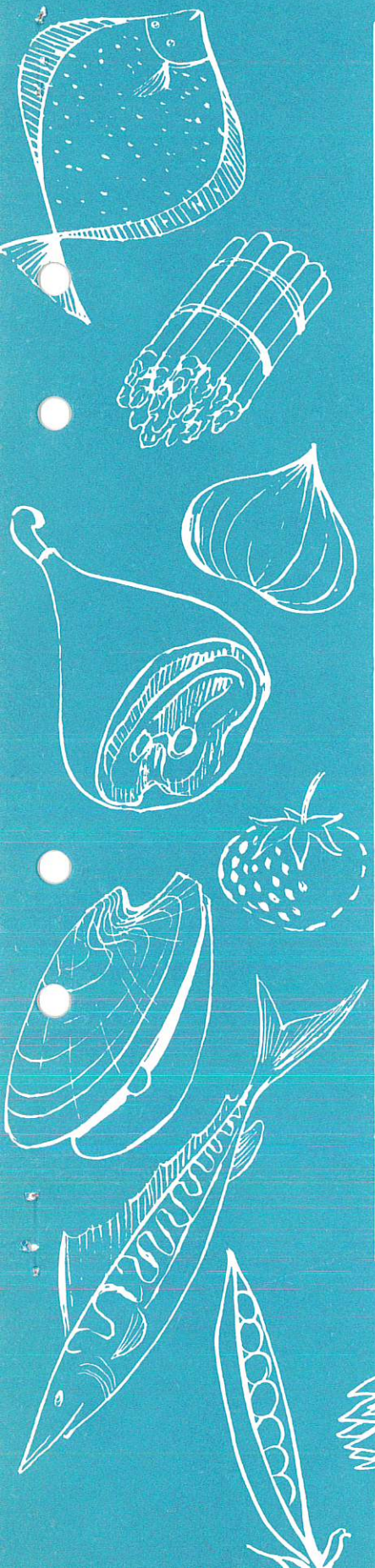
SIK

RAPPORT

Svenska Institutet för Konserveringsforskning Kallebäck, Göteborg 16



SIK-Rapport

1967 Nr 222

Effekten av några långkedjiga alkoholers lysinestrar, L-lysyl-N-cetyllysylamid och vissa Nα-acyldipeptider på bakteriesporers värmeresistens

av

Benkt Göran Snygg

Effekten av några långkedjiga alkoholers lysinestrar, L-lysyl-N-cetyl-lysylamid och vissa Nα-acyldipeptider på bakteriesporers värmeresistens

av

Benkt Göran Snygg
Svenska Institutet för Konserveringsforskning
Göteborg

Den antimikrobiella effekten av Nα-acyldipeptider har rapporterats av Molin (1964 a-e, 1965). I dessa undersökningar visades, att den antimikrobiella effekten varierar med fettsyredelens kedjelängd och peptiddelens sammansättning. Samma undersökningar har också gett vid handen, att det är hela molekylen, som är väsentlig för den antimikrobiella effekten.

Bakteriesporers egenskap, att i vissa fall stimuleras till groning av aminosyror (Sussman och Halvorson 1966) och aminosyreestrarnas och acyldipeptidernas kemiska konfiguration med en fettsyra- och en aminosyradel motiverade, att dessa senare föreningar undersöktes i avseende på deras eventuella värmeresistenssänkande effekt på vilande sporer. Den dualistiska verkan av en stimulerande aminosyradel och en inhibitorisk fettsyradel skulle kunna resultera i en ökad värmekänslighet hos behandlade sporer.

En del resultat av denna typ har redovisats i en tidigare publikation (Lundgren, Molin och Snygg 1965), vilken i huvudsak behandlade effekten av dipeptider på värmeresistensen hos sporer av Bacillus subtilis. Följande undersökning utgör en fortsättning, där effekten av ett antal närbesläktade föreningar undersökts.

Material och metoder

Testorganismer: Bacillus subtilis, Bacillus megaterium och Bacillus cereus.

Medier:

1. för vegetativ växt
   a) som odlingsmedium för ympmaterial och som groningsmedium för inhibitorförsök vid 30°C har ett medium av följande sammansättning använts:

5 g "Bacto" trypton, 2 g "Bacto" jäst extrakt, 0.1 g $MgSO_4$, 0.2 g K_2HPO_4, 100 ml 10% glukos och dest. vatten till en slutlig volym av 1000 ml.

b) som "recovery" medium har TGE-agar (Difco) använts.

2. för sporulering har 3 olika medier använts;

a) G- medium enl. Stewart och Halvorson (1953) modifierat genom en 10-faldig ökning av Ca^{2+}-halten har använts för B.cereus.

b) Donnellans helsyntetiska medium (Donnellan et al. 1964) har använts för B. subtilis och B. megaterium.

c) Ett komplext medium enl. Salton och Marshall (1959) har använts för framställning av sporer av B. subtilis med lägre värmeresistens.

Odlingsbetingelser: Vegetativ växt har skett på skak medan sporulering har skett under luftgenombubbling. Odlingstemperatur har genomgående varit 30°C.

Ympmaterial: Ca 5.10^9 celler från sen logfas har använts som inoculum per liter sporuleringsmedium.

Framställning av rena sporer: Preparationen har skett med hjälp av tvåfassystem med polyetylenglykol och buffert enl. Donnellan et. al. (1964) och Sacks och Alderton (1961).

Testsubstanser: Använda inhibitorer återfinns i tabell 1.

Undersökningsmetodik: Effekten på värmeresistensen har undersökts på följande sätt: Djupfryst spormaterial har efter tining spätts med 1/15 M fosfatbuffert pH 7, så att sportätheten $1 \cdot 10^6$ till $1 \cdot 10^7$ erhållits. Upphettning av sporer såväl i närvaro som frånvaro av inhibitor har skett i 4 ml-rör med skruvlock. Sporsuspensionens volym har varit 2 ml per rör. Upphettningen har skett i vattenbad till 80° resp. 90°C. I pH-serien har använts fosfatbuffert enl. Hess och Speiser (1959).

Koncentrationen av inhibitor har varit 50 nmol/ml. Bakterietalsbestämning har gjorts på TGE-agar enligt Miles och Misra (1938). Varje representerad kurva bygger på minst två försöksserier med undantag av kontrollkurvorna, som underbyggs av sju till tio olika försök.

Resultat

Betydelsen av sporernas resistens.

Det är känt, att sporuleringsmiljön spelar en stor roll för de bildade sporernas resistens. Bäst undersökt är kanske kombinationen mellan mediets katjonsammansättning och sporernas värmeresistens (Amaha och Ordal 1957). De subtilissporer, som bildats i Donnellans medium - i fortsättningen kallade "b-sporer" - har en betydligt högre värmeresistens, än de, som sporulerat i det komplexa mediet enligt Salton och Marshall 1959 - "c-sporer".

I den tidigare undersökningen (Lundgren et al. 1965) användes ett spormaterial av B. subtilis, som hade relativt låg värmeresistens. Av de tre föreningarna R-1, R-10 och R-18 visade sig R-18 vara effektivare, än R-1.

För att kunna korrelera undersökningsresultaten i de här redovisade försöksserierna med de tidigare erhållna gjordes vissa upprepningar med delvis samma R-substanser men med två olika sporpreparationer. Den ena bestod av "c-sporer", där ca 80% avdödades under 15 min. vid 80°C, medan den andra - "b-sporer" - inte visade någon som helst reduktion efter 60 min. vid 80°C.

Av fig. 1. framgår, att effektivitetsgraderingen av dipeptiderna R-1, R-10 och R-18 på "c-sporerna" stämmer väl med tidigare redovisade data, dvs. R-18 har den bästa resistenssänkande effekten. Vidare framgår att amiden R-56 har en effekt i samma storleksordning som den bästa dipeptiden medan alkohol-lysinestern R-54 tycks vara i klass med dipeptiderna R-1 och R-10.

Om "b-sporer" används istället ser avdödningskurvorna något annorlunda ut (fig. 2). R-18 och R-54 ligger här mycket nära varandra och har endast en relativt svag resistenssänkande verkan vid 80°C. R-56 har även på dessa sporer en avsevärd resistenssänkande effekt.

Resistens vid 90°C av 3 olika typer av sporer

Dessa försök utfördes vid en temperatur av 90°C, för att komma närmare det resistenta spormaterialets värmeinaktiveringstemperatur. Tyvärr är denna temperatur något för hög för B. megaterium, eftersom denna temperatur avdödar sporerna snabbt även i frånvaro av inhibitor. Fig. 3 visar att R-1 och R-18 är ungefär lika effektiva vid 90°C på sporer av B. cereus, och att R-56 är väsentligt bättre. Även på sporer av B. subtilis är R-56 överlägset bäst. En viss skillnad i effekt tycks föreligga mellan R-1 och R-18 (fig. 4).

Konfigurationens betydelse för den värmeresistenssänkande effekten av R-substanser.

Fig. 5 och 6 visar inverkan av kolkedjans längd på alkohol-lysinestrarnas resistenssänkande effekt. Det framgår av fig. 5, att vid den temperatur och den inhibitor-koncentration, som använts, blir effekten på de mera värmeresistenta sporerna relativt obetydlig och föga differentierad för de olika inhibitorerna. På sporer med lägre värmeresistens tycks R-50, R-51 och R-53 ha svag effekt, R-52 vara något bättre, R-55 ännu något mer effektiv och R-54 bäst. (fig. 6).

Inverkan av pH på effekten av R-56

Av fig. 7 framgår, att vid 80°C tycks R-56 ha ett verkningsoptimum vid pH 6, där det sker ca 99,99% avdödning efter 30 min.

Avdödning av vilande och groende sporer vid 30°C

En serie försök gjordes för att undersöka inverkan av R-56 på vilande och groende sporer av B. cereus, B. megaterium och B. subtilis vid 30°C. Koncentrationen av R-1 resp. R-56 var 0, 10, 50 och 100 nmol/ml. Sporerna suspenderades i trypton-jäst extrakt medium (1a) och bakterietalsbestämning gjordes efter 1 och 24 tim.

Av tabell 2 framgår, att B. cereus och B. subtilis gror obehindrat i mediet, medan B. megaterium inte gror.

I fråga om B. megaterium sporer sker en reduktion av bakterietalet i närvaro av inhibitor trots att sporerna inte gror i mediet. Det måste alltså vara fråga om en sporicid effekt. I detta fall kan det knappast vara fråga om en sporostatisk effekt i kombination med en upptagning eller adsorption och överföring till "recovery"-mediet, eftersom skillnaden är så stor mellan 1 och 24 tim. proven. (tabell 2).

Då det gäller B. subtilis har efter en timme ingen cellförökning skett i kontroll-provet, men redan efter 60 min. har den lägsta koncentrationen av R-1 och R-56 visat sig minska antalet överlevande. Denna effekt kan antingen tolkas som sporicid, eller att sporerna börjat gro och därmed blivit känsliga för inhibitor, eftersom kontrollen visar, att celldelning kan ske i mediet. Efter 24 tim. har såväl R-1 som R-56 reducerat antalet överlevande nära nog fullständigt även vid lägsta använda koncentration.

B. cereus gror normalt i mediet men inte i närvaro av inhibitor och det sker inte heller någon avdödning. De båda inhibitorerna tycks ha en rent groningshämmande verkan, och tycks inte heller vara adsorberade eller upptagna av sporerna, eftersom ingen "recovery"-effekt kan noteras. Med "recovery"-effekt menas i detta sammanhang en överföring av inhibitor till TGE-agarplattorna vid bakterietalsbestämningarna. Eftersom spädningsfaktorn normalt är stor på de plattor, som räknas, bör inhibitoreffekten hävts, såvida spormaterialet inte svarar för en specifik överföring.

Diskussion

Hitintills tillgängliga data ger ej klart besked om acyldipeptider och närbesläktade föreningar primärt verkar genom 1/ en verklig sänkning av värmeresistensen hos sporer 2/ genom att förhindra sporgroning eller 3/ genom att hämma vegetativ utväxt.

Försöken i tabell 2 synes indikera, att man i varje fall för B. cereus har en temperaturberoende upptagning eller irreversibel bindning av R-1 och R-56.

Oberoende av verkningssättet visar resultaten en tydlig sänkning av antalet levande sporer efter upphettning i närvaro av låga koncentrationer (50 nmol/ml) av de flesta av de undersökta testsubstanserna.

Liksom i tidigare undersökningar har även i denna sporuleringsmediet visats ha betydelse för sporernas värmeresistens. Det framgår också av fig. 1-6, att den resistenssänkande effekten av inhibitorerna beror på resistensen hos det använda spormaterialet. På det mycket värmeresistenta materialet är verkan av inhibitorerna betydligt mindre uttalad.

Av resultaten (fig. 6) kan utläsas, att kolkedjan hos alkohollysinestrar med en lysinrest ej får vara för kort (se R-50 och R-51 med 8 resp. 10 kolatomer i kedjan) men ej heller för lång (se R-53 med 20 kolatomer), för att en god resistenssänkande effekt skall uppnås. R-52 med 12 och R-55 med 13 kolatomer syns ha en mer optimal kedjelängd. R-54 med sina 16 kolatomer i kedjan kan inte jämföras med de övriga eftersom den innehåller tre lysinrester.

Skillnaden mellan de använda estrarna och dipeptiderna är förutom bindningssättet även antalet lysinrester. Orsaken till L-Lysin-eicocyl esterns (R-53) dåliga resistenssänkande effekt kan möjligen vara att söka i en försämrad löslighet beroende på att endast en lysinrest ingår i molekylen. Troligt är, att man för uppnående av maximal effekt bör ha ett bestämt optimalt förhållande mellan kolkedjans längd och antalet aminosyrarester. Detta innebär alltså, att antalet kolatomer i den alifatiska kedjedelen inte nödvändigtvis måste vara fixerat.

Molin (1964a) har tidigare visat att dipeptiderna är effektivast mot vegetativa celler vid pH 8. Den optimala värmeresistenssänkande effekten på sporer ligger omkring pH 7 (Lundgren, Molin, Snygg, 1965). För R-56 ligger pH-optimum vid pH 6. Att pH-optimum för R-56 ligger lägre än för dipeptiderna kan möjligen förklaras med att amiden på grund av en fri aminogrupp i α-ställning bör ha ökad löslighet vid lägre pH i jämförelse med dipeptiderna, som har en fri karboxylgrupp i stället för aminogruppen.

Sammanfattning

L-Lysyl-N-cetyllysylamid har av ett antal undersökta substanser visats vara den effektivaste föreningen för att sänka värmeresistensen hos sporer av Bacillus cereus, Bacillus megaterium och Bacillus subtilis.

Tidigare rapporterade effekter av N_α-acyldipeptider har bekräftats. Vidare har konstaterats, att av ett antal undersökta lysinestrar är den värmeresistenssänkande effekten i bästa fall lika stor som för den bästa N_α-acyldipeptiden men i allmänhet är den väsentligt lägre.

Optimal värmeresistenssänkande effekt av L-lysyl-N-cetyllysylamid erhölls vid sura pH.

Referenser

Amaha, M. & Ordal, Z.J. J. Bact. 74:596-604, 1957.

Donnellan, J.E., Nags, E.H. & Levinson, H.S. J. Bact. 87:332-336, 1964.

Hess, H. & Speiser, P. J. Pharm. Pharmacol. 11:650-658, 1959.

Lundgren, L., Molin, N. & Snygg, B.G. Physiol. Plant. 18:921-932, 1965.

Miles, A. & Misra, J. & Irwin, J.O. J. Hygiene 38:732-749, 1938.

Molin, N. Physiol. Plant. 17:443-455, 1964 a.
Ibid. 17:456-467, 1964 b.
Ibid. 17:468-481, 1964 c.
Ibid. 17:931-939, 1964 d.
Ibid. 17:940-950, 1964 e.
Abstr. Gothenburg Diss. Sci. 4. 1965.

Sacks, L.E. & Alderton, G. J. Bact. 82:331-341, 1961.

Salton, M.R.J. & Marshall, B. J. Gen. Microbiol. 21:415-420, 1959.

Stewart, B.T. & Halvorson, H.O. J. Bact. 65:157-159, 1953.

Sussman, A.S. & Halvorson, H.O. Spores: Their dormancy and germination, Harper and Row, Publ. Inc. New York 1966.

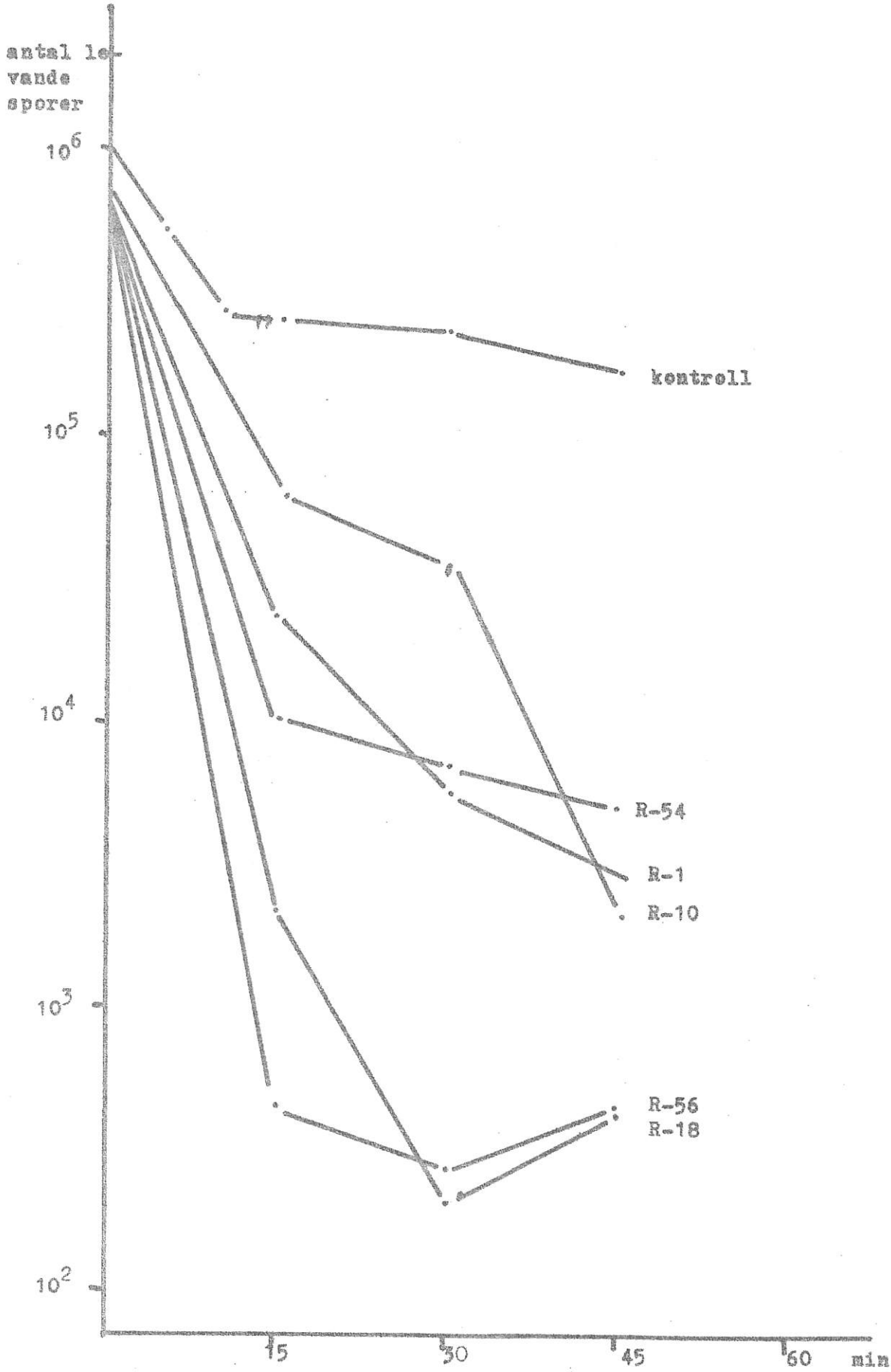


Fig. 1. Effekten av utvalda inhibitorer på "värmekänsliga" sporer av B. subtilis ("c-sporer") i fosfatbuffert vid 80°C.

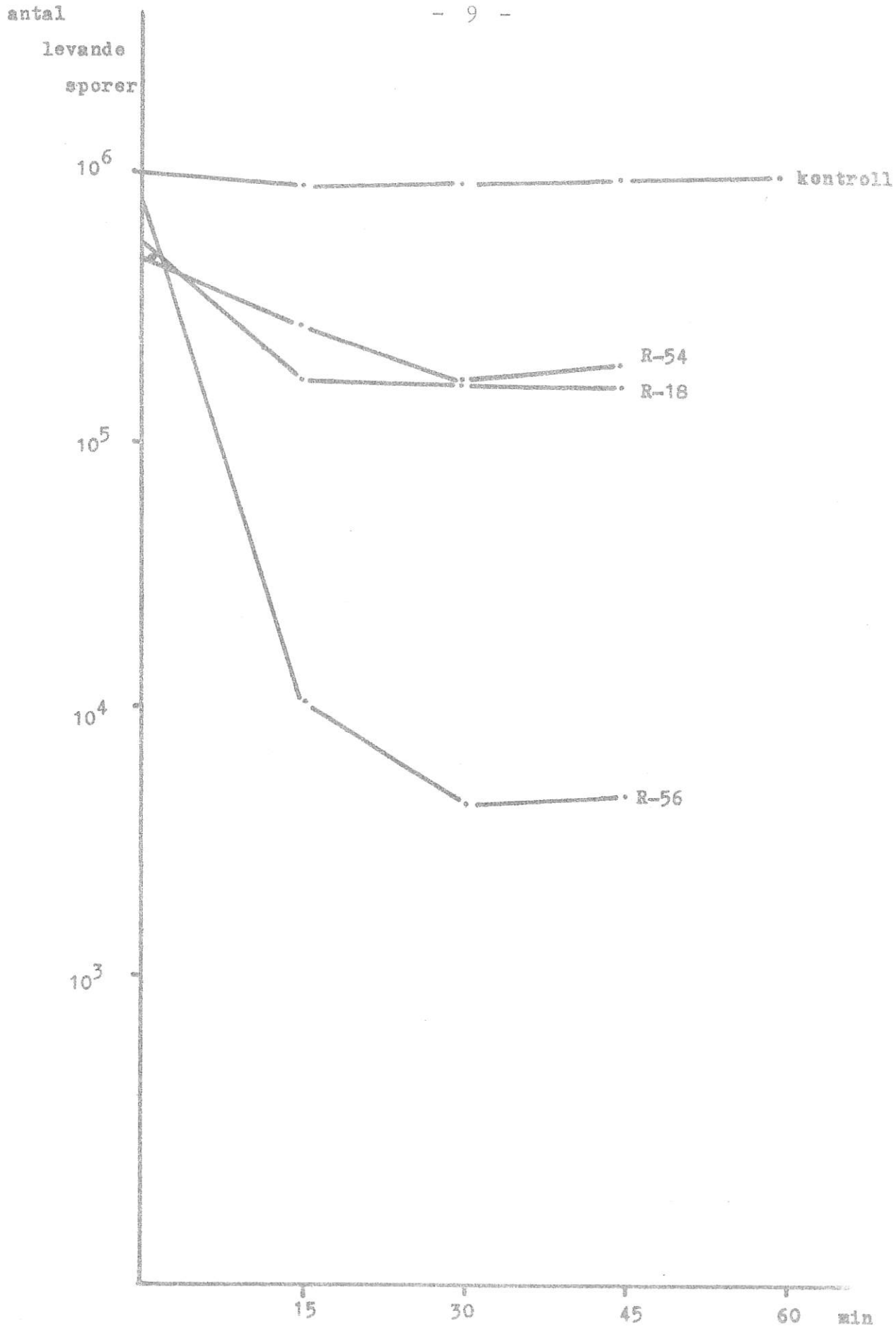


Fig. 2. Effekten av utvalda inhibitorer på "värmeresistenta" sporer av B. subtilis ("b-sporer") i fosfatbuffert vid 80°C.

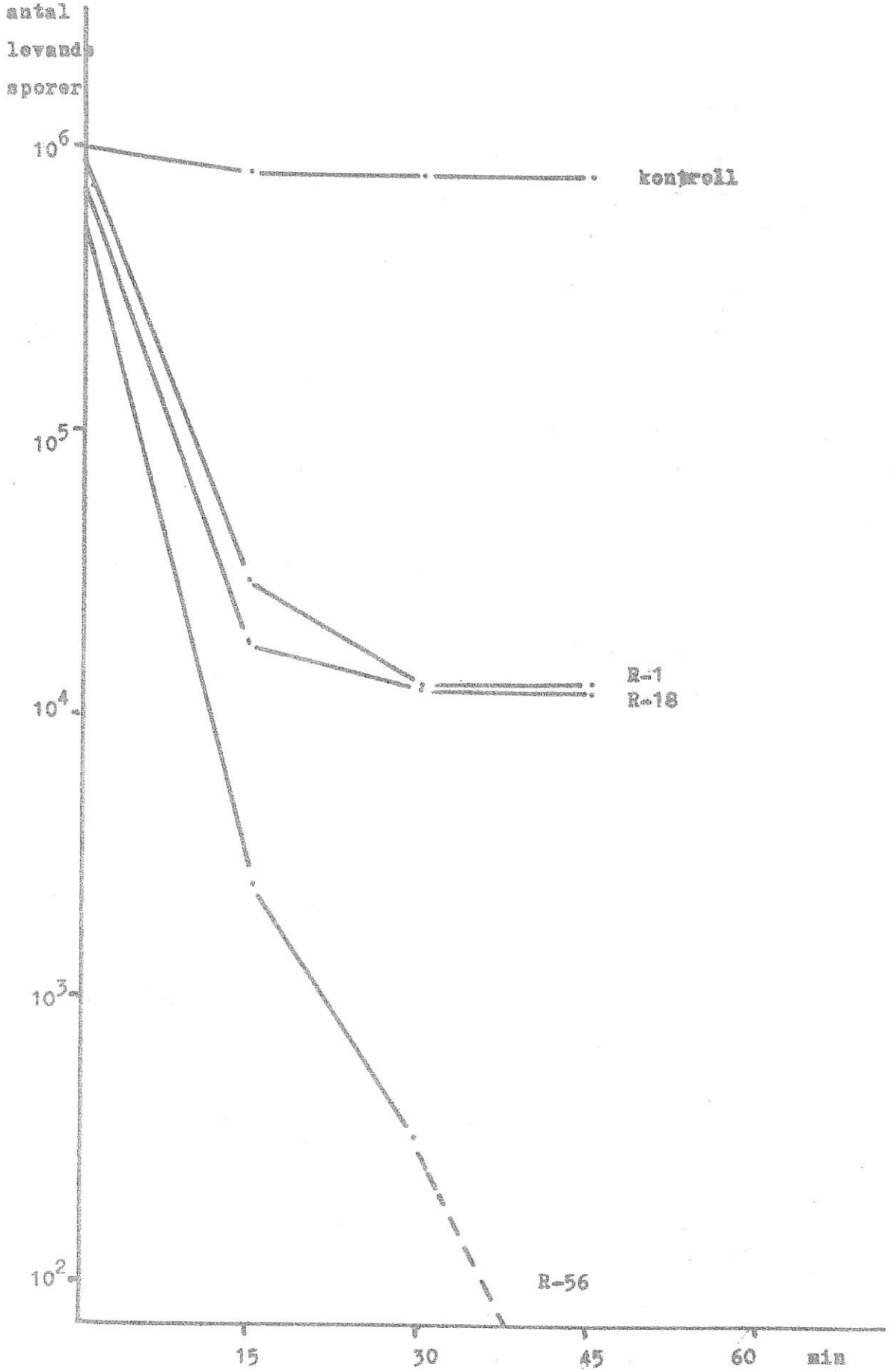


Fig. 3. Effekten av utvalda inhibitorer på sporer av B. cereus i fosfatbuffert vid 90°C.

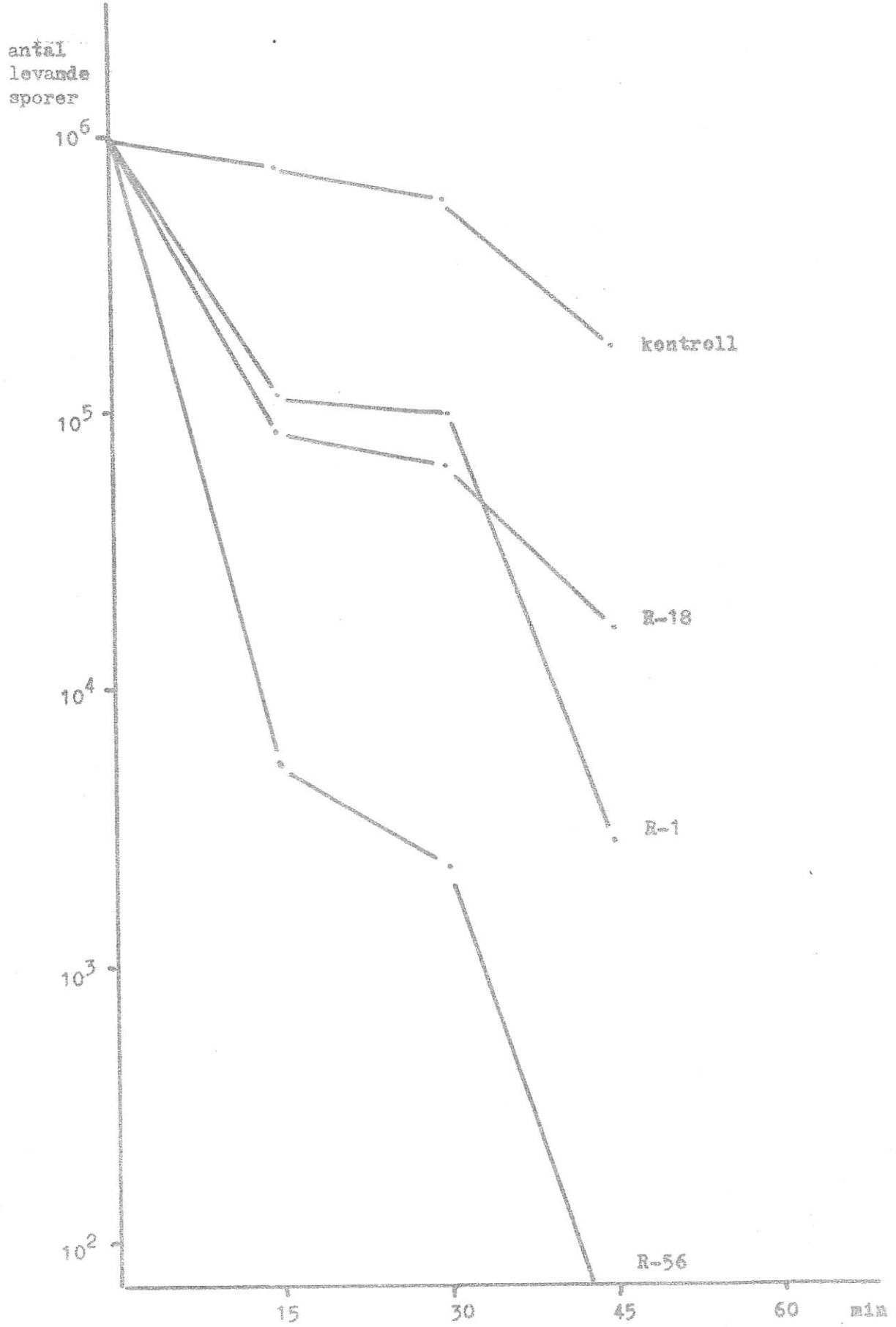


Fig. 4. Effekten av utvalda inhibitorer på sporer av B. subtilis i fosfat-buffert vid 90°C.

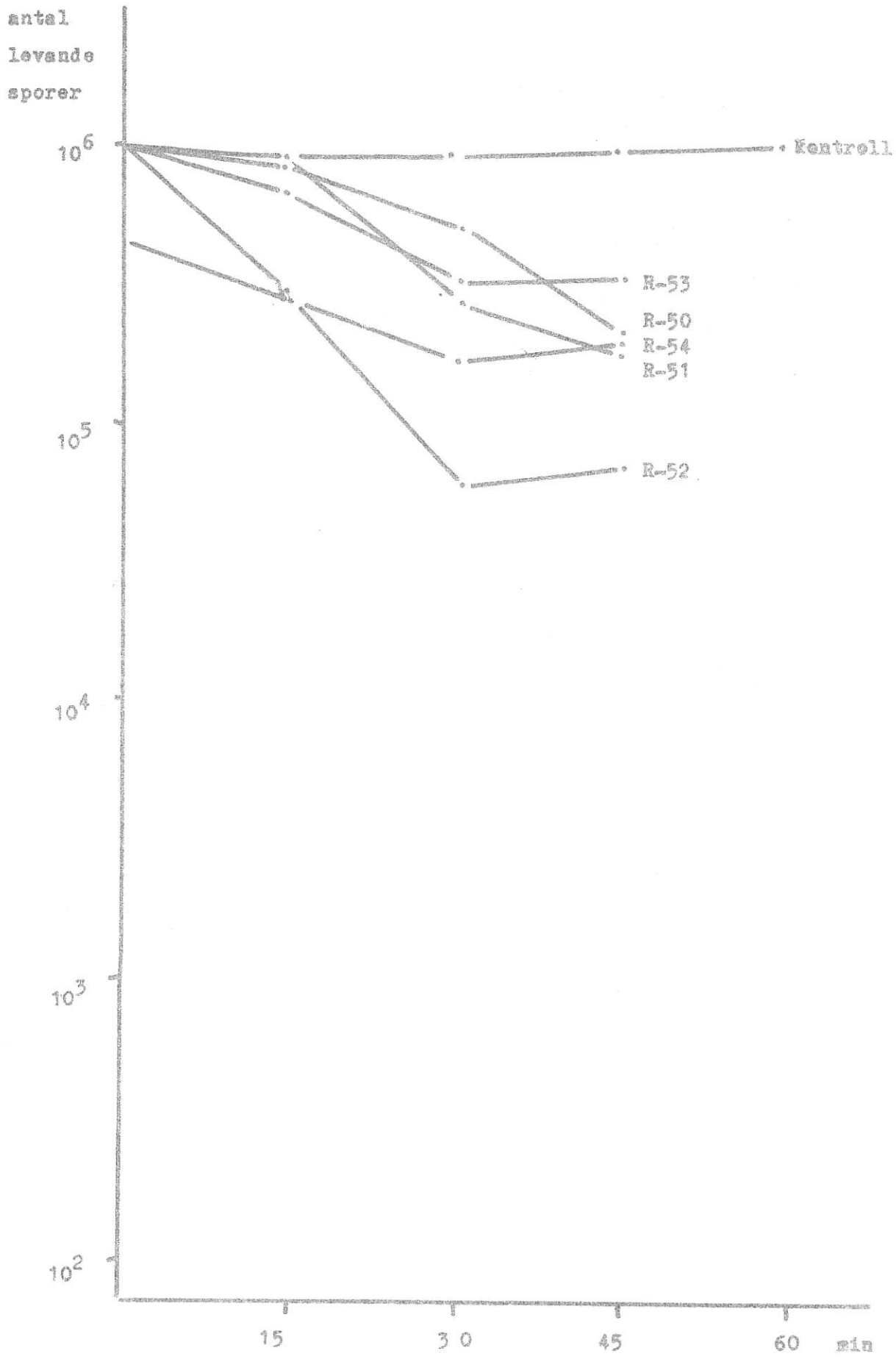


Fig. 5. Effekten av olika långkedjiga alkoholers lysinestrar på "värmeresistenta" sporer av B. subtilis ("b-sporer") i fosfatbuffert vid 80°C.

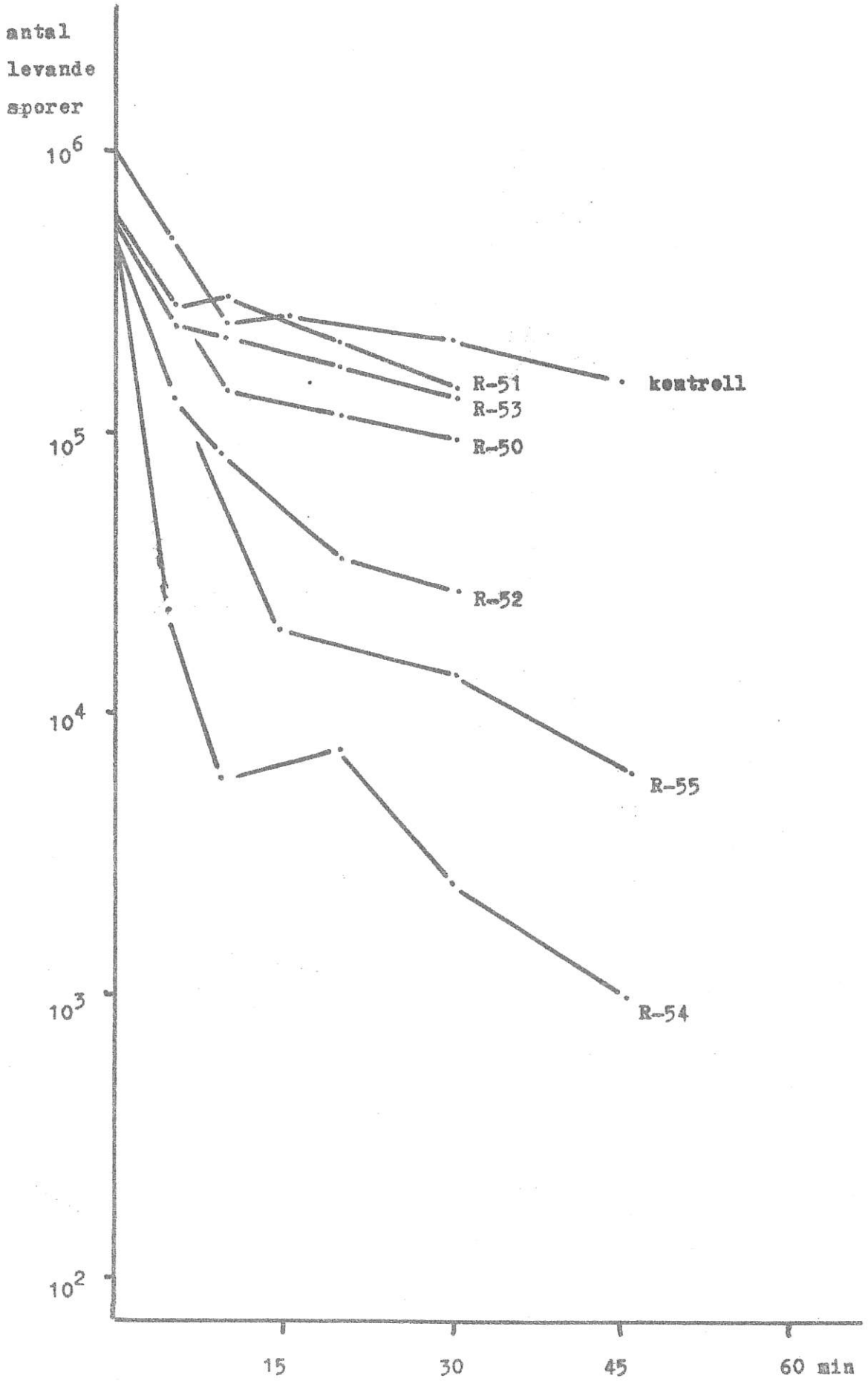


Fig. 6. Effekten av olika långkedjiga alkoholers lysinestrar på "värme-känsliga" sporer av B. subtilis ("c-sporer") i fosfatbuffert vid 80°C.

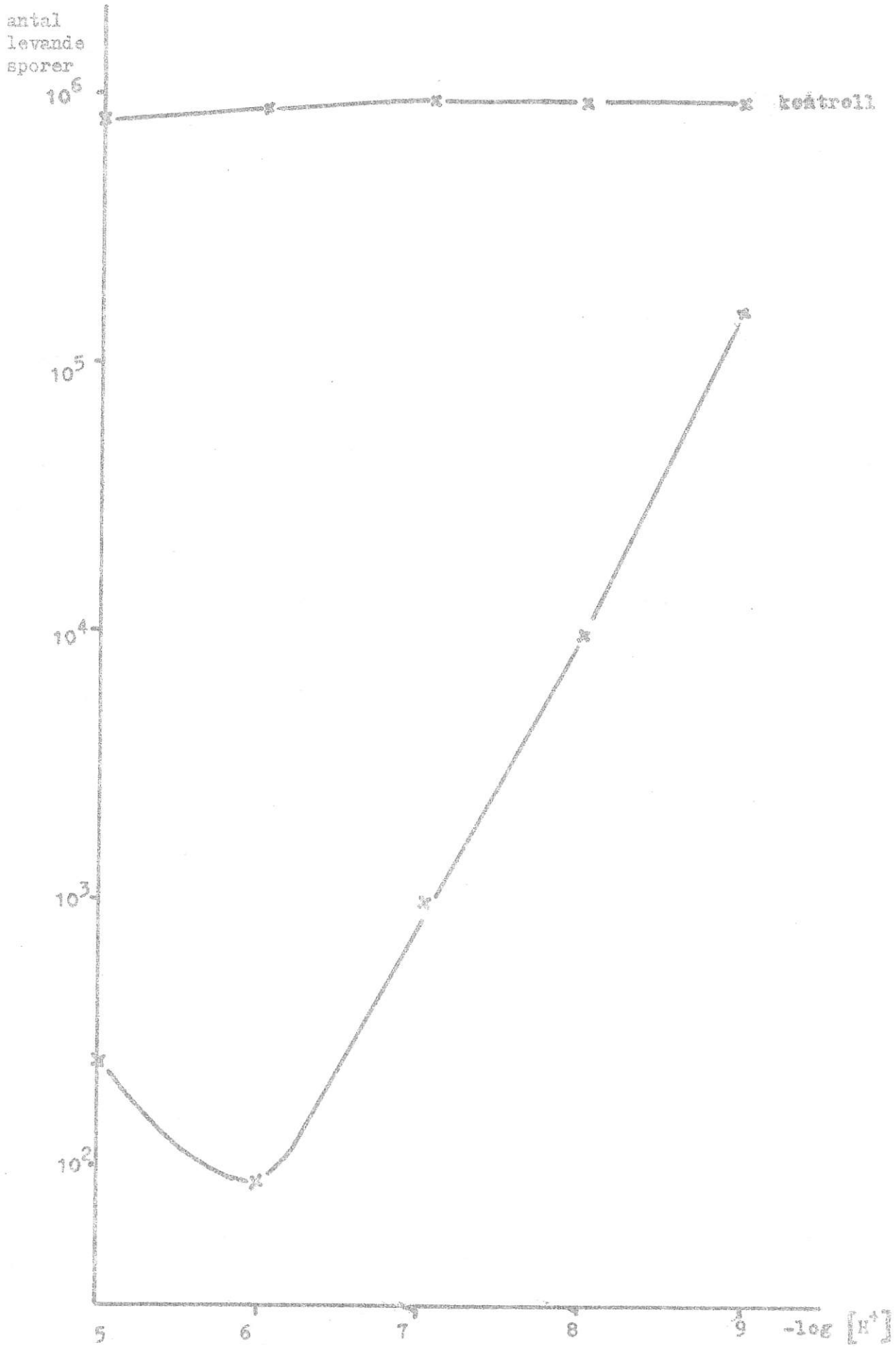


Fig. 7. Betydelsen av pH på effekten av L-lysyl-N-cetyllysylamid i fosfatbuffert vid 80°C. Upphettningstid: 30 min.

Tabell 1. Använda kemiska inhibitorer

kod	kemisk sammansättning
R-50	L-lysin oktyl ester
R-51	L-lysin decyl ester
R-52	L-lysin dodecyl ester
R-53	L-lysin eicocyl ester
R-54	L-lysyl-L-lysyl-L-lysin hexadecyl ester
R-55	L-lysin-tridecyl ester
R-56	L-lysyl-N-cetyllysylamid
R-1	N_α-palmitoyl-L-lysyl-L-lysin etyl ester
R-10	N_α-arachidoyl-L-lysyl-L-lysin metyl ester
R-18	N_α-palmitoyl-L-ornityl-L-arginin metyl ester

Tabell 2 Effekten av R-1 och R-56 på bakteriesporer vid 30°C i trypton-jäst extrakt medium.

Organism	Inhibitor	Antal levande celler /ml								
		ursprunglig spor suspension	konc. av inhibitor nmol/ml							
			0		10		50		100	
			Exponeringstid							
			1	24	1	24	1	24	1	24
B. cereus	R-1	$2,3\ 10^6$	$1,6\ 10^6$	$4,9\ 10^7$	$2,4\ 10^6$	$1,5\ 10^6$	$1,8\ 10^6$	$3,9\ 10^6$	$3,0\ 10^6$	$2,5\ 10^6$
	R-56		$1,9\ 10^6$	$7,9\ 10^7$	$1,8\ 10^6$	$2,7\ 10^6$	$2,0\ 10^6$	$2,9\ 10^6$	$2,8\ 10^6$	$3,3\ 10^6$
B. megaterium	R-1	$1,7\ 10^6$	$3,0\ 10^6$	$4,9\ 10^6$	$5,4\ 10^5$	$4,5\ 10^3$	$7,4\ 10^5$	$4,4\ 10^3$	$7,0\ 10^5$	$4,0\ 10^2$
	R-56		$2,9\ 10^6$	$4,3\ 10^6$	$7,0\ 10^5$	$5,5\ 10^5$	$6,5\ 10^5$	$4,9\ 10^3$	$5,1\ 10^3$	$2,2\ 10^3$
B. subtilis	R-1	$9,0\ 10^5$	$6,8\ 10^5$	$5,5\ 10^7$	$1,4\ 10^5$	$2,7\ 10^2$	$8,0\ 10^4$	0	$8,8\ 10^5$	0
	R-56		$9,0\ 10^5$	$7,2\ 10^7$	$4,1\ 10^5$	$6,0\ 10^1$	$1,2\ 10^5$	0	$1,2\ 10^5$	0