# BIOKONZERVAČNÝ POTENCIÁL KMEŇOV *Lactococcus lactis* IZOLOVANÝCH Z OVČÍCH HRUDKOVÝCH SYROV

**ZUZANA HLADÍKOVÁ, JANA SMETANKOVÁ, GABRIEL GREIF a MÁRIA GREIFOVÁ**

*Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava*
*zuzanahladikova@email.cz*

Došlo 21.1.13, prijaté 11.4.13.

Kľúčové slová: antimikrobiálna aktivita, diacetyl, kyselina mliečna, *Lactococcus lactis*, oxid uhličitý, peroxid vodíka

## Úvod

Kyslomliečnym baktériám ako potenciálnym konzervantom potravín sa venuje vzrastajúca pozornosť. Sú široko používané ako štartovacie kultúry v priemyselnej výrobe fermentovaných mliečnych, mäsových, rastlinných a cereálnych výrobkov. Veľký význam majú tiež ako neštartovacia – doplnková kultúra. Zvlášť v mliekarenskom priemysle narastá záujem o kmene s probiotickými vlastnosťami schopné prežiť dostatočne dlhý čas v gastrointestinálnom trakte[1].

Kyslomliečne baktérie sú známe vďaka ich antagonistickej aktivite na patogénne baktérie a baktérie spôsobujúce kazenie potravín[2].

Antimikrobiálna aktivita je spôsobená hlavne redukciou pH prostredia pomocou vyprodukovaných kyselín (kyselina mliečna, kyselina octová, kyselina jantárová, kyselina propiónová, kyselina fenylmliečna a i.) a tiež tvorbou ďalších antimikrobiálnych látok ($H_2O_2$, diacetyl, $CO_2$ a i.) vrátane bakteriocínov bielkovinovej povahy[3].

Druh *Lactococcus lactis* patrí medzi kyslomliečne nepatogénne grampozitívne baktérie úzko súvisiace s rodom *Streptococcus* a bežne používané ako štartovacie kultúry pri výrobe syrov[4].

Základnou úlohou kultúr mliečnych štartérov zložených z kyslomliečnych baktérií je riadiť fermentačný proces. Súčasne prispievajú k senzorickým vlastnostiam výrobkov a k ich bezpečnosti. Používanie priemyselných štartovacích kultúr znížilo rozmanitosť fermentovaných mliečnych výrobkov. Tento jav možno vysvetliť tým, že komerčná dostupnosť nových zaujímavých štartovacích kultúr je obmedzená. V súčasnej dobe je preto snaha o hľadanie potenciálnych štartovacích mikroorganizmov zo skupiny „divokých" kmeňov získavaných zo surového mlieka, nedefinovaných kultúr alebo z tradičných výrobkov pre diverzifikáciu produktov[5,6].

Táto práca sa zameriava na antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu kmeňov *Lactococcus lactis* izolovaných z ovčích hrudkových syrov vyrobených z tepelne neošetreného mlieka pochádzajúcich z rôznych oblastí Slovenska a tvorbu vybraných antimikrobiálnych metabolitov (kyselina mliečna, $H_2O_2$, diacetyl, $CO_2$).

## Experimentálna časť

Práca sa sústredí na 20 „divokých" kmeňov *Lactococcus lactis* izolovaných z ovčích hrudkových syrov vyrobených zo surového mlieka pochádzajúcich z rôznych oblastí Slovenska a identifikovaných metódou MALDI-TOF. Kmene sú uvedené v tab. I.

### Nočná kultúra

Izolované kmene *Lactococcus lactis* boli pravidelne preočkovávané do M17 bujónu (MERCK, Darmstadt, Germany) a kultivované v termostate pri optimálnej teplote rastu 30 °C. Pre jednotlivé experimenty bola použitá vždy čerstvá nočná kultúra (16–18 h) v M17 médiu.

### Indikátorové mikroorganizmy

*Alternaria alternata* CCM 128, *Aspergillus flavus* CCM 171, *Bacillus cereus* DFST, *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Cladosporium herbarum* CCM 159, *Escherichia coli* CCM 3988, *Listeria monocytogenes* NCTC 4886, *Mucor rouxii* CCM 220, *Penicillium chrysogenum* CCM 432, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Rhizopus oryzae* CCM 8284, *Staphylococcus aureus* CCM 3953

### Antimikrobiálna aktivita

Antibakteriálna a antifungálna aktivita bola sledovaná paralelne dvojvrstvovou difúznou metódou podľa Magnussona[7]. 100 µl čerstvej nočnej kultúry laktokokov s koncentráciou $10^9$ KTJ $ml^{-1}$ sa nanieslo pomocou mikropipety na sterilný disk (∅ 1,2 cm), umiestnený v strede Petriho misky, s tuhým M17 agarom. Nasledovala kultivácia pri 30 °C 24–48 h za aeróbnych podmienok. Po vyrastení laktokokov sa Petriho misky preliali mäkkým BHI agarom (MERCK, Darmstadt, Germany) so vstupnou koncentráciou indikátorového kmeňa baktérií $10^7$ KTJ $ml^{-1}$, resp. Sabouraudovým mäkkým agarom (IMUNA, Šarišské Michaľany, SR) (0,8 % agaru) v prípade mikroskopických vláknitých húb so vstupnou koncentráciou $10^4$ spór $ml^{-1}$. Po 24h aeróbnej kultivácii pri 30 °C (baktérie), resp. 48h kultivácii pri 25 °C (mikroskopické vláknité huby) sa vypočítala plocha inhibície v tvare kruhu (vyjasnená plocha) z celkovej plochy Petriho misky, kde $r$ [mm] je polomer kruhu a $\pi$ je Ludolfovo číslo.

$$S = \pi r^2 \qquad (1)$$

Tabuľka I
Divoké kmene *Lactococcus lactis* izolované z ovčích hrudkových syrov vyrobených zo surového mlieka pochádzajúcich z rôznych oblastí Slovenska

| Izolát | Lokalita |
|---|---|
| 1014 | Hanigovce |
| 1016 | Hanigovce |
| 3S1 | Zámostie |
| 3S3 | Zámostie |
| 3S7 | Zámostie |
| 5S9 | Podolínec |
| 5S10 | Podolínec |
| 6S3 | Lipany |
| 7S3 | Bertotovce |
| 7S5 | Bertotovce |
| 7S7 | Bertotovce |
| 7S9 | Bertotovce |
| 8S3 | Vlkanová |
| 9S3 | Hrochoť |
| 9S8 | Hrochoť |
| 10S2 | Liptovské Revúce |
| 10S4 | Liptovské Revúce |
| 10S5 | Liptovské Revúce |
| 12S3 | Cígľa |
| 12S5 | Cígľa |

### Stanovenie tvorby $H_2O_2$

Nočná kultúra laktokokov sa sterilne naočkovala do 9 ml M17 bujónu so vstupnou koncentráciou $10^8$ KTJ ml$^{-1}$. Po 24h kultivácii pri 30 °C sa vzorka odstredila (20 min, 4000 ot. min$^{-1}$) (Centrifuge MPW – 360, Poľsko). Po odstredení sa bunky 2× premyli sterilným fyziologickým roztokom. Premyté bunky sa následne rozpustili v 9 ml studeného fosfátového pufru (pH 6,5) a inkubovali 24 h pri 5 °C. Po inkubácii sa vzorky pretrepali a odstredili. Na vyhodnotenie sa odobralo 2,5 ml supernatantu, ku ktorému sa pridalo 0,5 ml chrenovej peroxidázy (Boehringer, Mannheim, Nemecko) a 0,05 ml *o*-dianizidínu (SERVA, Heidelberg, Nemecko). Nasledovala inkubácia vo vodnom kúpeli pri 37 °C 10 min. Reakcia sa zastavila prídavkom 0,1 ml 4 N HCl. Po zastavení reakcie sa merala absorbancia pri vlnovej dĺžke 400 nm. Koncentrácia $H_2O_2$ sa vypočítala z kalibračnej krivky[8].

### Stanovenie tvorby $CO_2$

Nočná kultúra laktokokov sa naočkovala paralelne do M17 bujónu s Durhamovou skúmavkou tak, aby vstupná koncentrácia buniek bola $10^7$ KTJ ml$^{-1}$. Nasledovala 24 h inkubácia pri optimálnej teplote rastu. Tvorba $CO_2$ sa prejavila stĺpcom plynu v Durhamovej skúmavke[9].

### Stanovenie tvorby diacetylu

Nočná kultúra laktokokov sa sterilne naočkovala do 9 ml sterilného mlieka (1,5 % tuku) tak, aby vstupná koncentrácia bola $10^7$ KTJ ml$^{-1}$. Nasledovala kultivácia 24 h pri 30 °C. Po kultivácii sa do skúmavky sterilne odpipetoval 1 ml vzorky. K tomu sa pridalo 0,5 ml 16% KOH (MIKROCHEM, Pezinok, SR) a 0,5 ml 1% α-naftolu (MERCK, Darmstadt, Nemecko). Po pretrepaní sa skúmavky inkubovali 10 min pri 30 °C. Následne sa hodnotilo ružové zafarbenie, ktoré značí prítomnosť diacetylu[10].

### Tvorba organických kyselín

Tvorba organických kyselín v polotučnom mlieku (1,5 % tuku) sa stanovila metódou HPLC RID.

Nočná kultúra laktokokov sa naočkovala do 100 ml sterilného mlieka tak, aby vstupná koncentrácia bola $10^8$ KTJ ml$^{-1}$. Nasledovala kultivácia pri 30 °C za aeróbnych podmienok. Obsah kyselín sa stanovoval v čase 0., 24. a 48. h kultivácie. Súčasne sa sledovala aj zmena pH mlieka.

*Predanalytická úprava vzorky*

Sfermentované mlieko sa vyčírilo pomocou roztokov Carrez I ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3\ H_2O$) a Carrez II ($ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$) a následne prefiltrovalo. Získaný filtrát sa zmiešal v alikvotnom pomere s mobilnou fázou, prefiltroval cez mikrofilter (0,2 μm) a následne aplikoval na kolónu.

*Podmienky analýzy*

Vysokotlaková pumpa DeltaChrom™ SDS 030, dávkovač Rheodyne 7725i, dávkovacia slučka 20 μl, kolóna Polymer IEX $H^+$ (250 × 8 mm), DeltaChrom™ Temperature Control Unit (50 ± 0,1 °C), mobilná fáza 9 mM $H_2SO_4$, prietok mobilnej fázy 1 cm$^3$ min$^{-1}$, RI detektor (Knauer K – 2301), zberač dát a vyhodnocovací program Clarity.

*Meranie pH*

Na meranie pH hodnoty mlieka bol použitý laboratórny pH-meter (inoLab Levell WTW, Německo) so sklennou elektródou a teplotným senzorom (Blue Line).

## Výsledky a diskusia

Rozličné štúdie poukazujú na veľký význam mnohých kyslomliečnych baktérií v potravinárskom priemysle z hľadiska inhibície rastu nežiaducich baktérií[11–15].

V rámci sledovania antibakteriálnej aktivity, z výsledkov tejto práce vyplýva, že sedem izolovaných kmeňov *Lactococcus lactis* (3S7, 5S9, 5S10, 7S3, 9S3, 10S4, 12S3) inhibovalo rast všetkých patogénnych indikátorových baktérií (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escheri-*

Tabuľka II
Antibakteriálna aktivita laktokokov izolovaných z ovčích hrudkových syrov vyrobených zo surového mlieka na indikátorové baktérie

| Izolát *L. lactis* | Inhibícia [%] Indikátorový kmeň | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *B. cereus* | *B. subtilis* | *E. coli* | *L. monocytogenes* | *P. aeruginosa* | *S. aureus* |
| 1014 | 6,52 | 0 | 5,01 | 4,72 | 4,84 | 5,21 |
| 1016 | 5,46 | 5,33 | 5,33 | 5,71 | 5,21 | 0 |
| 3S1 | 6,38 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3S3 | 6,52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3S7 | 9,26 | 4,72 | 6,80 | 4,84 | 4,27 | 7,83 |
| 5S9 | 6,94 | 5,46 | 6,10 | 5,46 | 5,09 | 5,62 |
| 5S10 | 7,38 | 4,96 | 6,10 | 1,06 | 4,84 | 5,26 |
| 6S3 | 6,25 | 0 | 5,95 | 4,84 | 4,84 | 5,95 |
| 7S3 | 9,76 | 3,72 | 4,48 | 5,98 | 4,84 | 5,53 |
| 7S5 | 4,96 | 0 | 5,95 | 0 | 5,09 | 0 |
| 7S7 | 5,33 | 5,08 | 5,84 | 0 | 5,46 | 6,11 |
| 7S9 | 5,71 | 3,93 | 4,96 | 0 | 4,73 | 4,96 |
| 8S3 | 6,38 | 4,72 | 6,10 | 0 | 4,73 | 4,73 |
| 9S3 | 5,71 | 1,49 | 6,33 | 5,21 | 4,12 | 5,12 |
| 9S8 | 6,80 | 0 | 5,59 | 5,58 | 4,97 | 0 |
| 10S2 | 13,65 | 4,72 | 6,94 | 4,72 | 7,38 | 0 |
| 10S4 | 14,68 | 4,49 | 6,52 | 4,84 | 9,94 | 5,08 |
| 10S5 | 8,29 | 1,36 | 3,61 | 4,96 | 7,62 | 0 |
| 12S3 | 6,80 | 4,60 | 5,01 | 4,15 | 5,09 | 4,84 |
| 12S5 | 5,08 | 0 | 5,31 | 0 | 4,84 | 4,99 |

*chia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). Najvyššiu antibakteriálnu aktivitu prejavili kmene *Lactococcus lactis* 10S4 (14,68 %) a *Lactococcus lactis* 10S2 (13,65 %) na *Bacillus cereus.* Najmenej aktívne boli izoláty 3S1 a 3S3. Tieto kmene *Lactococcus lactis* inhibovali iba rast *Bacillus cereus* (6,38 %; 6,52 %). Ako vyplýva z našich výsledkov (tab. II), inhibičné plochy sa pohybovali v rozmedzí 1,06 % až 14,68 %.

Podobný výskum uviedli Charlier a spol. (2008), ktorí študovali antimikrobiálnu aktivitu 75 kmeňov *Lactococcus lactis*. Sledovali inhibičný účinok na rast *Staphylococcus aureus* v mlieku. Väčšina kmeňov laktokokov mala silný antagonistický účinok. Výsledky ich práce poukazujú aj na to, že aj kmene *Lactococcus lactis* s nízkou acidifikačnou schopnosťou, používané pri výrobe mäkkých syrov vyrobených zo surového mlieka, môžu účinne brániť rastu *Staphylococcus aureus* aj pri počiatočnej kontaminácii $10^3$ KTJ $ml^{-1}$ (cit.[16]).

Podľa našich výsledkov v rámci sledovania antifungálnej aktivity, najcitlivejšie na metabolity izolovaných „divokých“ kmeňov laktokokov boli *Mucor rouxii* (inhibičné plochy u 17 kmeňov *Lactococcus lactis* sa pohybovali v rozmedzí 4,73–26,99 %) a *Rhizopus oryzae* (inhibičné plochy u 15 kmeňov *Lactococcus lactis* sa pohybovali v rozmedzí 10,63–17,06 %). Iba kmeň *Lactococcus lactis* 5S10 inhiboval rast všetkých indikátorových mikroskopických vláknitých húb (*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor rouxii*, *Penicillium chrysogenum* a *Rhizopus oryzae*). Najodolnejšie boli *Alternaria alternata*, ktorej rast neinhibovalo 13 kmeňov *Lactococcus lactis*, a *Cladosporium herbarum* – 9 kmeňov *Lactococcus lactis* bolo bez inhibičnej zóny. Antifungálna aktivita laktokokov je zhodnotená v tab. III.

Kumar a spol. (2010) skúmali, či metabolity kyslomliečnych baktérií môžu byť používané ako prírodné konzervanty v mliekarenskom priemysle. Podľa ich štúdie, kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* var. *diacetylactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus casei* izolované z Dahi (indický jogurt), mlieka, jogurtu, ovocia a siláže, pri testovaní nepreukázali antifungálne vlastnosti. V prípade štandardných kultúr z Národnej zbierky mliekarenských kultúr (NDRI, Karnal, India), všetky štyri kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (94), *Lactococcus lactis* var.

Tabuľka III
Antifungálna aktivita laktokokov izolovaných z ovčích hrudkových syrov vyrobených zo surového mlieka na mikroskopické vláknité huby

| Izolát *L. lactis* | Inhibícia [%] Indikátorový kmeň | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *A. alternata* | *A. flavus* | *C. herbarum* | *M. rouxii* | *P. chrysogenum* | *R. oryzae* |
| 1014 | 0 | 7,00 | 4,73 | 7,58 | 7,29 | 11,85 |
| 1016 | 4,92 | 0 | 0 | 17,06 | 4,73 | 13,13 |
| 3S1 | 4,97 | 7,00 | 0 | 9,26 | 5,13 | 17,06 |
| 3S3 | 5,21 | 5,55 | 0 | 15,65 | 5,38 | 12,35 |
| 3S7 | 0 | 9,04 | 0 | 21,85 | 5,81 | 13,00 |
| 5S9 | 0 | 6,71 | 6,43 | 12,87 | 6,81 | 0 |
| 5S10 | 6,03 | 7,38 | 5,93 | 24,57 | 6,34 | 10,63 |
| 6S3 | 0 | 6,16 | 5,61 | 21,04 | 5,98 | 12,22 |
| 7S3 | 0 | 8,09 | 0 | 0 | 5,05 | 10,63 |
| 7S5 | 0 | 0 | 0 | 4,73 | 5,89 | 13,39 |
| 7S7 | 5,51 | 9,04 | 6,07 | 15,48 | 5,98 | 0 |
| 7S9 | 0 | 5,98 | 0 | 24,28 | 7,58 | 11,35 |
| 8S3 | 4,97 | 0 | 4,97 | 22,10 | 5,55 | 0 |
| 9S3 | 0 | 9,94 | 4,82 | 6,14 | 5,05 | 13,93 |
| 9S8 | 0 | 0 | 4,04 | 0 | 5,21 | 10,63 |
| 10S2 | 0 | 5,55 | 4,34 | 7,99 | 6,16 | 0 |
| 10S4 | 1,30 | 6,90 | 0 | 11,85 | 6,34 | 12,87 |
| 10S5 | 0 | 11,85 | 0 | 0 | 5,05 | 0 |
| 12S3 | 0 | 5,21 | 5,21 | 26,99 | 6,43 | 13,39 |
| 12S5 | 0 | 8,40 | 4,61 | 24,28 | 5,89 | 11,48 |

Tabuľka IV
Obsah kyseliny mliečnej vyprodukovanej laktokokmi v polotučnom mlieku (1,5 % tuku) počas 48 h kultivácie za aeróbnych podmienok pri 30 °C

| Izolát | Koncentrácia kyseliny mliečnej [g dm$^{-3}$] | | | Izolát | Koncentrácia kyseliny mliečnej [g dm$^{-3}$] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 h | 24 h | 48 h | | 0 h | 24 h | 48 h |
| 1014 | 0,38 | 6,54 | 7,30 | 7S7 | 0,4 | 4,57 | 7,87 |
| 1016 | 0,32 | 4,79 | 6,67 | 7S9 | 0,36 | 5,48 | 6,82 |
| 3S1 | 0,31 | 3,72 | 6,72 | 8S3 | 0,43 | 2,75 | 6,52 |
| 3S3 | 0,39 | 6,28 | 6,72 | 9S3 | 0,57 | 5,66 | 7,69 |
| 3S7 | 0,52 | 5,21 | 6,21 | 9S8 | 0,57 | 5,33 | 7,08 |
| 5S9 | 0,65 | 5,49 | 7,52 | 10S2 | 0,29 | 4,01 | 5,56 |
| 5S10 | 0,54 | 7,21 | 7,41 | 10S4 | 0,48 | 7,08 | 7,80 |
| 6S3 | 0,39 | 6,10 | 6,95 | 10S5 | 0,33 | 4,42 | 4,71 |
| 7S3 | 0,20 | 3,60 | 5,91 | 12S3 | 0,32 | 5,56 | 5,62 |
| 7S5 | 0,42 | 6,32 | 8,05 | 12S5 | 0,34 | 4,97 | 6,54 |

*diacetylactis* (60), *Lactobacillus acidophilus* (014) a *Lactobacillus acidophilus* (015) mali inhibičnú aktivitu aspoň na jednu alebo dve z mikroskopických vláknitých húb (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium citrinum*, *Mucor*, *Rhizopus*; Dairy Science College, Hebbal, Bangalore)[17].

Tabuľka V
Zmena pH hodnoty počas kultivácie laktokokov v polotučnom mlieku (1,5 % tuku) počas 48 h pri 30 °C

| Izolát | pH | | | Izolát | pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 h | 24 h | 48 h | | 0 h | 24 h | 48 h |
| 1014 | 6,16 | 4,22 | 4,19 | 7S7 | 6,16 | 4,21 | 4,15 |
| 1016 | 6,18 | 4,22 | 4,17 | 7S9 | 6,18 | 4,24 | 4,19 |
| 3S1 | 6,14 | 4,29 | 4,26 | 8S3 | 6,06 | 4,18 | 4,19 |
| 3S3 | 6,15 | 4,26 | 4,23 | 9S3 | 6,10 | 4,25 | 4,24 |
| 3S7 | 6,08 | 4,49 | 4,29 | 9S8 | 6,03 | 4,17 | 4,14 |
| 5S9 | 6,09 | 4,23 | 4,19 | 10S2 | 6,18 | 4,19 | 4,14 |
| 5S10 | 6,09 | 4,28 | 4,26 | 10S4 | 6,13 | 4,22 | 4,16 |
| 6S3 | 6,18 | 4,20 | 4,19 | 10S5 | 6,19 | 4,27 | 4,26 |
| 7S3 | 6,19 | 4,59 | 4,41 | 12S3 | 6,19 | 4,25 | 4,22 |
| 7S5 | 6,16 | 4,25 | 4,19 | 12S5 | 6,12 | 4,26 | 4,18 |

Tabuľka VI
Tvorba $H_2O_2$, $CO_2$ a diacetylu kmeňmi *Lactococcus lactis*

| Izolát | $H_2O_2$ [μg cm$^{-3}$] | $CO_2$ [a] | Diacetyl [b] |
|---|---|---|---|
| 1014 | 0,50 | + | − |
| 1016 | 0,46 | − | − |
| 3S1 | 1,01 | − | − |
| 3S3 | 0,65 | + | ++ |
| 3S7 | 0,58 | + | +/− |
| 5S9 | 0 | + | − |
| 5S10 | 1,07 | − | − |
| 6S3 | 0,63 | − | − |
| 7S3 | 0,43 | + | + |
| 7S5 | 0,23 | − | − |
| 7S7 | 0 | − | − |
| 7S9 | 0,35 | − | − |
| 8S3 | 0,55 | − | +/− |
| 9S3 | 0,84 | − | − |
| 9S8 | 1,54 | + | − |
| 10S2 | 0,25 | − | + |
| 10S4 | 2,41 | − | − |
| 10S5 | 4,05 | − | +++ |
| 12S3 | 1,79 | + | − |
| 12S5 | 3,46 | − | − |

[a] $CO_2$: + bol produkovaný, − nebol produkovaný, [b] Diacetyl: +++ intenzívne ružové vyfarbenie, ++ viditeľné vyfarbenie, +− nejasné vyfarbenie, − bez vyfarbenia

Kyselina mliečna je cenný produkt kyslomliečnych baktérií s praktickým využitím v potravinárskom priemysle ako konzervačná látka, pH regulátor a zvýrazňovač chuti[18].

Nedisociovaná forma slabých organických kyselín difunduje cez bunkovú membránu a je v závislosti na intracelulárnom pH viac alebo menej disociovaná vo vnútri bunky, uvoľňuje $H^+$ ióny, ktoré okysľujú cytoplazmu. Ne-

disociovaná forma molekuly spôsobuje antimikrobiálny efekt kolapsom elektrochemického protónového gradientu, čím vzniká bakteriostatický vplyv alebo smrť citlivej baktérie. Tento efekt je výraznejší pri pH < pKa kyseliny, t.j. keď je kyselina v nedisociovanom stave[19].

Pri sledovaní produkcie kyseliny mliečnej v mlieku izolovanými kmeňmi *Lactococcus lactis* pri 30 °C za 48 h kultivácie (tab. IV), najviac kyseliny mliečnej vytvoril izolát *Lactococcus lacti*s 7S5 (8,05 g $dm^{-3}$). U ostatných izolátov sa koncentrácie kyseliny mliečnej pohybovali v rozmedzí 4,71–7,87 g $dm^{-3}$. Najväčší pokles pH bol pozorovaný u kmeňov *Lactococcus lactis* 9S8 a 10S2 (pH 4,14) (tab. V).

Nancib a spol. (2009) sledovali produkciu kyseliny mliečnej kmeňom *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* v ďatľovom džúse pri rôznych teplotách. Po 12 h fermentácie pri 30 °C bola konečná koncentrácia kyseliny mliečnej 7,5 g $dm^{-3}$. Pri zvyšovaní teploty (32 °C, 34 °C, 36 °C) sa jej výsledná koncentrácia znižovala[20].

Peroxid vodíka, ktorý sa vyznačuje silným oxidačným účinkom na bakteriálnu bunku a deštrukciou základných molekulových štruktúr bunkových bielkovín, produkovali pri 30 °C všetky izolované kmene *Lactococcus lactis* okrem izolátov 7S7 a 5S9. Najvyššia koncentrácia bola zistená u kmeňa *Lactococcus lactis* 10S5 (4,05 μg $cm^{-3}$), ostatné kmene *Lactococcus lactis* tvorili $H_2O_2$ v rozmedzí 0,23 až 3,46 μg $cm^{-3}$ (tab. VI).

Kosová a spol. (2012) pri kvantitatívnom stanovení tvorby peroxidu vodíka u 7 kmeňov z rodu *Lactobacillus* pochádzajúcich z národných i medzinárodných zbierok zistili, že všetky kmene produkovali peroxid vodíka, a to v intervale 0,10–1,98 μg $cm^{-3}$. Najvyššie koncentrácie boli pozorované u kmeňov *Lactobacillus casei* DMF 30147 (1,98 μg $cm^{-3}$) *a Lactobacillus paracasei* SF1 (1,81 μg $cm^{-3}$) (cit.[21]).

Enitan a spol. (2011) sledovali produkciu $H_2O_2$ u 63 kmeňov kyslomliečnych baktérií patriacich do rodov *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus*, izolovaných zo surového a fermentovaného mlieka, pri rôznych teplotách, pH hodnotách, zdrojoch uhlíka a $N_2$. Zároveň skúmali inhibičnú aktivitu vybraných kmeňov na *Candida albicans*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus.* $H_2O_2$ bol produkovaný všetkými kmeňmi. Medzi kmene s najvyššou produkciou peroxidu vodíka patrili *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* a *Streptococcus thermophilus*.

Podľa ich výskumu, *Lactococcus lactis* za 24 h vytvoril pri 30 °C 0,28 μg $cm^{-3}$ $H_2O_2$, pri teplote 37 °C vytvoril 0,35 μg $cm^{-3}$, no pri ďalšom zvýšení inkubačnej teploty na 40 °C sa jeho koncentrácia znížila na hodnotu 0,27 μg $cm^{-3}$ (cit.[22]).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* je široko používaný v potravinárskom priemysle vďaka schopnosti metabolizovať citrát na aromatické komponenty a oxid uhličitý. Tieto látky zlepšujú organoleptické vlastnosti fermentovaných potravín a podieľajú sa na antimikrobiálnom účinku[23].

Diacetyl je primárne syntetizovaný leukonostokmi a niektorými laktokokmi.

Koncentrácie diacetylu sa v produktoch mliekarenskej výroby pohybujú v rozmedzí 0,5–20 mg $kg^{-1}$ (cit.[24]).

Pri vizuálnom kvalitatívnom hodnotení tvorby diacetylu 20 kmeňmi laktokokov, najviac diacetylu tvoril izolát *Lactococcus lactis* 10S5, v menšej miere *Lactococcus lactis* 3S3 a *Lactococcus lactis* 7S3. 14 izolátov *Lactococcus lactis* diacetyl neprodukovalo (tab. VI).

Lanciotti a spol. (2003) testovali antimikrobiálnu aktivitu diacetylu na *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus.* Z ich výsledkov vyplýva, že najcitlivejšia na diacetyl bola *Escherichia coli*, zatiaľ čo *Listeria monocytogenes* bola najodolnejšia. Zistili, že prídavok diacetylu v množstve 300 ppm predlžuje lag fázu 4,23× pre *Escherichia coli*, 2,48× pre *Staphylococcus aureus* a 1,52× pre *Listeria monocytogenes* v porovaní s rastom v bujóne bez prídavku diacetylu[24].

Oxid uhličitý produkovaný heterofermentatívnymi kyslomliečnymi baktériami vytvára anaeróbne prostredie, ktoré inhibuje enzymatickú dekarboxyláciu. Akumulácia $CO_2$ v dvojvrstvových lipidových membránach môže spôsobiť dysfunkciu permeability. $CO_2$ účinne inhibuje rast mikroorganizmov spôsobujúcich kazenie potravín, predovšetkým gramnegatívnych psychrotrofných baktérií. Stupeň inhibície závisí od druhu mikroorganizmu a koncentrácie $CO_2$. Koncentrácia $CO_2$ 20–50 % (v/v) má silný antifungálny efekt[25].

Pri kvalitatívnom sledovaní tvorby oxidu uhličitého sme zistili, že z dvadsiatich testovaných divokých kmeňov laktokokov len 7 kmeňov produkovalo $CO_2$ (1014, 3S3, 3S7, 5S9, 7S3, 9S8, 12S3) (tab. VI).

## Záver

Kmene *Lactococcus lactis* izolované z ovčích hrudkových syrov preukázali antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu a tvorbu metabolitov známych svojím biokonzervačným účinkom. 7 izolátov inhibovalo všetky indikátorové baktérie, pričom najvyššiu aktivitu prejavili kmene *Lactococcus lactis* 10S2 a 10S4 na *Bacillus cereus*. Najvýraznejšia antifungálna aktivita bola sledovaná na *Mucor rouxii* a *Rhizopus oryzae*. Všetky izoláty tvorili v mlieku pri 30 °C kyselinu mliečnu v rozmedzí 4,71–8,05 g $dm^{-3}$. U laktokokov bola potvrdená tiež produkcia peroxidu vodíka, diacetylu a oxidu uhličitého v závislosti od izolovaného kmeňa. Testované „divoké“ kmene *Lactococcus lactis* s antimikrobiálnymi vlasnosťami majú potenciál na využitie v mliekarenskej praxi ako doplnkové štartovacie kultúry.

Zoznam použitých skratiek

| | |
|---|---|
| CCM | Česká sbírka mikroorganismů (Brno) |
| DFST | Ústav biotechnológie a potravinárstva (FCHPT, STU, Bratislava, SR) |

NCTC UK National Collection of type Cultures
M17 agar/bujón podľa Terzaghiho
BHI Brain Heart Infusion Agar/Broth (Mozgovo-srdcový bujón agar/bujón na kultiváciu citlivých baktérií)

*Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0879/12.*

LITERATÚRA

1. Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S.: Food Technol. Biotechnol. *48*, 296 (2010).
2. Jamuna M., Jeevaratnam K.: Appl. Microbiol. Biotechnol. *65*, 433 (2004).
3. Olaoye O. A., Onilude A. A.: Int. Food Res. J. *18*, 1155 (2011).
4. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S. D., Sorokin A.: Genome Res. *11*, 731 (2001).
5. Wouters J. T. M., Ayad E. H. E., Hugenholtz J., Smit S.: Int. Dairy J. *12*, 91 (2002).
6. Kozáková E., Plocková M., Šviráková E.: Seminár *Mléko a sýry 2004, Praha, január 2004,* Sborník přednášek (Štětina J., Čurda L., ed.), str.149. Česká společnost chemická, Praha 2004.
7. Magnusson J., Ström K., Ross S., Sjörgen J., Schnűrer J.: FEMS Microbiol. Lett. *219*, 129 (2003).
8. Villegas E., Gilliland S. E.: J. Food Sci. *63*, 1070 (1998).
9. Kask S., Adamberg K., Orłowski A., Vogensen F. K., Møller P. L., Ardö Y., Paalme T.: Food Res. Int. *36*, 1037 (2003).
10. Franz C. M. A. P., Schillinger U., Holzapfel W. H.: Int. J. Food Microbiol. *29*, 255 (1996).
11. Cizeikiene D., Juodeikiene G., Paskevicius A., Bartkiene E.: Food Control *31*, 539 (2013).
12. Valerio F., Favilla M., De Bellis P., Sisto A., de Candia S., Lavermicocca P.: Syst. Appl. Microbiol. *32*, 438 (2009).
13. Sakaridis I., Soultos N., Dovas C. I., Papavergou E., Ambrosiadis I., Koidis P.: Anaerobe *18*, 62 (2012).
14. Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W.: Food Control *26*, 117 (2012).
15. Concha-Meyer A., Schöbitz R., Brito C., Fuentes R.: Food Control *22*, 485 (2011).
16. Charlier C., Even S., Gautier M., Le Loir Y.: Int. Dairy J. *18*, 197 (2008).
17. Kumar N., Narayanan R., Kavitha N., Dhanalakshmi B.: As. J. Food Ag.-Ind. *3*, 229 (2010).
18. Petrov K., Urshev Z., Petrova P.: Food Microbiol. *25*, 550 (2008).
19. Greifová M., Krajčová E., Greif G.: Mliekarstvo *38*, 35 (2007).
20. Nancib A., Nabil Nancib N., Boudrant J.: World J. Microbiol. Biotechnol. *25*, 1423 (2009).
21. Kosová M., Šviráková E., Jebavá I., Plocková M.: Konferencia *Mléko a sýry, Praha, 24. január 2012*. Výsledky přehlídek a sborník přednášek konference „Mléko a sýry“ (Štětina J., Čurda L., ed.), str.128. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2012.
22. Enitan A., Adeyemo J., Ogunbanwo S. T.: Afr. J. Microbiol. Res. *5*, 2059 (2011).
23. García-Quintáns N., Repizo G., Martín M., Magni Ch., López P.: Appl. Environ. Microbiol. *74*, 1988 (2008).
24. Lanciotti R., Patrignani F., Bagnolini F., Guerzoni M. E., Gardini F.: Food. Microbiol. *20*, 537 (2003).
25. Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I.: Food Control *17*, 454 (2006).

**Z. Hladíková, J. Smetanková, G. Greif, and M. Greifová** *(Department of Food Science and Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava):* **Biopreservation Potential of Wild *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Lumpy Sheep Cheeses**

Antibacterial and antifungal activity of 20 wild lactococcal strains isolated from sheep cheeses against a microorganism indicator were examined. Lactococci were also tested for their ability to produce antimicrobial substances (lactic acid, hydrogen peroxide, biacetyl, carbon dioxide) in milk or broth.

The highest antibacterial activity was shown by *Lactococcus lactis* 10S4 and *L. lactis* 10S2 against *Bacillus cereus* (inhibition 14.68 and 13.65 %, respectively).

*L. lactis* 5S10 inhibited the growth of all the fungi indicators. The most sensitive fungi were *Mucor rouxii* and *Rhizopus oryzae. Lactococci* produced varying quantities of lactic acid. *L. lactis* 7S5 showed the highest final concentration of lactic acid (8.05 g/L) at 30 °C after 48-h incubation in milk. Hydrogen peroxide was produced by all of lactococcal strains except *L. lactis* 7S7 and 5S9. *L. lactis* 10S5 produced the highest amount of hydrogen peroxide (4.05 μg/mL). Six lactococci produced biacetyl and seven strains carbon dioxide.