

Bakteriociner

– bakteriernes eget forsvar

I takt med forbrugernes krav forsøges stadig flere fødevarer fremstillet uden tilsætning af kemiske konserveringsmidler. En høj produktsikkerhed i sådanne fødevarer kan i mange tilfælde opnås med brug af bakteriocinproducerende starterkulturer. Her beskrives nisin - det eneste bakteriocin der i oprenset form er godkendt til anvendelse i fødevarer

Af cand. brom. Birthe Jelle, Enzymes & Bioprotection, Chr. Hansen A/S, birthe.jelle@dk.chr-hansen.com

Mange traditionelle såvel som nye fødevarer produceres ved en fermentering. Fermentering er faktisk en af vore ældste konserveringsformer, og den anvendes stadig i sin mest primitive form (naturlig fermentering uden brug af starterkulturer) i mange udviklingslande. Foruden den konserverende effekt anvendes fermentering også af teknologiske årsager, hvor bakterierne har afgørende betydning for ændringen i produktets sensoriske profil (smag og tekstur). Tænk på mælk der bliver til yoghurt.

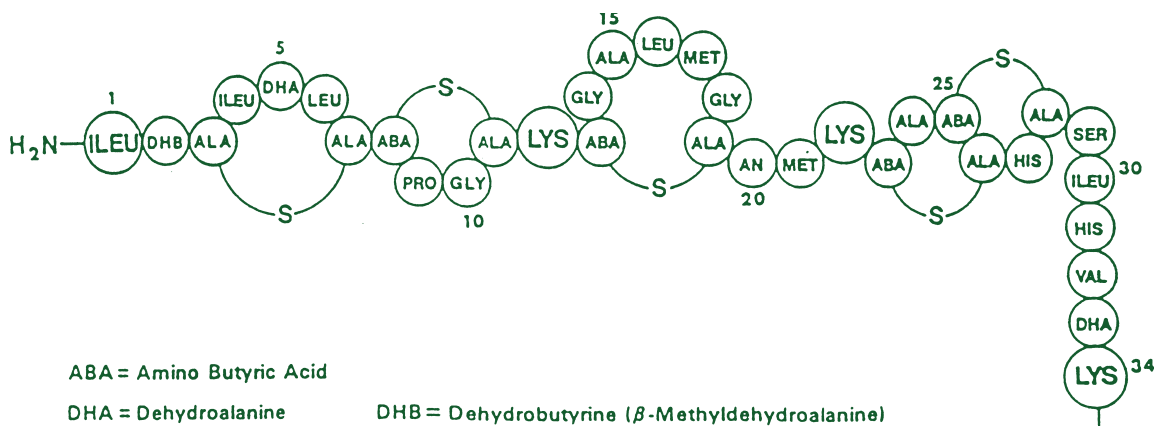
Moderne produktionsmetoder og udvikling af nye fødevarer stiller i dag store krav til kendskabet af de anvendte starterkulturer. Starterkulturer er afgørende for fra gang til gang at kunne opnå ensartede produkter af høj kvalitet. Her spiller mælkesyrebakterierne en vigtig rolle ved at omsætte kulhydrater til den konserverende mælkesyre. Ud over mælkesyre producerer mange mælkesyrebakterier også bakteriociner, der virker som en ekstra »hurdle« i den samlede konservering af fødevarer.

Nutidens forbrugere stiller store krav til de fødevarer, de køber. Trenden i forbrugernes ønsker går mod mere »naturlige« (økologiske) fødevarer af høj kvalitet, som er sikret mod forekomst af sygdomsfremkaldende bakterier. I takt med forbrugernes krav forsøges stadig flere fødevarer fremstillet uden tilsætning af kemiske konserveringsmidler. En høj produktsikkerhed i sådanne fødevarer kunne i mange tilfælde opnås med anvendelse af bakteriocinproducerende starterkulturer.

Bakteriociner

Bakteriociner er antibakterielle forbindelser, som produceres af mange forskellige bakterier. Forbindelserne produceres under bakteriernes metabolisme og udskilles i miljøet. For at bakteriocinet kan virke, skal der være direkte kontakt mellem bakteriocinet og de følsomme bakterier. Bakteriociner er proteinlignende stoffer, der virker på bakteriens cytoplasmamembran. Det bevirker, at membranen bliver permeabel for aminosyrer og ioner, og at bakteriens pH-gradient ødelægges. Bakterien mister herved vigtige næringsstoffer, hvilket oftest resulterer i cellens død. Bakteriociner har generelt størst effektivitet mod bakterier, der er nært beslægtede til den bakteriocinproducerende bakterie.

Bakteriocinet nisin produceres af visse stammer af *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, der er en almindeligt anvendt starterkultur i ostefremstilling. Nisin hæmmer de fleste andre mælkesyrebakterier samt nogle sygdomsfremkaldende bakterier, såsom *Listeria monocytogenes* og *Staphylococcus aureus*. Derudover har nisin vist sig at være særdeles effektiv til at eliminere stort set alle sporedannende bakterier inden for *Clostridium* sp. og *Bacillus* sp. [1]. Det er netop effekten på de varmeresistente sporer, såsom *Clostridium tyrobutyricum*, der udnyttes ved anvendelsen af nisin i forarbejdede oste. *C. tyrobutyricum* kan nemlig overleve den varmebehandling (85-105°C i 6-10 min), der indgår ved produktion af smelteost, og efterfølgende



Figur 1. Struktur af nisin [4].

forårsage fordærv på grund af produktion af smørsyre samt gasarterne H₂ og CO₂ (pustning) [2].

Nisin er ikke velegnet at tilsætte direkte til ostemælken, (f.eks. til produktion af Danbo), da det forhindrer starterkulturen i at virke. Til halvfaste oste som Danbo anvendes nitrat til at forhindre udvikling af smørsyregæring fra *C. tyrobutyricum*.

Strukturen af nisin fremgår af figur 1. Kemisk set består nisinmolekylet af 34 aminosyrer med en molekylvægt på 3510 Dalton. Nisin indeholder fire usædvanlige aminosyrer, dehydroalanin (DHA), dehydrobutyrin (DHB), lanthionin og β-methylanthionin, hvoraf de to sidstnævnte er forbundet af en sulfidbro [3]. Nisin inaktiveres af visse proteolytiske enzymer, bl.a. α-chymotrypsin, som findes i mave-tarm systemet hos mennesker. Restkoncentrationer af nisin i fødevarer vil derfor sandsynligvis blive nedbrudt kort tid efter indtagelse.

Nisin er det mest undersøgte bakteriocin. Det er samtidig det eneste bakteriocin, der er kommercielt tilgængeligt i oprenset form. De kommercielle nisinpræparater fremstilles ud fra en fermentering af en nisinproducerende *L. lactis* ssp *lactis*. Nisin markedsføres af bl.a. Chr. Hansen A/S.

Bakteriocinproducerende starterkulturer

Starterkulturer, der har den særlige egenskab at producere bakteriocin, i levnedsmidlet, er et relativt nyt koncept på markedet. Kun få kulturer er blevet markedsført baseret på, at den antibakterielle effekt skyldes dannelse af bakteriocin i levnedsmidlet. Formålet med anvendelse af bakteriocinproducerende starterkulturer går mere på forøgelse af produktsikkerheden frem for en forlængelse af holdbarheden.

Chr. Hansen A/S markedsfører to bakteriocinproducerende kulturer, Bactoform F-LC til kødindustrien og BioSafe BS10

til mejeriindustrien. Bactoform F-LC, der har været på markedet i flere år, er en blandingskultur bestående af *Pediococcus acidilactici* P-2, *Lactobacillus curvatus* MI401 og *Staphylococcus xylosus*, hvoraf de to førstnævnte producerer henholdsvis pediocin PA-1 og bavaricin A. Både pediocin og bavaricin er kendt for deres hæmmende effekt på *Listeria* [5,6]. Kulturen sælges til fermentering af spegepølser, hvor den ud over den teknologiske effekt forhindrer vækst af *Listeria monocytogenes* i pølserne, hvilket er påvist i flere forsøg [7,8].

For nylig lanceredes BioSafe BS10, der består af en nisinproducerende *Lactococcus lactis* stamme. Kulturen kan anvendes sammen med en almindelig starterkultur til faste og halvfaste oste. Som tidligere nævnt kan nisin ikke tilsættes direkte i ostekæret pga. dets hæmmende effekt på starterkulturen. Ved at tilsætte den nisinproducerende kultur, dannes nisin først så sent i processen (efter 4-6 timer), at den stort set ikke har indflydelse på starterkulturen. Forsøg med BioSafe BS10 i nitratfri Danbo 20+ har vist, at den effektivt kontrollerer udvikling af clostridiesporer under lagring [9]. Ostene blev produceret ud fra mælk som naturligt indeholdt ca. 200 sporer/l. Der indgik også en »spore-fri« ost i forsøget, som blev produceret ud fra »spore-fri« mælk. Kontrolostene var pustet efter 5 ugers lagring, mens der efter 10 ugers lagring stadig ikke var tegn på pustning af ostene fremstillet med BioSafe BS10 (figur 2, side 24). De »spore-fri« oste indeholdt ca. 100 sporer/g efter 5 ugers lagring, som viste sig ved få synlige huller (figur 3, side 24). Efter 10 ugers lagring var sporeindholdet steget til 500 sporer/g og de »spore-fri« oste var pustet. Det betyder, at den nisinproducerende kultur kan erstatte brugen af nitrat, hvilket er ønskeligt i nogle ostetyper.

Er dit sterilfilter sterilt?



MicroCheck 2, integritetstester



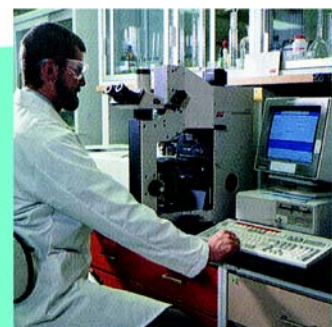
- EE-Rom hukommelse med lagring af 500 tests
- Lagring af testprotokoller
- Brugerafhængige adgangskoder
- Operatørkursus med certifikat
- Automatisk selvtest
- Kompakt, robust og resistent
- 6 test typer inkl. WIT

Test dine filtre

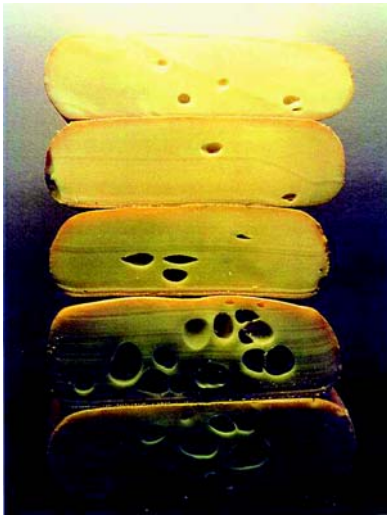
HVVL

Harald V. Lassen A/S
Filtreringsteknik

Hvedemarken 16 • 3520 Farum
Tlf: 44 34 01 00 • Fax: 44 34 01 15
E-mail: info@hvvl.dk • www.hvvl.dk

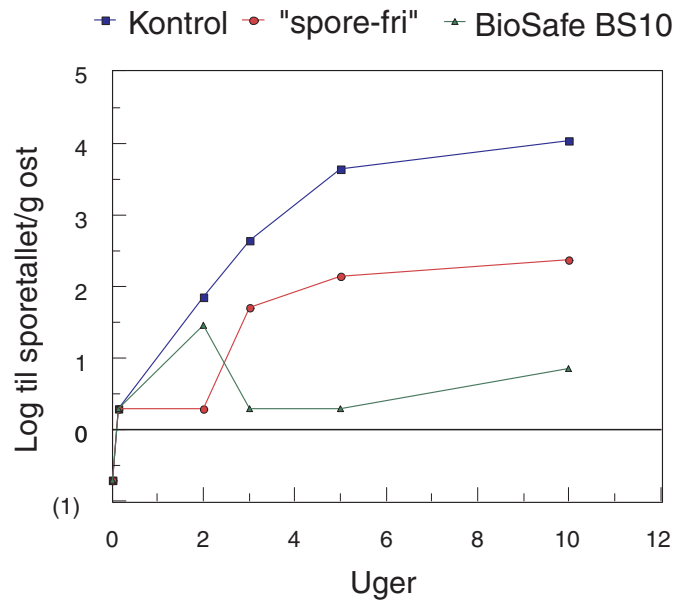


WESTRING GRAFSK



Figur 2. Foto af 5-uger gamle Danbo 20+ [9].
Nederst: Kontrolost.
Øverst: »Spore-fri« ost.
Næst øverst: Ost indeholdende BioSafe BS10.

Figur 3. Udviklingen af clostridiesporer i Danbo 20+ under 10 ugers lagring [9].



Sundhedsmæssige aspekter af bakteriociner

Bakteriociner produceret af mælkesyrebakterier har særlig stor interesse. Det skyldes, at mælkesyrebakterier, der har været anvendt i århundreder og er defineret som GRAS organismer (Generally Recognized As Safe), generelt ikke er under sundhedsmæssig mistanke.

Nisin er som det eneste bakteriocin undersøgt for toksicitet. De toksiske undersøgelser, som alle er udført på dyr, har ikke vist nogen sundhedsskadelig effekt [10,11,12,13]. LD₅₀-værdien for nisin er fundet til at være 7g/kg legemsvægt, hvilket svarer til den fastsatte værdi for salt [14]. Det vil sige, at nisin ikke er mere sundhedsskadeligt end salt og derfor må anses for at være et sikkert tilsætningsstof.

Lovgivning

Efter vurdering af en ekspertkomité fik nisin international accept i 1969 [15]. I dag er det tilladt i mere end 50 lande heriblandt EU. Lovgivningen varierer fra land til land. I EU betragtes nisin som et tilsætningsstof og er omfattet af levnedsmiddelloven. Selvom nisin anses for at være et sikkert tilsætningsstof, er det i dag kun tilladt i begrænset omfang til visse fødevarer. Nisin kan anvendes til: modnet ost, smelteost og semulje- og tapiocabudding (cerialiebaseret dessert) i en mængdeangivelse fra 3-12,5mg/kg [16]. Ved anvendelse af nisin skal fødevareren mærkes med nisin eller nummeret E-234.

Bakteriocinproducerende starterkulturer er omfattet af den generelle anmeldelsespligt, der gælder ved udnyttelse af en ny mikroorganisme. Anmeldelsen skal ske til Fødevedirektoratet.

Fremtidens fødevarer

I kommerciel henseende er anvendelsen af bakteriociner og/eller bakteriocinproducerende starterkulturer stadig at betragte som en ny teknologi, og de kan med fordel indgå som en ekstra »hurdle« for sikre en høj kvalitet af fremtidens fødevarer. Det er dog vigtigt at pointere, at bakteriociner eller for den sags skyld bakteriocinproducerende kulturer ikke kan erstatte GMP (Good Manufacturing Practice), ligesom de som udgangspunkt heller ikke kan forventes at erstatte andre konserveringsmetoder, såsom varmebehandling, saltning mv. I visse fødevarer er det dog tydeligt, at bakteriociner eller bakteriocinproducerende kulturer kan erstatte anvendelsen af kemiske konserveringsmidler, som f.eks. anvendelse af nitrat i ost.

Referencer

- Somers E.B. & S.L. Taylor. 1987. Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. J. Food prot. 50, 842-848.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R.J. Evans & J. Hugenholtz. 1996. Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 193-202.
- Ray, B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* as a food biopreservative. In: Ray, B. & Daeschel, M. (Eds) Food Biopreservatives of microbial origin, pp 207-264. CRC Press, Florida.
- Gross, E. & J.L. Morell. 1971. The presence of dehydroalanine in the antibiotic nisin and its relationship to activity. J. Am. Chem. Soc. 93, 4634-4635.
- Pucci, M.J., E.R. Vedamuthu, B.S. Kunka & P.A. Vandenberg. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2349- 2353.
- Larsen, A.G. 1993. Bakteriocin producerende mælkesyrebakterier – isolering, oprensning og karakterisering. Ph.d.-afhandling, Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet, Den Kgl. Veterinær –og Landbohøjskole, København.
- Christiansen, A.S. & L.B. Jørgensen. 1994. Effekt af bakteriocinproducerende starterkulturer på vækst af *Listeria monocytogenes* i fermenterede pølser. Hovedopgave, Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet, Den Kgl. Veterinær –og Landbohøjskole, København.
- Andersen, L. & B. Jelle. 1999. Starter culture with added value - Bactoform™ F-LC. ICoMST, Yokohama, Japan. Bulletin No. 10, Chr. Hansens A/S.
- Wessels, S., B. Jelle & I. Nes. 1998. Bacteriocin of lactic acid bacteria – an overlooked benefit for food. Science, application, legislation. Danish Toxicology Centre & Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Denmark.
- Hara, S., Y. Keido, M. Koji, T.Takako, K. Tatsumori, S. Masachiro, I. Ziro & S.Takeshi. 1962. Department of pharmacology Report, Tokyo Medical College, Japan.
- Frazer, A.C., M. Sharratt & J.R. Hickman. 1962. The biological effects of food additives – Nisin. J. Sci. Food Agric. 13, 32-42.
- Claypool, L., B. Heinemann, L. Voris & C.R. Stumbo. 1966. Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. J. Dairy Sci. 49, 314-316.
- Shtenberg, A.J. & A.D. Igmatëv. 1969. Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Food Cosmet. Toxicol.* 8, 369-380.
- Hara, S., K. Yakazu, K. Nakakawai, T. Takenchi, T. Kobayashi, M. Sata, Z. Imat & T. Shibuya. 1962. An investigation of toxicity of nisin. *Tokyo Med. Univ. J.*, 20, 175.
- JECFA. 1969. Specification for the identity and purity of food additives and their toxicological evolution: Some antibiotics. 12th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 430. FAO Nutrition Meetings Report Series No. 45.
- Positivlisten. 2000. Fortegnelse over tilsætningsstoffer til fødevarer. Fødevedirektoratet.