA M. L., PASTRANA L. (2001): Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey, *International Journal of Food Microbiology* 70, s. 267-281.
- CHUMCHALOVÁ J., JOSEPHEN 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.
- KAFKOVÁ M., DRÁB V., DRBOHLAV J., HAVELKOVÁ D. (2017): Antifungální efekt a poloprovozní aplikace aktivního přípravku na bázi fermentované syrovátky v toustových chlebech, *Mlékařské listy* 163, s. 9-1.
- KUNOVÁ G., SEDLAŘÍK V., KLIMEŠOVÁ M., RAŠKOVÁ Z., HYŘŠLOVÁ I., ŠALAKOVÁ A., DRÁB V. (2016): Využití syrovátky jako růstového média pro nisin produkční kmeny laktokoků, *Mlékařské listy* 146, s. I-IV.
- PAPAGIANI M., AVRADAMIS N., FILIOUSIS G. (2007): Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007), s. 1557-1563.
- SENAN S., ABD EL-AAI H., DAVE R., HASSAN A. (2016): Production and stability of nisin in whey protein concentrate, *Food Science and Technology*, s. 125-129.
- SUKOVÁ I. (2006): Syrovátka v potravinářství, *Potravinářské informace* 2006 č. 1, s. 20.
- STOYANOVA L. G., SULŤIMOVA T. D., BOTINA S. G., NETRUSOV A. I. (2006): Isolation and Identification of New Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Milk, *Applied biochemistry and Microbiology*, s. 492-499.

Korespondující autor: Ing. Marie Marková

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Ke Dvoru 12 A, 160 00 Praha 6-Vokovice

Markova.M@seznam.cz, markova@milcom-as.cz

Přijato do tisku: 11. 9. 2017

Lektorováno: 3. 10. 2017

VYUŽITÍ METODY LAMP PRO RYCHLOU DETEKCI PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁŘSKÉ A KLINICKÉ PRAKTI

Eva Šviráková, Jakub Kyznar, Kateřina Loupancová

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

The use of LAMP method for fast detection of pathogenic microorganisms in food and clinical practices

Abstrakt

Tato teoretická práce se zabývá problematikou charakterizace, vysvětlení základního principu a praktického využití nově vyvinuté molekulárně-biologické metody,