

Uticaj faktora sredine na intenzitet antimikrobne aktivnosti bakteriocina

Vesković-Moračanin Slavica¹

S a d r Ź a j: Primena bakterija mlečne kiseline (BMK) u proizvodnji fermentisanih prehrambenih proizvoda, zbog pozitivnog uticaja na nutritivne i organoleptičke osobine, kao i na njihovu održivost, odavno je poznata. BMK dovode do brže acidifikacije sirovog materijala kroz produkciju slabih organskih kiselina, prvenstveno mlečne kiseline. Osim toga, značajna je i produkcija sirćetne kiseline, etanola, aromatičnih jedinjenja, egzopolisaharida, nekoliko enzima i bakteriocina. Bakteriocini su peptidni ili proteinski molekuli sa opšte poznatim antimikrobnim dejstvom. Mnoge vrste iz roda BMK proizvode bakteriocine sa prilično širokim spektrom antimikrobnog dejstva, pri čemu nekoliko bakteriocina BMK mogu, potencijalno, naći svoju primenu u industriji hrane, kao konzervansi. Na ovaj način može se smanjiti upotreba sintetičkih konzervanasa i/ili intenzitet toplotnog tretmana tokom proizvodnje hrane. Primena bakteriocina može biti alternativa u nastojanju da se zadovolje potrebe potrošača za bezbednom, svežom i minimalno prerađenom hranom. U nameri da se potpuno realizuje ovaj potencijal, neophodno je da se shvati njihova priroda, mehanizam produkcije, regulacije i delovanja, kao i uticaj spoljašnjih faktora na antimikrobnu aktivnost bakteriocina. Ostvareni pomaci u razvoju molekularne mikrobiološke ekologije doprinose boljem razumevanju ukupnih efekata bakteriocina u ekosistemima hrane, dok aktuelna proučavanja bakterijskih genoma mogu da dovedu do otkrića novih bakterija – producenata bakteriocina.

U ovom radu razmatran je uticaj spoljašnjih faktora sredine, kao što su pH, temperatura, sastav i struktura hrane na efikasnost tj. intenzitet antimikrobne aktivnosti nekih od bakteriocina BMK.

Ključne reči: bakteriocini, bakterije mlečne kiseline, hrana, pH, temperatura, antimikrobna aktivnost.

Uvod

Uprkos razvoju modernih tehnologija, proizvodnja i očuvanje bezbedne i kvalitetne hrane predmet je mnogih rasprava, ne samo u zemljama u razvoju (gde je razvoj i primena ovih tehnologija neophodna), već i u industrijalizovanim delovima sveta. Najveći izazovi za današnju industriju hrane predstavljaju nastojanja da se: a) smanje ekonomski gubici do kojih dolazi usled kvara hrane, b) snizi cena procesa proizvodnje hrane, c) smanji mogućnost prenošenja patogenih mikroorganizama, kao i d) da se zadovolje rastuće potrebe potrošača za hranom spremnom za neposrednu upotrebu koja je svežeg ukusa, visoke hranljive i vitaminske vrednosti i koja je, uz to, minimalno prerađena i tretirana konzervansima (Gálvez i dr., 2007).

Empirijska primena mikroorganizama i/ili njihovih prirodnih metaboličkih produkata datira iz daleke istorije razvoja ljudske vrste, iz perioda ne-

olita, 10000 godina pre nove ere (Ross i dr., 2002; Prajapati i Nair, 2003). Bakterije mlečne kiseline (BMK) proizvode niz antimikrobnih supstanci (npr. slabe organske kiseline, diacetil, aceton, vodonikperoksid, reuterin, reutericiklin, antifungalni peptidi i bakteriocini) (Holzapfel i dr., 1995; El-Ziney i dr., 2000; Magnusson i Schnürer, 2001). Uloga i mehanizam dejstva većine krajnjih proizvoda metabolizma BMK odavno je opisana i ima svoje mesto u prirodnoj zaštiti hrane (Caplice i Fitzgerald, 1999), dok se o ulozi bakteriocina BMK još uvek intenzivno raspravlja.

Bakteriocini su peptidni ili proteinski molekuli sintetisani na ribozomima bakterija producenata koji ispoljavaju antimikrobno dejstvo, prvenstveno, na Gram-pozitivne mikroorganizme (Cotter i dr., 2005) pri čemu ćelije koje ih proizvode ostaju imune na sopstvene bakteriocine (Tagg i dr., 1976). BMK proizvode različite bakteriocine, koji mogu biti svrstani prema klasama, koje je predložio Klaenhammer

Napomena: Rad je rezultat realizacije Projekata integralnih i interdisciplinarnih istraživanja, ev. broj III 46009 i III 46010, koje u periodu 2011–2014. god. finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

¹Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kaćanskog 13, 11000 Beograd, Republika Srbija.

još 1993. godine (Klaenhammer, 1993). Danas, većina bakteriocina BMK, koji svoju primenu nalaze u procesima konzervisanja hrane, pripada klasama Ia, II i IV (tabela 1).

Stvaranje bakteriocina predstavlja prirodnu prednost ćelije producenta, s obzirom da sintetisani peptidi/proteini mogu uništiti ili inhibirati rast ostalih bakterija koje se sa njom takmiče za iste ekološke niše ili za iste hranljive materije. Navedeno svojstvo je u skladu sa karakteristikama bakteriocina da poseduju antimikrobna svojstva prema mikroorganizmima koji su obično srodni sa bakterijama-proizvođačima, kao i da su mnogo efikasniji protiv onih bakterija koje se „takmiče“ za iste nutritivne ma-

terije. Interesantna je izjava (Cotter i dr., 2005) da se „bakteriocini mogu smatrati rudimentiranom formom prirodnog imuniteta namirnica“. Antibakterijski spektar dejstva često uključuje mikroorganizme kvara i patogene bakterije poreklom iz hrane, kao što su *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*. Zabeležena je i aktivnost usmerena protiv Gram-negativnih bakterija, kao što su *Escherichia coli* i *Salmonella*, najčešće, u situacijama kada je narušen integritet njihove spoljašnje membrane (osmotski šok, tretman ćelije niskim pH ili visokim pritiskom, prisustvo deterdženta ili sredstava za čišćenje, propuštanje ćelija kroz pulsirajuće električno polje) (Stevens i dr., 1991; Helander i dr., 1997).

Tabela 1. Klasifikacija bakteriocina prema Heng-u i Tagg-u (2006).

Table 1. Classification of bacteriocins by Heng and Tagg (2006).

Klasa/ Class	Opšte karakteristike/ General characteristics	Bakteriocini sintetisani iz BMK/ Bacteriocins from LAB
I – Lantibiotici/Lantibiotics	<i>Modifikovani, termostabilni, mali globularni molekuli (<5kDa)/Modified, thermostable, small globular molecules (<5kDa)</i>	
Ia – linearni/linear	Formiraju pore, katjoni/Pore forming, cations	Nisin, Lacticin 481,
Ib – globularni/globular	Inhibitori enzima, nisu katjoni/Enzyme inhibitors, not cations	Plantaricin C
Ic – dvokompon. sistem/ two-comp. system	Dipeptidi/Dipeptids	Nisu utvrđeni/Not determined Lct3147, Plantaricin W
II – Nemodifikovani peptidi/ Non-modified peptides	<i>Termostabilni, mali globularni molekuli (<15kDa)/Thermostable, small globular molecules (<15kDa)</i>	
Iia – Nalik pediocinu/Pediocin-like	Anti-listerijski efekat/Anti-listeria effect	Pediocin PA1/AcH,
Iib – Raznovrsni/Versatile	Nisu slični pediocinu/Not pediocin-like	Enterocin A, Sakacin A
Ic – dvokompon. sistem/ two-comp. system	Dipeptidi/Dipeptids	Enterocin B, L50, Carnobacteriocin A Lactococcin G, Plantaricin S, Lactacin F
III – Veliki proteini/Large proteins	<i>Termolabilni proteini, velikih molekulskih masa (>30kDa)/Thermolabile proteins, high molecular weight (>30kDa)</i>	
IIIa – Bakteriolitici/Bacteriolytics	Uništavaju ćelijski zid/Destroy cell wall	Enterolysin A, Lcn972 ^a
IIIb – Ne-litični/Non-lytic	Meta-cytosol meta ćelije/Meta-cytosol cells	Colicin ^b E2-E9
IV – Cirkularni peptidi/ Circular peptides	<i>Termostabilni peptidi, velikih molekulskih masa, karakteristična „rep-glava“ veza između peptida/Thermostable peptides, high molecular weight, characteristic „head-tail“ peptide bond</i>	
		AS-48, Gassericin A, Acidocin B
^a Lcn972 se vezuje za prekursore ćelijskog zida meta-ćelija (lipide), blokirajući na taj način ćelijsku sintezu, 15 kDa/ Lcn972 binds to cell wall precursors of target cells (lipid), thereby blocking the synthesis of cell, 15 kDa		
^b Kolicine sintetisahu određeni sojevi E.coli./Quantities synthesize certain strains of E. coli.		

Bakteriocini i njihova primena u proizvodnji hrane

Iako mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije sintetišu bakteriocine, bakteriocini koji proizvode BMK imaju najveći interes za prehrambenu industriju. Osim toga, većina BMK su prirodni izolati, što ih čini pogodnim za primenu u industriji hrane. Iako se tokom konzervisanja hrane koriste različite metode, u poslednje vreme zdravstvena svest javnosti dovela je do povećane potražnje za proizvodima koji nisu prošli obimne procese prerade i, uz to, ne sadrže hemijske konzervanse. Dakle, produkcija bakteriocina od strane BMK nije samo prednost za same bakterije već se može iskoristiti u prehrambenoj industriji kao sredstvo za kontrolu nepoželjnih mikroorganizama u namirnicama i to na prirodan način, što je na kraju i osnovni zahtev samih potrošača (Obradović i Vesković-Moračanin, 2007; Vesković-Moračanin, 2010).

Danas, najbolje proučen i ujedno najviše primenjivan bakteriocin je nizin izolovan iz *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Pripada klasi antibiotika i sastavljen je od 34 aminokiselinska peptida (Gross i Morrell, 1971). Otkriven je davne 1928. godine, kada je ustanovljeno da određena materija sintetisana iz *Streptococcus lactis* (danas *Lc. lactis* ssp. *lactis*) inhibira rast *Lactobacillus bulgaricus* (Rogers, 1928; Rogers i Whittier, 1928). Ne zadugo, istraživači iz oblasti hrane, shvatili su da nizin predstavlja veliki potencijal u oblasti bezbednosti. Prvi put se na tržištu u Engleskoj pojavio 1953. godine, dok je sa njegovom intenzivnom primenom započeto 1957. godine u proizvodnji sira (Chevalier i dr., 1957). Pokazalo se da nizin poseduje izraženo baktericidno dejstvo u odnosu na Gram-pozitivne bakterije (među kojima su *L. monocytogenes*, *S. aureus*, bakterije roda *Mycobacterium*) ali da, istovremeno, sprečava i stvaranje spora kod nekih vrsta bakterija (*Bacillus* i *Clostridium*) (Hurst, 1981). Mehanizam inhibitornog dejstva nizina na proces stvaranja spora nije potpuno razjašnjen, mada se smatra da je rezultat dejstva na sulfhidridne grupe molekula proteina (Morris i dr., 1984). Ispoljena aktivnost ima više sporostatski karakter nego sporicidni.

Danas se nizin upotrebljava u 48 zemalja sveta jer je 1969. godine registrovan kao dozvoljeni aditiv u hrani (E-234) od strane Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), Expert Committee on Food Additives (WHO, 1969). To je, za sada, jedini bakteriocin koji ima „GRAS“- status („Generally recognized as safe“) i koji se, kao aditiv, može slobodno koristiti tokom proizvodnje hrane. Koristi se u proizvodnji konzervirane hrane i proizvoda od mleka. Naro-

čito je efikasan u proizvodnji sireva i sirnih namaza, kao prirodni antimikrobni faktor, u borbi protiv termorezistentnih sporogenih bakterija. Poseban značaj nizin ima u prevenciji *Clostridium botulinum* koji može dovesti do drastičnih zdravstvenih posledica usled produkcije toksina.

Postoji, takođe, i nekoliko drugih izolovanih bakteriocina koji su prilagođeni za komercijalnu upotrebu i koji su opisani u naučnoj literaturi, kao što su pediocin PA-1/AcH, lakticin 3147, lakticin 481, enterocin AS-48, variocin, itd. Navedene preliminarne studije o aktivnosti bakteriocina *in vitro*, ili u sistemima hrane, vršene su pomoću delimično prečišćenih preparata bakteriocina dobijenih iz tečnih suspenzija bakterijskih kultura. Prilikom izvođenja eksperimenata, veoma često, istraživači povećavaju koncentraciju dodatih bakteriocina, što značajno ograničava objektivno tumačenje dobijenih rezultata, a time i objektivnost samih preliminarnih testova.

Bakteriocini se mogu dodati u hranu kao aditivi, pri čemu je njihova sinteza već obavljena *ex situ*, ili u vidu „koncentrata“ bakteriocin-produkujućih sojeva uzgajanih u odgovarajućim pogodnim supstratima (sinteza bakteriocina se obavlja *in situ*), ili pak dodavanjem proizvoda koji je prethodno fermentisan bakteriocin-produkujućim sojem (*Schilling i dr.*, 1996).

Ex situ proizvedeni bakteriocini mogu se primeniti u obliku imobilisanih preparata, pri čemu je delimično prečišćen bakteriocin vezan za nosač. Nosač deluje kao rezervoar i difuzor koncentrovanih molekula bakteriocina obezbeđujući, na taj način, njihov kontinuiran priliv u hranu. Nosač, takođe, štiti bakteriocin od negativnog dejstva komponenata iz hrane i od potencijalne enzimske inaktivacije. Predloženo je velik broj metoda za imobilizaciju bakteriocina, uključujući adsorpciju na ćelijama koje ih proizvode (Yang i dr., 1992), na česticama silicijum-dioksida, prahu kukuruznog skroba (Coventry i dr., 1996), kapsuliranje u lipozomima (Degnan i Luchansky, 1992) ili ugradnju u gel-omotače i filmove različitih materija, kao što su kalcijumalginat, želatin, celuloza, sojin protein, kukuruzni skrob, kolageni omotači, celofan, najlon ili drugi filmovi polimera plastike (Daeschel i dr., 1992).

U većini slučajeva, imobilisani bakteriocini imaju značajnu funkciju smanjenja postprocesne kontaminacije hrane, naročito kod površinskog umnožavanja nepoželjenih bakterija. Antimikrobno pakovanje poput polietilenskog filma, koji sadrži bakteriocin izolovan iz *Lb. curvatus* (32Y), smanjuje broj živih ćelija *L. monocytogenes* tokom čuvanja upakovanih svinjskih odrezaka, sirovog govedeg mesa i viršli (*Mauriello i dr.*, 2004). Slično ovome, celofansko pakovanje sa inkorporisanim nizinom re-

dukuje ukupan broj živih aerobnih bakterija u telećem mesu tokom skladištenja pri temperaturi od 8°C (Guera i dr., 2005) kao i broj ćelija *Micrococcus luteus* ATCC 10240 u sirovom i pasterezovanom mleku tokom skladištenja (Mauriello i dr., 2005).

Proizvodnja bakteriocina *in situ* ima nekoliko prednosti u odnosu na *ex situ* proizvodnju, posmatrano sa zakonskog, ali i sa komercijalnog aspekta proizvodnje hrane. Snižavanje cena postupaka biokonzervisanja naročito je značajno za zemlje u razvoju gde je, veoma često, bezbednost hrane izuzetno kompromitovana (Holzapfel, 2002). Stoga, danas su mnoga ispitivanja usredsređena na odabir i razvoj bakteriocin-produkujućih kultura za primenu u proizvodnji hrane (Ross i dr., 2002; Blagojev i dr., 2012). Adekvatna primena BMK mora biti bazirana na pažljivom izboru dobro prilagođenih sojeva koji mogu nesmetano da rastu u određenoj vrsti hrane, da je njihova primena u navedenoj hrani dozvoljena tj. da ne narušava i ne menja njenu prirodu, da mogu da rastu u uslovima prerade i tokom perioda čuvanja hrane, kao i da poseduju mogućnost produkcije dovoljne količine bakteriocina u hrani koja će u potpunosti inhibirati patogene mikroorganizme ili mikroorganizme kvara hrane. Osobine soja, kao i količine produkovanog bakteriocina mogu biti poboljšane heterologom ekspresijom bakteriocinskih gena (Rodriguez i dr., 2003), a tačan trenutak produkcije bakteriocina, takođe, može se menjati upotrebom određenih inducibilnih faktora tokom proizvodnje (Zhou i dr., 2006).

U našim uslovima, u industriji mesa, vršena su ispitivanja u cilju potencijalne primene poluprečišćenih bakteriocina izolovanih iz *Leuconostoc mesenteroides* E 131 (Vesković, 2005; Vesković-Moračanin, 2007), *Ln. mesenteroides* IMAU:10231 (Vesković-Moračanin i dr., 2011, 2012). S obzirom da je tehnološka primena bakterija *Leuconostoc* vrsta u industriji mesa ograničena zbog njihovih fizioloških svojstava (stvaraju sluz, tj. egzopolisaharide, acetoin, diacetat, etanol itd.), koja su sa aspekta kvaliteta neprihvatljiva u ovoj industriji, direktna aplikacija njihovih izolovanih i prečišćenih bakteriocina predstavlja rešenje za primenu ovih mikroorganizama. Za razliku od njih, bakteriocin-produkujući sojevi *Lb. sakei* mogu se dodavati u mesni nadev u obliku suspenzija tečnih kultura. Grupa autora (Čaklović i dr., 2005) je, u okviru projekta „Bezbednost tradicionalnih fermentisanih kobasica“ ispitala mogućnost primene različitih sojeva *Lb. sakei* (I151, I154 i I155), kao i bakteriocina izolovanog iz leukonostoka (Drosinos i dr., 2006), u proizvodnji nacionalnih fermentisanih kobasica. U nadev ispitivanih kobasica autori su inokulisali, pored protektivnih kultura i patogenu *L. monocytogenes*. Tokom

procesa zrenja, koji je trajao 28 dana, dolazilo je do redukcije broja ovoga patogena. Ispitivanja su ukazala na blagu antilisterijsku prednost *Lb. sakei* I151, u odnosu na druga dva primenjena soja.

Spoljašnji faktori sredine i efikasnost bakteriocina u sistemima hrane

Hrana je kompleksan ekosistem čiji je mikrobiološki profil uslovljen vrstom hrane, vrstom primenjenog termičkog tretmana tokom procesa obrade, načinom obrade, uslovima skladištenja i sl. Zbog toga razlike u mikrobiološkoj populaciji mogu biti jako velike, u zavisnosti da li je u pitanju komercijalno sterilizovana hrana ili, pak, sirova ili fermentisana hrana (Kozadžinski i dr., 2008).

S druge strane, efikasnost bakteriocina dodatih u hranu, pored karakteristika uslovljenih sopstvenom strukturom i prirodom, zavisi i od brojnih spoljašnjih faktora sredine. Najčešće, dejstvo ovih faktora je ograničavajuće i inhibitorno na jačinu ispoljenog antimikrobnog efekta i bazirano je na osobenostima same hrane, na postojanju interakcija bakteriocina sa sastojcima hrane, potencijalne procese precipitacije, inaktivacije ili neujednačenog difundovanja bakteriocina u hrani kao matriksu (tabela 2). Drugim rečima, osobenosti samog sistema hrane, npr. njena struktura, puferski potencijal, sastav (nutrijenti, aditivi, antibiotici), uslovi prerade (smrzavanje, hlađenje, delovanje povišenog pritiska i temperature, homogenizacija i dr.), pH i sl. oštećuju indirektno ćeliju producenta ili dovode do smanjenja sinteze bakteriocina (Gálvez i dr., 2007). Takođe, jačina antimikrobne aktivnosti dodatih bakteriocina direktno je proporcionalna broju i vrsti prisutnih mikroorganizama u hrani, što znači da je veća količina bakteriocina potrebna da inaktiviraju veći broj ćelija mikroorganizama i obrnuto. Takođe, mikrobiološke interakcije mogu imati velik uticaj na mikrobiološki balans i/ili umnožavanje korisnih ili štetnih bakterijskih vrsta.

Nedavni pomaci u razvoju molekularne mikrobiološke ekologije mogu doprineti boljem razumevanju ukupnih efekata bakteriocina u ekosistemima hrane, dok proučavanje bakterijskog genoma može dovesti do pronalaska novih izvora bakteriocina.

Poređenjem podataka dobijenih u laboratorijskim uslovima iz podloga za gajenje, ili onih gde je hrana služila kao matriks za ispitivanje, uočava se pravilnost da su bakteriocini manje efikasni u sistemima sa hranom nego u model-sistemima, u laboratorijskim uslovima (Schillinger i dr., 1996). Neretko, potrebno je dodati i deset puta veću koncentraciju bakteriocina u hranu da bi se postigao inhibitorni

Tabela 2. Efikasnost bakteriocina u hrani: ograničavajući faktori (Gálvez i dr., 2007)**Table 2.** Bacteriocin efficacy in foods: limiting factors (Gálvez et al., 2007)

Faktori koji se direktno odnose na hranu	Food-related factors
<ul style="list-style-type: none"> – Uslovi prerade hrane; – Temperatura skladištenja hrane; – pH hrane; – Inaktivacija bakteriocina od strane enzima hrane; – Interakcija bakteriocina sa aditivima hrane/ sastojcima; – Adsorpcija bakteriocina od strane komponenata hrane; – Niska rastvorljivost i neravnomerna raspodela bakteriocina u hrani; – Ograničena stabilnost bakteriocina tokom održivosti hrane. 	<ul style="list-style-type: none"> – Conditions of food processing; – Storage temperature of food; – pH of the food; – Inactivation of bacteriocins by food enzymes; – Interaction of bacteriocins with food additives / ingredients; – Adsorption of bacteriocins by components of food; – Low water and the uneven distribution of bacteriocins in food; – Limited stability of bacteriocins in food sustainability.
Faktori koji se odnose na prisutne mikroorganizme u hrani	The food microbiota
<ul style="list-style-type: none"> – Diverzitet epifitne mikroflore u hrani; – Kvantitativna zastupljenost mikroorganizama u hrani; – Osetljivost prisutnih mikroorganizama na dejstvo bakteriocina; – Mikrobiološke interakcije u sistemima hrane. 	<ul style="list-style-type: none"> – Diversity of epiphytic microflora in foods; – Quantitative presence of microorganisms in foods; – The sensitivity of microorganisms present to the action of bacteriocins; – Microbial interactions in food systems.
Ciljni mikroorganizmi	The target bacteria
<ul style="list-style-type: none"> – Kvantitativna zastupljenost ciljnih mikroorganizama u hrani; – Bakteriocinska osetljivost (Gram-pripadnost, rod, vrsta, soj); – Fiziološko stanje (faza rasta, latentna faza, faza mirovanja ili gladovanje ćelije, faza umnožavanja, postojanje faktora stresa, nastanak endospora...); – Postojanje zaštite usled fizičko-hemijskih barijera (formiranje mikrokolonija, biofilmova, sluzi); – Nastanak rezistencije/adaptacije. 	<ul style="list-style-type: none"> – Quantitative presence of target microorganisms in foods; – Bacteriocin sensitivity (Gram-ethnicity, gender, species, strain); – Physiological state (growth phase, latent phase, cell sleep or starvation mode, multiplication phase, the presence of stress factors, formation of endospores ...); – The existence of protection due to physical and chemical barriers (formation of microcolonies, biofilms, slime); – The emergence of resistance/adaptation.

efekat ekvivalentan onom koji se dobija tokom eksperimenata u laboratoriji.

U sirovoj hrani, autohtona mikroflora može doprineti razmnožavanju kontaminiranih bakterijskog porekla. Međutim, složena bakterijska mikroflora može, takođe, smanjiti efikasnost bakteriocina usled prisustva rezistentnih sojeva bakterija (npr. Gram-negativne bakterije) i/ili usled veće mogućnosti za stvaranje inaktivirajućih enzima, poput proteaza. Poznato je da ćelije koje nisu u eksponencijalnoj fazi rasta mogu biti rezistentne na dejstvo bakterio-

cina. Takođe, promene u ciljnim mikroorganizmima, npr. usled postojanja ćelijskog stresa, mogu dovesti do smanjenja efikasnosti bakteriocina. Neaktivne bakterijske forme (endospore) otporne su na antimikrobni efekat bakteriocina nezavisno od toga što tretmani tokom prerade hrane doprinose povećanju osetljivosti ćelija na bakteriocinsku aktivnost (Gálvez i dr., 2007).

Bakterijske ćelije najčešće su homogeno raspoređene u matriksima. Međutim, bakterije u čvrstoj hrani imaju tendenciju formiranja mikrokolo-

nija ili tendenciju rasta u vidu površinskog, tankog biofilma. Zaštitni efekat biofilмова protiv antibakterijskih supstanci u industriji hrane dobro je opisan (Kumar i Anand, 1998) i takođe može da umanjuje efikasnost bakteriocina.

Poznato je da se primena nizina u proizvodima od mesa sreće sa nekoliko ograničenja koja su rezultat njegove interakcije sa fosfolipidnim emulgatorima i drugim komponentama hrane (Henning i dr., 1986; Aesen i dr., 2003), slabe rastvorljivosti na pH višim od 6,0 i inaktivacije usled formiranja nizin-glutation veza (Rosi dr., 2003). Smanjenje aktivnosti bakteriocina naročito je izraženo u sredinama sa visokim procentom masti. Međutim, dokazano je da nizin može efikasno da se koristi pri konzervisanju Bolonja-tipa kobasica s obzirom da one imaju manji procenat masti (Davies i dr., 1999).

Sa druge strane, primena nizina u proizvodima od mleka, prvenstveno kod proizvodnje sireva, veoma je česta (Gálvez i dr., 2007; Delves-Broughton, 2005).

Varijacije u osetljivosti sojeva i razvoj rezistentnih, odnosno adaptiranih sojeva ciljnih mikroorganizama predstavlja veliki problem prilikom upotrebe bakteriocina. Primera radi, ne pokazuju svi sojevi *L. monocytogenes* istu osetljivost na antilisterijske bakteriocine (Martínez i dr., 2005). Najviše zabrinjava činjenica da rezistentnost na jedan bakteriocin nosi, u većini slučajeva, rezistentnost i na druge bakteriocine, dok unakrsna rezistentnost pediocinskih bakteriocina ima za posledicu nastanak opšte rezistencije (Gálvez i dr., 2007).

Jedan od značajnijih kriterijuma utvrđivanja mogućnosti primene bakteriocina u hrani predstavlja njihov odnos prema povišenim temperaturama koje se, inače, primenjuju kao deo tehnološkog postupka proizvodnje određenih proizvoda. Rezultati ispitivanja uticaja temperatura pasterizacije i sterilizacije (65°C, 80°C, 90°C i 100°C) na jačinu antilisterijske aktivnosti bakteriocina izolovanog iz *Ln. mesenteroides* E 131 i *Lb. sakei* I 154 (Vesković, 2005), kao i na *Lb. sakei* I 151 (Vesković-Moračanin i dr., 2010), ukazuju na postojanje izražene termorezistencije ispitivanih bakteriocina. Tek na temperaturama iznad 90°C dolazilo je do smanjivanja njihove antimikrobne aktivnosti koja se nije izgubila ni posle procesa autoklaviranja (121°C, 1,2 bar tokom 15 minuta ekspozicije). Na ovaj način utvrđena termorezistentnost ukazuje na prirodu i strukturu ispitivanih bakteriocina (veoma mali globularni proteini sa izraženom termostabilnošću), a time i na njihovu pripadnost klasi I i klasi IIa (Mortvedt i dr., 1991; Hastings, 1991; Cintas i dr., 1998). Do sličnih zaključaka došli su i Hartnett i dr. (2002) demonstrirajući efekat istih ovih temperatura na aktivnost

izolovanih bakteriocina iz drugih sojeva *Ln. mesenteroides* i *Lb. sakei*.

Ispitujući optimalne uslove za aktivnost bakteriocina izolovanih iz bakterija producenata *Ln. mesenteroides* i *Lb. sakei* (Lucke, 1985) došlo se do saznanja da se njihova aktivnost zadržava u širokom pH opsegu (4,0–9,0). Ovaj široki pH opseg veoma je značajan sa aspekta mogućnosti primene u industriji mesa. S obzirom na činjenicu da je finalni pH fermentisane kobasice, koja se proizvodi u Evropskoj uniji, u granicama od 4,8 do 5,0 (Lucke, 1985) primena ispitivanih bakteriocina sa aspekta pH moguća je i bez ograničenja. Takođe, ispitivanja naših autora pokazala su da je aktivnost bakteriocina izolovanih iz *Ln. mesenteroides* E 131 i *Lb. sakei* I 154 veća pri većim vrednostima pH sredine i temperature (Vesković-Moračanin dr., 2008; Vesković-Moračanin, 2010).

Podaci iz literature ukazuju na korelaciju između produkcije bakteriocina i faze eksponencijalnog rasta bakterija producenata (Parente i Riccardi, 1994; De Vuyst i dr., 1996). Bakteriocinska aktivnost utvrđena je na početku eksponencijalne faze rasta ćelija producenata, da bi se idući ka stacionarnoj fazi ona smanjivala usled proteolitičke degradacije, ćelijske adsorpcije i sopstvene agregacije (De Vuyst i dr., 1996; Aesen i dr., 2000). Interesantno je napomenuti da iako je antilisterijska aktivnost izolovanih bakteriocina u direktnoj zavisnosti od temperature sredine i njenog pH (više temperature i viši pH su optimalniji za ispoljavanje aktivnosti), ona se ne poklapa sa optimalnim uslovima za rast i razmnožavanje bakterija producenata (Leroy i De Vuyst, 1999). Tako recimo, iako se maksimalni ćelijski rast *Lb. sakei* CTC 494 beleži pri temperaturi 35°C to nisu istovremeno i optimalni uslovi za aktivnost izolovanog bakteriocina (ona je utvrđena na 20°C), kao ni najoptimalniji uslovi za njegovu potencijalnu primenu.

Zaključci

Dobrobit bakteriocina civilizacija koristi hiljadama godina unazad. Međutim, jedini bakteriocin koji je danas, kao konzervans hrane, našao svoju primenu u prehrambenoj industriji i koji ima zvanično, zakonsko odobrenje u zemljama širom sveta, je nizin. Nakon saznanja da pored nizina postoje i drugi efikasni bakteriocini koji se mogu uspešno primenjivati u proizvodnji različitih vrsta hrane, može se postaviti pitanje zašto je njihova primena u savremenoj prehrambenoj industriji, do danas, izostala. Kao osnovni razlozi nameću se poteškoće vezane za nacionalna zakonodavstva i postojanje pratećih finansijskih proble-

ma u oblasti razvoja, formulacije i plasiranja komercijalnih preparata novih bakteriocina na svetsko tržište hrane. Drugim rečima, navedene teškoće odnose se, pre svega, na implementaciju bakteriocina na tržište, dok su naučni dokazi opravdanosti i benefita njihove primene, uveliko obezbeđeni. Ispoljena efektivnost bakteriocina, kao i ekonomičan i ne previše zahtevan način inkorporiranja u namirnice, predstavlja odličnu alternativu u kombinaciji sa drugim prirodnim konzervansima. Ukoliko se navedeni problemi zanemare, pred nama ostaje širok spektar značajnih razloga za njihovu primenu u prehrambenom sektoru. Sa druge strane, bilo bi naivno verovati da bakteriocini mogu da predstavljaju jedino i konačno rešenje za aktuelne probleme u oblasti bezbednosti hrane.

Rezimirajući dosadašnja iskustva u ovoj oblasti, nameće se zaključak da bi u narednom periodu bilo potrebno privući širu pažnju potrošača i intenzivnije promovisati primenu ovih prirodnih sup-

stancija kao deo preventivnih mera u sprečavanju nastanka oboljenja izazvanih upotrebom kontaminirane hrane. Primena bakteriocina i bakteriocin-produkujućih kultura može biti interesantna i veoma poželjna s obzirom da je poverenje potrošača u hemijske konzervanse uveliko poljuljano, pa čak i dovedeno u pitanje. Sastav hrane tj. njene osobenosti (pH, temperatura, ingredijenti i dodaci u hrani, vrsta i broj prisutne epifitne mikroflore hrane), kao i sam tehnološki proces koji se primenjuje tokom procesa proizvodnje, mogu uticati na stabilnost i aktivnost dodatih bakteriocina. Buduća istraživanja u ovoj oblasti trebalo bi da razjasne i ovu nepoznanicu vezanu za njihovu primenu. Na taj način obezbediće se neophodna saznanja u oblasti optimizacije spoljašnjih uslova, što će doprineti maksimalnom antimikrobnom efektu dodatih bakteriocina u sisteme hrane, ali i stvoriti mogućnost za otkrivanje njihovih novih producenata.

Literatura

- Aesen, I. M., Moretro, T., Axelsson, L., Storo, I., 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 159–166.
- Aesen I. M., Markussen S., Mørtrø T., Katla T., Axelsson L., Naterstad K., 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 35–43.
- Blagojev N., Škrinjar M., Vesković-Moračanin S., Šošo V., 2012. Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters Journal*, 17, 3, 7219–7226.
- Caplice E., Fitzgerald G., 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131–149.
- Chevalier R., Fournaud J., Lefebvre E., Mocquot G., 1957. A novel technique for detection of inhibitory and stimulatory streptococci. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2: 117–37.
- Cintas L. M., Casaus P., Havarstein L. S., Hernandez P. E., Nes I. F., 1998. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P 13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4321–30.
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777–788.
- Coventry M. J., Gordon J. B., Alexander M., Hickey, M. W., Wan J., 1996. A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1764–1769.
- Čaklovića F., Alagić D., Smajlović M., Kozačinski L., Cvrtića Ž., Vesković Moračanin S., Gasparik-Reichardt J., Zdolec N., 2005. Effect of selected LAB on *L. monocytogenes* during production of traditionally fermented sausages. Research Project: „Safety of traditional fermented sausages: Research on protective cultures and bacteriocins“, Sarajevo, 10 november 2005. Workshop for Dissemination of the Project Results, Proceedings, 72– 83.
- Daeschel M. A., McGuire J., Almakhla H., 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Food Protection*, 55, 731–735.
- Davies E. A., Milne C. F., Bevis H. E., Potter R. W., Harris J. M., Williams G. C., Thomas L. V., Delves-Broughton J., 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *Journal of Food Protection*, 62, 9, 1004–1010.
- De Vuyst L., Callewaert R., Crabbe K., 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocins biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocins production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142, 817–827.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., Pot, B., 1996. Characterization of the antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 and the large-scale isolation of the bacteriocin amylovorin L471. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 9–20.
- Degnan A. J., Luchansky J. B., 1992. Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome-encapsulated pediocin AcH. *Journal of Food Protection*, 55, 552–554.
- Delves-Broughton J., 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57, 12, 525–527.

- Drosinos E. H., Mataragas M., Vesković-Moračanin S., Gasparik-Reichardt J., Hadziosmanović M., Alagić D., 2006.** Quantifying nonthermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in European fermented sausages using bacteriocinogenic lactic acid bacteria or their bacteriocins: A case study for risk assessment. *Journal of Food Protection*, 69, 2648–2663.
- El-Ziney M. G., Debevere J., Jakobsen M., 2000.** Reuterin. In: Naidu, A.S. (Ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, London, 567–587.
- Gálvez A., Abriouel H., López R. L., Omarn B., 2007.** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70.
- Gross E., Morell J. L., 1971.** The structure of nisin. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 4634–4645.
- Guerra N. P., Macias C. L., Agrasar A. T., Castro L. P., 2005.** Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin as biopreservative agent. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 106–1610.
- Hartnett D. J., Vaughan A., van Sinderen D., 2002.** Antimicrobial-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Barley and Sorghum. *Journal of the Institute of Brewing*, 108, 2, 169–177.
- Hastings J. W., Sailer M., Johnson K. Roy K. L., Veders J. C., Stiles M. E., 1991.** Characterization of leuococin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology*, 173, 23, 7491–7500.
- Helander I. M., von Wright A., Mattila-Sandholm T. M., 1997.** Potential fo lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 5, 146–50.
- Heng N. C. K., Tagg J. R., 2006.** What is in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4. doi:10.1038/nrmicro1273-cl., Correspondence (February 2006).
- Henning S., Metz R., Hammes W. P., 1986.** New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. *International Journal of Food Microbiology*, 3, 135–141.
- Holzappel W. H., Geisen R., Schillinger U., 1995.** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343–362.
- Holzappel W. H., 2002.** Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 197–212.
- Hurst A., 1981.** Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27, 85–123.
- Klaenhammer T. R., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39–86.
- Kozačinski L., Drosinos E. H., Caklovica F, Cocolin L., Gasparik-Reichardt J., Vesković S., 2008.** Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 93–106.
- Kumar C. G., Anand S. K., 1998.** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9–27.
- Leroy F., De Vuyst L. 1999.** Temperature and pH conditions that prevail durign the fermentation of sausages are optimal for the production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 974–981.
- Lucke F. K., 1985.** Fermented sausages. In: B. J. Wood (Ed). *Microbiology of Fermented Foods*. Vol 2, Elsevier Applied Science Publisher, London, 41–83.
- Magnusson J., Schnürer J., 2001.** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1–5.
- Martínez B., Bravo D., Rodríguez A., 2005.** Consequences of the development of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* in fermented dairy products. *Journal of Food Protection*, 68, 2383–2388.
- Mauriello G., Ercolini D., La Storia A., Casaburi A., Villani F., 2004.** Development of polyethylene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 314–322.
- Mauriello G., De Luca E., La Storia A., Villani F., Ercolini D., 2005.** Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 464–469.
- Morris S. L., Walsh R. C., Hansen J. N., 1984.** Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *Journal of Biological Chemistry*, 201, 581–584.
- Mortvedt C. I., Nissen-Meyer J., Sletten K., Nes I. F., 1991.** Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1829–34.
- Obradović D., Vesković-Moračanin S., 2007.** Funkcionalne fermentisane kobasice – sadašnje stanje i perspektive. *Tehnologija mesa*, 48, 93–97.
- Parente E., Riccardi A., 1994.** Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 12–15.
- Prajapati J. B., Nair B. M., 2003.** The history of fermented foods. In: Farnworth, E.R. (Ed.), *Fermented Functional Foods*. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Washington DC, 1–25.
- Rodríguez J. M., Martínez M. I., Horn N., Dodd H. M., 2003.** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 101–116.
- Rogers L. A., 1928.** The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 16, 321–325.
- Rogers L. A., Whittier E. D., 1928.** Limiting factors in lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 16, 211–229.
- Ross A. I. V., Griffiths M. W., Mittal G. S., Deeth H. C., 2003.** Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 125–138.
- Ross R. P., Morgan S., Hill C., 2002.** Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3–16.
- Schillinger U., Geisen R., Holzappel W. H., 1996.** Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 158–164.
- Stevens K. A., Sheldon B. W., Klapes N. A., Klaenhammer T. R., 1991.** Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3613–3615.

- Tagg J., Dajani A., Wannamaker L., 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 40, 722–756.
- Vesković S., 2005. Uticaj bakteriocina *Leuconostoc mesenteroides* E 131 i *Lactobacillus sakei* I 154 na *Listeria monocytogenes* u toku proizvodnje Sremske kobasice. Magistrska teza, Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd, Univerzitet u Beogradu.
- Vesković Moračanin S., 2007. Uticaj *Lactobacillus sakei* I 151, bakteriocina *Leuconostoc mesenteroides* E 131 i MAP na održivost Sremske kobasice. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd, Univerzitet u Beogradu.
- Vesković-Moračanin S., Turubatović L., Škrinjar M., Obradović D., 2008. Ispitivanje antilisterijskog efekta bakteriocina *Lactobacillus sakei* I 154 u različitim uslovima. *Tehnologija mesa*, 49, 5–6, 175–177.
- Vesković S., 2009. Bakteriocini BMK – Mogućnosti primene u proizvodnji fermentisanih kobasica. ISBN 978-86-7244-783-5. Izdavač: Andrejević, Beograd, Srbija.
- Vesković Moračanin S., 2010. Bakteriocini BMK kao prirodni protektori hrane - mogućnosti primene u industriji mesa. *Tehnologija mesa*, 51, 1, 83–94.
- Vesković Moračanin S., Obradović D., Velebit B., Borović B., Škrinjar M., Turubatović L., 2010. Antimicrobial properties of indigenous *Lactobacillus sakei* strain. *Acta Veterinaria*, 60, 59–66.
- Vesković Moračanin S., Stefanović S., Turubatović L., 2011. Application of bioprotectors in meat industry. *Journal of food hygienic engineering and design*, 1, 130–134.
- Vesković Moračanin S., Turubatović L., Škrinjar M., Obradović D., 2012. Antilisterial activity of bacteriocin isolated from *Leuconostoc mesenteroides* subspecies *mesenteroides* IMAU:10231 in production of Sremska sausages (traditional Serbian sausage): Lactic acid bacteria isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments". *Food Technology and Biotechnology*, 54, *in press*.
- WHO (World Health Organization), 1969. Specifications for identity and purity of some antibiotics. *Food Additives*, 69.34, 53–67.
- Yang R. G., Johnson M. G., Ray B., 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3355–3359.
- Zhou X. X. L., Wei Fen Li W. F., Ma G. X., Pan Y. J., 2006. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnology Advances*, 24, 285–295.

The influence of environmental factors on the intensity of the antimicrobial activity of bacteriocins

Vesković-Moračanin Slavica

S u m m a r y: The use of lactic acid bacteria (LAB) in the production of fermented food products, due to the positive impact on the nutritional and organoleptic properties, as well as their sustainability, has long been known. LAB lead to faster acidification of raw materials through the production of weak organic acids, primarily lactic acid. In addition, the production of acetic acid, ethanol, aromatic compounds, exopolysaccharides (EPS), several enzymes and bacteriocins is significant. Bacteriocins are peptide or protein molecules synthesized on ribosomes with antimicrobial activity. Many species of the LAB genus produce bacteriocins of rather broad spectrum of antimicrobial activity, with several LAB bacteriocins which can potentially find their use in the food industry as preservatives. In this way, we can reduce the use of synthetic preservatives and/or intensity of heat treatment during food production. Application of bacteriocins may be an alternative in an effort to meet consumer needs for safe, fresh and minimally processed foods. In order to fully realize this potential, it is necessary to understand their nature, mechanism of production, regulation and operation, as well as the effect of environmental factors on the antimicrobial activity of bacteriocins. Achieved progress in the development of molecular microbial ecology contributes to a better understanding of the overall effects of bacteriocins in food ecosystems, while the current study of bacterial genomes may lead to the discovery of new bacteria-producers of bacteriocins.

This paper discusses the influence of external environmental factors such as pH, temperature, composition and food structure on efficiency, e.g. on the intensity of the antimicrobial activity of some bacteriocins of LAB.

Key words: bacteriocins, lactic acid bacteria, food, pH, temperature, antimicrobial activity.

Rad primljen: 2.10.2012.

Rad ispravljen: 23.10.2012.

Rad prihvaćen: 29.10.2012.