

## Bakteriocini BMK kao prirodni protektori hrane – mogućnosti primene u industriji mesa\*

Vesković-Moračanin Slavica<sup>1</sup>

*S a d r ž a j:* Bakterije mlečne kiseline (BMK) imaju esencijalnu ulogu tokom proizvodnje fermentisanih proizvoda od mesa. Svojom metaboličkom aktivnošću utiču na proces zrenja, omogućavajući stvaranje željenih senzornih osobina proizvoda, a istovremeno inhibirajući rast neželjenih mikroorganizama. Zbog svoje dominantnosti tokom fermentacije i tradicije duge upotrebe, BMK su označene kao „zdravstveno bezbedna“ mikroflora. Biološku zaštitu BMK, kao prirodno prisutna i/ili selekcionisana i namerno dodata mikroflora, ostvaruju kroz produkciju nespecifičnih (mlečna, sirćetna i druge organske kiseline, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diacetil i drugo) i specifičnih metabolita, bakteriocina.

Bakteriocini su ekstracelularno oslobođeni peptidi ili proteinski molekuli, koje su stvorili neki BMK, koji poseduju izvesna bakteriocidna svojstva u odnosu na određene vrste mikroorganizama, najčešće srodne bakterijama proizvođačima. Produkcijom bakteriocina, od strane BMK, omogućeno je da se na selektivan, kompetitivan način deluje na okolnu mikrofloru koja može da sadrži bilo bakterije kvara, bilo patogene mikroorganizme.

Danas, bakteriocini, kao prirodni antimikrobni peptidi ili proteini, predstavljaju veoma interesantan potencijal aplikacije u industriji hrane, koji deluju u očuvanju zdravlja ljudi, uz istovremeni efekat na povećanje održivosti hrane.

U ovom radu predstavljeni su dugogodišnji rezultati autora dobijeni u laboratorijskim i industrijskim uslovima, a koji su imali za cilj da se stvore uslovi za primenu protektivnih kultura i/ili bakteriocina u industriji mesa u proizvodnji fermentisanih kobasica.

**Ključne reči:** fermentacija, bakterije mlečne kiseline (BMK), bakteriocini, bezbednost, fermentisane kobasice.

### Fermentacija kao vid konzervisanja hrane

Savremeni koncept proizvodnje i prerade hrane bazira se na primeni različitih vidova zaštitnih tehnologija koje imaju za cilj da, istovremeno, osiguraju i očuvaju zdravstvenu bezbednost proizvoda kao i prihvatljiv, i pri tom nepromenjen, kvalitet od momenta proizvodnje do momenta konzumiranja. Jedna od takvih, ujedno i najstarijih, tehnologija je fermentacija. Princip biološke zaštite, tj. smanjenje rizika po zdravlje potrošača, zasniva se prvenstveno na delovanju određenih mikroorganizama i njihovih metaboličkih produkata na nepoželjne bakterije kvara ili bakterije trovače hranom, ali bez promene kvaliteta proizvoda.

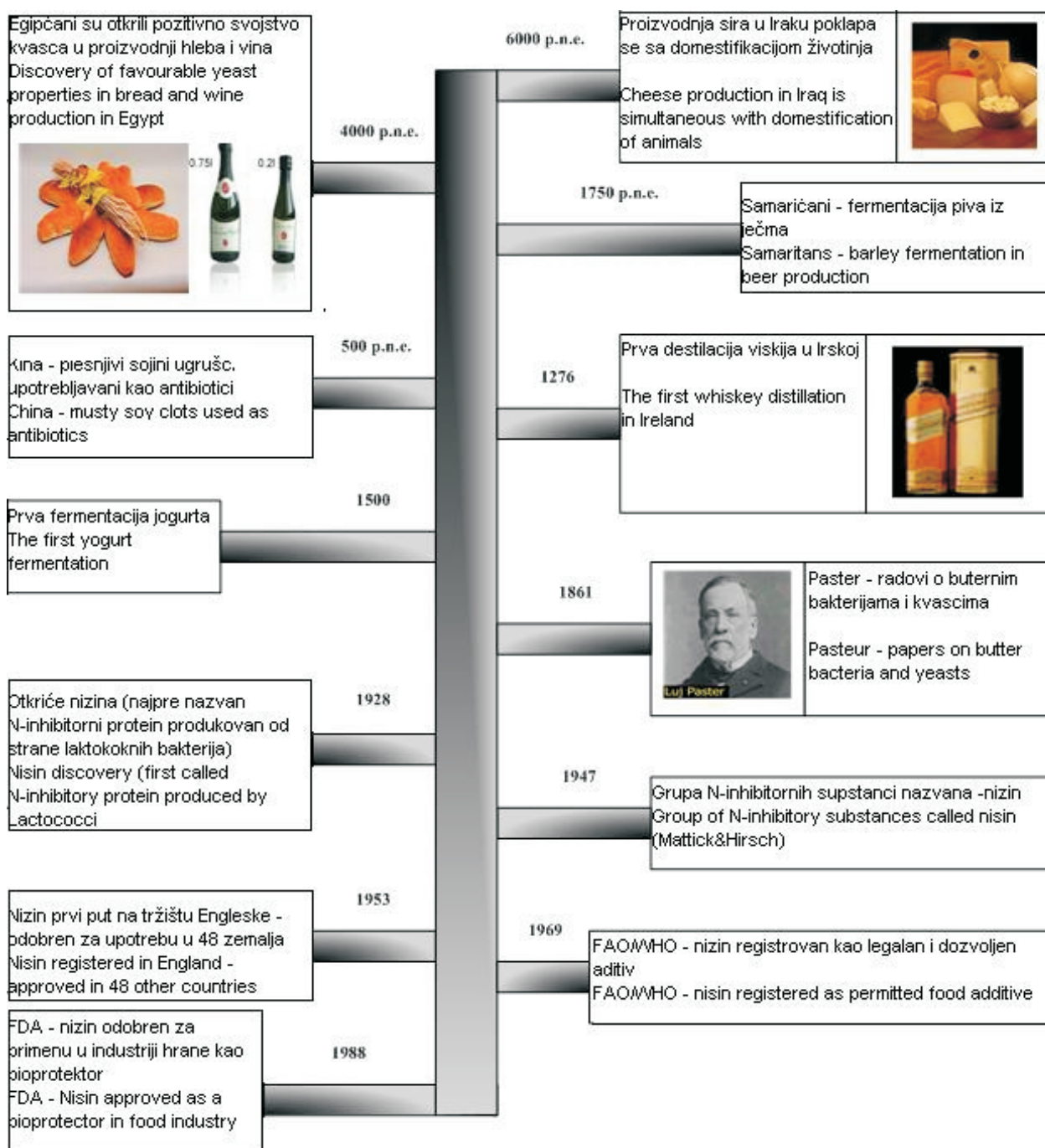
Osnovni principi fermentacije, kao načina konzervisanja hrane, danas su preuzeti iz hiljadama godina unazad starih empirijskih saznanja (slika 1).

Poznato je da se umetnost izrade sira počela da razvija pre 8000 godina između dolina reka Tigra i Eufrata u Iraku, što se poklapalo sa početkom domestikacije životinja i biljaka (Fox, 1993). Osnove alkoholne fermentacije vezuju se, pak, za period između 2000–4000. godine pre nove ere kada su stari narodi, Egipćani i Sumeri, proizvodili napitke nalik današnjem vinu i pivu. Takođe, Egipćani su koristili i slučajno otkriveno pozitivno iskustvo za proizvodnju hlebnog testa uz korišćenje „piva“ kao kvasca (Ross i dr., 2002).

Istovremeno, pored dobijanja novih proizvoda ljudi su svesno ili nesvesno tražili načine kako da „konzervišu“, odnosno sačuvaju hranu duži vremenski period. Naročito je to bilo od značaja u klimatskim regionima u kojima se ona mogla jedino sezonski da pribavi. Industrijska revolucija u oblasti konzervisanja i zaštite hrane ostvarena

\***Napomena:** Rezultati rada su deo naučno-istraživačkog projekta, koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, ev. br. 20127, „Tehnološke i protektivne osobine autohtonih sojeva bakterija mlečne kiseline izolovanih iz tradicionalno fermentisanih kobasica i mogućnost njihove primene u industriji mesa“.

<sup>1</sup>Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11 000 Beograd, Republika Srbija.



**Slika 1.** Veliki događaji u fermentaciji i prezervaciji hrane (Preuzeto i prerađeno od: *Ros i dr.*, 2002)

**Figure 1.** keystones in food fermentation and preservation (adapted from: *Ross et al.*, 2002)

je onog momenta kada je razjašnjena esencijalna uloga određenih mikroorganizama u samom procesu fermentacije. Hiljadama godina eksploatiran metod čuvanja hrane, tek je saznanjima Pastera (1861) mogao da dobije elemente naučne pouzdanosti a ne slučajno izvedene ponovljivosti.

Danas se na velikom svetskom tržištu hrane i pića nalazi šarolika skala komercijalnih fermentisanih proizvoda u čijoj proizvodnji, ali i održivosti, učestvuju određeni mikroorganizmi. Sa sigurnošću

se zna da je industrija vina, piva i špiritusa nezamisliva bez upotrebe određenih kvasaca. Istovremeno, bakterije mlečne kiseline (BMK) imaju esencijalnu ulogu kod najvećeg broja namirnica čija se proizvodnja u osnovi zasniva na mlečnoj fermentaciji (industrija mleka, mesa i povrća) (tabela 1). Na rezultat ovakvog razvoja biotehnologije ukazuju i podaci da je danas 25% ishrane u Evropi, kao i 60% u ostalim razvijenim zemljama sveta, zasnovano na fermentisanoj hrani (*Holzappel i dr.*, 1995).

**Tabela 1.** Starter kulture namenjene fermentaciji hrane (Preuzeto i preradeno od: *Geisen i Holzappel*, 1996)  
**Table 1.** Starter cultures used in food fermentation (adapted from *Geisen and Holzappel*, 1996)

Mikroorganizmi/Microorganisms	Hrana/Food
<b>Bakterije/Bacteria</b> <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. brevis</i> ssp. <i>linens</i> , <i>Lb. sanfrancisco</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>  <i>Lactococcus</i> spp., <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>  <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i> , <i>Ln. oenos</i> ( <i>Oenococcus oeni</i> )  <i>Pediococcus</i> spp., <i>P. acidilactici</i> , <i>P.</i> <i>pentosaceus</i>  <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Micrococcus</i> spp. <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>S. xylosum</i> <i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>P.</i> <i>freudenreichii</i> <i>Brevibacterium linens</i>	Buter, sir, hleb, povrće, kobasice, jogurt/ Butter, cheese, vegetables, sausages, yogurt  Buter, sir/Butter, cheese  Buter, sir, vino, fermentovano povrće/Butter, cheese, wine, fermented vegetables  Kobasice, masline/Sausages, olives Jogurt/Yogurt Kobasice/Sausages Kobasice/Sausages Sir (sir tipa Ementaler)/Ementaler Sir (sir tipa Limburger)/Limburger
<b>Kvasci/Yeasts</b>  <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pivo, vino, hleb/Beer, wine, bread
<b>Plesni/Moulds</b>  <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>P.</i> <i>nalgiovense</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>	Sir, kobasice/Cheese, sausages Sir/Cheese Sojin sos/Soy sauce Tempeh

### Bakteriocin i BMK kao bioprotektori

Uloga bakteriocina BMK je tek odnedavno postala predmet istraživanja. Saznanja vezana za produkciju bakteriocina predstavljaju važan momenat u biološkoj zaštiti hrane, s obzirom da njihova primena omogućava bakteriocidni ili bakteriostatski efekat na određene štetne mikroorganizme, koji se sa njima nalaze u istim ekološkim nišama, ili koriste iste izvore energije. Ova zaštitna uloga bakteriocina je podržana činjenicom da većina njih ima usku vezu sa domaćinom, tj. ćelijom producentom i da su mnogo efikasniji u borbi protiv bakterija, koje se sa njima nalaze u konkurentskim odnosima za iste deficitarne materije.

Iako bakteriocine proizvode mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, bakteriocini proizvedeni od strane BMK predstavljaju najveći interes za prehrambenu industriju. Osim toga, većina bakteriocin-produkujućih sojeva BMK su prirodni izolati, što ih čini idealno pogodnim za primenu u industriji hrane.

Današnji potrošač, pred industriju hrane postavlja određene, specifične zahteve. Prvenstveno, to je potreba za konzumiranjem proizvoda koji nisu pretrpeli obimne procese prezervacije, i koji ne sadrže mnogobrojne hemijske konzervanse. Zbog toga se, mogućnost primene bakteriocina, kao prirodnih protektora hrane, smatra izuzetno značajnom.

Bakteriocini predstavljaju ekstracelularno oslobođene proteine ili peptidne molekule, koji ispoljavaju izvesna baktericidna svojstva prema određenim vrstama mikroorganizama koji su najčešće srodni sa bakterijama – proizvođačima (Tagg i dr., 1976), tj. nalaze se u sličnim ekološkim nišama (Klaenhammer, 1993; Eijsink i dr., 2002).

Bakteriocini BMK predstavljaju prirodne antimikrobne peptide ili proteine sa veoma interesantnim potencijalom aplikacije u industriji hrane, prvenstveno, kao njeni bioprotektori. Ne manji značaj predstavlja i njihov doprinos u službi očuvanja zdravlja ljudi uz istovremeno povećanje održivosti hrane.

Hurst (1981) je bakteriocine nazvao, i nakon toga je taj termin bio opšte prihvaćen, „biološki konzervansi hrane“. Oni se vrlo često, u literaturi, s obzirom na izražena antibakterijska svojstva, porede sa antibioticima (Hansen, 1993). Ono što za ljudski rod, direktno, predstavlja otkriće penicilina od strane Aleksandra Fleminga 1929. godine, to u indirektnom pogledu, sa aspekta prirodne zaštite i zdravstvene bezbednosti hrane, predstavlja otkriće bakteriocina. Za razliku od antibiotika koji se koriste u terapijske svrhe, njihovom primenom, po pravilu, izbegnuta je mogućnost stvaranja nedozvoljenih alergijskih reakcija kod čoveka (Cleveland i dr., 2001).

U tabeli 2 dat je uporedni prikaz sinteze, aktivnosti, antimikrobnog spektra, toksičnosti i rezistencije antibiotika i „prirodnih antibiotskih supstancija“ – bakteriocina.

Bakteriocini BMK su, generalno, prepoznati kao prirodno bezbedne supstancije. Svoju zaštitnu ulogu u industriji hrane baziraju na otkrivenim i potvrđenim, poželjnim svojstvima, među kojima se, naročito, značajnim smatra njihova neaktivnost i netoksičnost u eukariotskim ćelijama, razlaganje pod dejstvom digestivnih enzima (proteaze), mali uticaj na crevnu mikrofloru, tolerantnost na pH i povišenu temperaturu, relativno širok spektar antimikrobnog delovanja u odnosu na potencijalne patogene u hrani i bakterije kvara. Takođe, razjašnjen je mehanizam njihovog antimikrobnog dejstva (razaranje citoplazmatske membrane meta-ćelije), kao i izostanak rezistentencije.

Genetske determinante su kodirane plazmidima, što daje mogućnost genetskim manipulacijama.

Istorija bakteriocina datira od 1925. godine kada je Gratia otkrio, do tada nepoznati protein, tzv. „Princip V“, koji je nastao kao rezultat metabolizma jednog soja *E. coli*. Otkriveni protein pokazivao je inhibitornu aktivnost u odnosu na rast nekih drugih bakterija, pa čak i nekih sojeva *E. coli* (Chen i Hoover, 2003).

**Tabela 2.** Bakteriocini i antibiotici – sličnosti i razlike

(Prerađena tabela, S. Vesković Moračanin, 2007)

**Table 2.** Bacteriocins and antibiotics – similarities and differences

(adapted, S. Vesković Moračanin, 2007)

Karakteristike/Properties	Bakteriocini/Bacteriocins	Antibiotici/Antibiotics
Aplikacija/Application	Preko hrane/In food	Klinika/Clinical
Sinteza/Synthesis	Ribozomi/Ribosomes	Sekundarni metaboliti/ Secondary metabolites
Spektar delovanja/ Broadness of spectrum	Uzak i definisan spektar/ Narrow, defined spectrum	Promenljiv spektar uslovljen mogućnosti rezistencije/ Varies depending on antimicrobial resistence
Sopstvena ćelijska aktivnost/ Cell activity	Da/Yes	Ne/No
Toksičnost/Toxicity	Nije dokazana/Not established	Da/Yes
Mehanizam dejstva/ Mechanism of action	Stvaranje pora na ćelijskoj membrani kao i uticaj na ćelijsku biosintezu/ Formation of cell membrane pores, influence on cell biosynthesis	Ćelijska membrana i intracelularne mete/ Cell membrane and intracellular targets
Uslov za mesto dejstva/ Prerequisite for action site	Površina bilo koje osetljive ćelije/ Surface of any sensitive cell	Specifično mesto na ćeliji/ Specific site on cell

Termin „colicin“ ustanovili su *Gratie i Fredericq* (1946), a *Jacob i dr.* (1953) zamenili su ga opštim terminom „bakteriocin“, da bi prikazali njegovu antibakterijsku specifičnost. Danas, termin „colicin“ podrazumeva baktericidni protein sintetisan i produkovan od određenih sojeva *E. coli* i drugih, relativno bliskih, *Enterobacteriaceae* (*Konisky*, 1982).

Iako se bakteriocini mogu da izoluju iz mnogih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih mikroorganizama, bakteriocini proizvedeni od strane BMK privlače, u poslednje vreme, najveću stručnu i naučnu pažnju, zbog mogućnosti primene u prehrambenoj industriji, kao prirodnih konzervansi hrane.

Analize rezultata istraživanja, koje su obavljene poslednjih nekoliko godina, su pokazale da primena bakteriocina, u ovoj oblasti, nudi mnogobrojne prednosti:

- produženje održivosti, tj. roka upotrebe hrane,
- dodatnu zaštitu hrane koja je skladištena pri nepovoljnim temperaturnim uslovima,
- smanjenje rizika za prenošenje patogena u lancu ishrane,
- smanjenje ekonomskih gubitaka, usled kvarenja hrane,
- smanjenje upotrebe hemijskih supstancija (aditiva i konzervanasa),
- slabije termičko tretiranje hrane u toku obrade, što omogućava očuvanje njene nutritivne i vitaminske vrednosti, kao i izvornih organoleptičkih svojstava,
- pojavu na tržištu novih prehrambenih proizvoda sa manjim stepenom kiselosti, manjim sadržajem soli i većim sadržajem vode.

Kao rezultat primene bakteriocina u procesima prerade tj. konzervisanja hrane, postiže se zadovoljavanje sve složenijih zahteva industrije, s jedne strane i potrošača, sa druge. Ohrabrujuće zvuči mogućnost da se njihovom primenom, barem delimično, može da eliminiše upotreba veštačkih sastojaka i aditiva, da može da se zadovolji potreba korisnika za minimalno prerađenom tj. svežom, kao i funkcionalnom hranom (*Obradović i Vesković Moračanin*, 2007). Pored toga, njihovom upotrebom postiže se očuvanje svih važnijih nutritivnih sastojaka u gotovim jelima.

Od vremena kada su bakteriocini prvi put ustanovljeni, pa sve do danas, intenzivno se proučavaju činioci, koji su bitni u procesima sinteze i u ispoljavanju njihove antimikrobne aktivnosti. Značajna su istraživanja, koja imaju za cilj da objasne strukturne i funkcionalne osobine bakte-

riocina. Takođe, nastoji se da se razjasni uticaj sastava namirnica i proizvodnih procedura na strukturu, rastvorljivost i aktivnost bakteriocina. Osim navedenih istraživanja, koja se obavljaju na postojećoj kolekciji bakteriocina, naročito je značajno iznalaženje novih bakteriocin-produkujućih sojeva BMK, a time i novih bakteriocina, koji bi nakon odgovarajuće optimalizacije, predstavljali dragoceni potencijal zaštite, u industriji hrane.

## Podela bakteriocina BMK

Većina bakteriocina izolovanih iz BMK su katjoni, hidrofobni molekuli sastavljeni iz kompozicije 20 do 60 amino-kiselinskih rezidua (*Nes i Holo*, 2000). Na osnovu dosadašnjeg saznanja mogu da se klasifikuju u četiri grupe (*Klaenhammer*, 1993; *Nes i dr.*, 1996) (tabela 3). Aktuelna podela bazira se na veličini i obliku molekula bakteriocina.

## Lantibiotici – klasa I bakteriocina

Predstavljaju grupu peptidnih molekula veoma male molekulske mase (<5kDa) koji poseduju karakteristična svojstva kao rezultat prisustva neobičajenih amino-kiselina – lantionin (Lan),  $\alpha$ -metilantionin (MeLan), dihidroalanin i dihidrobutirin (*Chen i Hoover*, 2003; *Cleveland i dr.*, 2001). Naime, u sastav ovih peptida ulaze najmanje dve jedinice derivata D-alanina (*Ryan i dr.*, 1999). Zbog svog sastava često se nazivaju i „lantionin – sadržavajući peptidi sa antibiotskom aktivnošću“ (*Hugas i dr.*, 1998; *Chen i Hoover*, 2003). Tipični bakteriocini ove grupe obuhvataju peptide sastavljene od 19 do najviše 50 amino-kiselina (*Cleveland i dr.*, 2001).

Na osnovu svoje hemijske strukture i antimikrobne aktivnosti, klasa I (lantibiotici) podeljena je na dve podgrupe (A i B) (*Moll i dr.*, 1999; *Van Kraaij i dr.*, 1999).

Lantibiotici podgrupe A (molekulske mase 2,164 do 3,488 Da) su pozitivno naelektrisani fleksibilni molekuli (sadrže od 2 do 7 pozitivnih naelektrisanja) koji, prolazeći kroz sistem pora na ćelijskoj membrani, dovode do njene depolarizacije i ostvaruju kontakt sa unutrašnjosti target (meta) ćelije (*Eijsink i dr.*, 1998). Najznačajniji i najbolje proučen bakteriocin ove grupe je svakako nizin, sa izraženim antimikrobnim efektom u odnosu na Gram-pozitivne bakterije.

Podgrupa B predstavlja veoma male globularne peptide (1,959 do 2,041 Da) koji poseduju negativno naelektrisanje, ili ga pak nemaju (*Altena i dr.*, 2000), a svoju antimikrobnost ostvaruju inhibicijom specifičnih celularnih enzima (*Hartnett i dr.*, 2002).

**Tabela 3.** Klasifikacija bakteriocina prilagođena podeli *Klaenhammer-a* (1993)  
**Table 3.** Classification of bacteriocins - adapted *Klaenhammer's* classification (1993)

Grupa/ Group	Podgrupa/ Subgroup	Karakteristike/Properties	Bakteriocini (značajniji predstavnici)/ Significant bacteriocins
I	IA	– lantibiotici; mali molekuli (<5kDa)/antibiotics; small molecules – karakteristične amino-kiseline (lantionin, $\alpha$ -metil lantionin)/specific amino acids (lantionine, $\alpha$ -metil lantionine) – dugački, fleksibilni peptidi/long, flexible peptides	Nizin/Nisin
	IB	– globularni peptidi sa negativnim naelektrisanjem (ili bez)/globular peptides with or without negative charge – antimikrobna aktivnost ostvaruje se inhibicijom po strukturi njima srodnih enzima/antimicrobial activity achieved by inhibition of similar enzymes	Mersacidin/Mersacidine
II	IIa	– mali (<10kDa), termostabilni peptidi/small (<10 kDa) thermostabile peptides – grupa sa izraženom antilisterijskom aktivnošću/group with pronounced antilisterial activity – N-terminalni kraj sastavljen od sekvence Tyr-Gly-Asu-Gly-Val-Xaa-Cys/N-terminus with the sequence: Tyr-Gly-Asu-Gly-Val-Xaa-Cys	Pediocin PA-1/Pediocin PA-1 Sakacini A i P/Saccacin A and P Leukocin A/Leucocine A Carnobacteriocini i sl./ Carnobacteriocins et sim.
	IIb	– dvokomponentni sistem – za aktivnost bakteriocina potrebno je prisustvo dva različita peptida/two components system – for bacteriocin activity the presence of two different peptides is needed	Lactococini G, F Lactacin F Plantaricin EF, JK Helveticini Jn V-1829
	IIc	– Grupa ostalih bakteriocina klase II (uključuje sekundarno zavisne sekretorne bakteriocine)/Other bacteriocins of class II (including secondary dependent secretory bacteriocins)	Acidocin B Enterocin P, B
III		– bakteriocini velikih molekulskih masa (>30 kDa)/bacteriocins of high molecular weights (>30 kDa) – toplotno labilni proteini/thermolabile proteins	Helveticin J Kazeicin 80
IV		– složeni makromolekulski kompleks sastavljen od lipida i/ili glukokomponenti/complex macromolecules composed of lipids and/or glucocomponents – velika molekulska masa/high molecular weight – srednji spektar delovanja/medium action spectrum	Leuconocin S Pediocin SJ-1

### Klasa II (peptidni) bakteriocini

Predstavljaju klasu malih <10kDa (*Klaenhammer*, 1993), tj. <5kDa (*Ross i dr.*, 2002), nemodifikovanih, hidrofobnih i termostabilnih peptida. Često ih u literaturi nazivaju „peptidima koji ne sadrže lantionin“. Ova prilično velika grupa bakteriocina podeljena je u tri podgrupe (a, b, c). Podela je uslovljena razlikama u amino-sekvenci N-terminalnog kraja peptida, načinom formiranja pora u target-ćeliji i postojanjem sulfhidrilnih (SH) grupa u molekulu peptida (*Hugas i dr.*, 1998; *Klaenhammer*, 1993).

Subgrupa IIa – zbog izraženog antilisterijskog efekta nazvana je grupom „*Listeria* – aktivnih peptida“ (*Ennahar i dr.*, 2000). Na N-terminalnom kraju peptidnog lanca imaju identične sekvence amino-kiseline koje uslovljavaju ovo dejstvo. Isto-

vremeno, tu se formiraju i dvostruke S-S veze od cisteinskih molekula (-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) (*Klaenhammer*, 1993; *Nes i dr.*, 1996).

Subgrupa IIa sa svojim reprezentativnim predstavnikom pediocinom, često se naziva i „pediocinu – slični bakteriocini“ (*Hartnett i dr.*, 2002). Stvaraju ih određene vrste roda *Enterococcus* (*O’Keffee i dr.*, 1999), *Lactobacillus* (*Tichaczek i dr.*, 1992), *Pediococcus* (*Henderson i dr.*, 1992) i *Leuconostoc* (*Hastings i dr.*, 1991). Ostali najznačajniji producenti bakteriocina IIa klase su: *Lactobacillus sakei* Lb 706 (sakacin A), *Lb. curvatus* LTH 1174 (curvacin A), *Leuconostoc mesenteroides* Y 105 (mesentericin Y 105), *Leuconostoc gelidum* UAL 187 (leuconocin A), *Carnobacterium divergens* V 41 (divercin V 41), *Carnobacterium piscicola* LV 17B (carnobacteriocin B<sub>2</sub>), *Enterococcus faecium* P 13 (enterocin P) i drugi. Zbog izraženog antilisterijskog i antimikrobnog

efekta u odnosu na neke druge Gram-pozitivne bakterije, ova grupa bakteriocina predstavlja signifikantni potencijal biološkog konzervisanja hrane.

Klasa IIb bakteriocina, „poracioni kompleksi“, formirani su od oligomera – dva različita peptida koji daju punu antimikrobnu aktivnost omogućavajući na taj način njihov prolazak kroz membranske pore meta-ćelija (Hartnett i dr., 2002).

Klasa IIc bakteriocina, „tiol-aktivni peptidi“, za svoju aktivnost zahtevaju smanjivanje ostataka cistina, odnosno slobodne -SH grupe.

### Klasa III (proteinski bakteriocini)

Bakteriocini ove klase predstavljaju produkte metabolizma određenih bakterijskih vrsta velike molekulske mase (>30 kDa). To je grupa termolabilnih proteina koji poseduju izražena svojstva ekstracelularnih enzima, hemomicina i muramidaze (Hugas i dr., 1998). Trenutno, u industriji hrane njihov interes za bioprotektivnu primenu nije naročito izražen. Najpoznatiji predstavnici ove grupe su helveticin J, produkovan od strane *Lactobacillus helveticus* 481 (Joerger i Klaenhammer, 1986) i enterolysin, metabolitički produkt *Enterococcus faecium* (Nilson, 1999).

### Klasa IV – složeni proteini

Bakteriocini ove klase predstavljaju kompleksna jedinjenja koja za svoju aktivnost zahtevaju neophodne lipidne i/ili gluko komponente (Klaenhammer, 1993). Vrlo su velike molekulske mase i imaju srednji spektar antimikrobnog dejstva. Kako nemaju adekvatne i jednake biohemijske karakteristike, naročito u pogledu veličine, bakteriocini ove klase zahtevaju dodatne deskriptivne informacije (McAuliffe i dr., 2001). Istovremeno, saznanje da mogu da se prečišćavaju do aktivnih katjona ili hidrofobnih sastojaka, predstavlja osnovu daljih ispitivanja radi potencijalne bioprotektivne primene. Ovo svojstvo pokazuje plantaricin S, čijim prečišćavanjem nastaje dezintegrišući kompleks sa pozitivnim aktivnim svojstvima prilikom primene u procesu proizvodnje hrane.

### Biosinteza i mehanizam delovanja bakteriocina

Informacije o genima odgovornim za sintezu bakteriocina, i pored mnogobrojnih ispitivanja, oskudne su. Zna se da su to ribozomalno sintetisani proteinski molekuli. Geni odgovorni za kodiranje

i produkciju bakteriocina nazivaju se, uobičajeno, *operon clusteri* (McAuliffe i dr., 2001). Nalaze se lokalizovani na hromozomima kao u slučaju sinteze suptilina (Benerjee i Hansen, 1988), mersacidina (Altena i dr., 2000), divergicina A (Worobo i dr., 1995) i sakacina A (Axelsson i Holck, 1995) ili pak na plazmidima (ili transposomima) kao kod nizina (Rauch i de Vos, 1992) ili lacticina 481 (Dufour i dr., 2000). Karakteristično je, međutim, postojanje genetskog koda prvo za sintezu strukturalnog proteina (peptida) (Rauch i de Vos, 1992), proteina odgovornog za njegovo prevođenje u aktivnu formu (Engelke i dr., 1992), proteina koji obavlja transportovanje bakteriocina kroz ćelijsku membranu (Klein i dr., 1992) i regulatornog proteina zaduženog za zaštitu ćelije producenta (Diep i dr., 1996).

Sama činjenica da je sinteza bakteriocina kodirana strukturalnim genima daje potencijalnu mogućnost aktivnosti vezanih za genetsku manipulaciju. Molekularne tehnike mogu da omoguće povećanje broja novih producenata.

Mesto delovanja mnogih bakteriocina BMK je ćelijska membrana. Svoj antimikrobni efekat bakteriocini ispoljavaju, generalno gledano, putem dva mehanizma (Davis i dr., 1990):

- ▶ vezivanjem bakteriocina za specifične receptore na spoljašnjoj ćelijskoj membrani i
- ▶ penetracijom bakteriocina kroz citoplazmatsku membranu indukcijom aktivnih nukleaza.

Prvi vid delovanja zasniva se na vezivanju hidrofobnih delova bakteriocina za specifične (primarne) receptore na spoljašnjoj ćelijskoj membrani, kao i za neke druge komponente (fosfolipide, glikoproteine), pri čemu se formiraju pore. To uslovljava povećanu propustljivost jonskih kanala i posledični gubitak intracelularnih elektrolita i/ili pH balansa (Moll i dr., 1999). Na ovaj način deluju lantibiotici, bakteriocini I klase.

Drugi mehanizam delovanja bakteriocina podrazumeva njihovu penetraciju kroz ćelijsku membranu indukcijom nukleaza. Naime, stvoreni bakteriocin reverzibilno se vezuje za imunoprotein koji im omogućava vezivanje za specifične, receptorske stanice ciljne ćelije. Najčešće su, u literaturi, označeni kao peptidoglukan-prekursori (Breukink i dr., 1999). Posle toga imunoprotein se odvaja od stvorenog kompleksa a slobodni bakteriocin počinje svoju enzimsku aktivnost (poseduje svoje sopstvene permeabilaze). Ulaskom u meta-ćeliju, nastaje delovanje na sintezu DNK i RNK kao i na ATP balans ćelije. Bakteriocini ove grupe, naročito proučeni i na čijoj se primeni u industriji hrane sve više radi, su lactocin 27, izolovan iz *Lb. helveticus* LP 27 i lacticin 3147 izolovan iz *Lactococcus lactis*.

Poznato je da bakteriocini BMK pokazuju izraženu antibakterijsku aktivnost u odnosu na Gram-pozitivne bakterije (*Cleveland i dr.*, 2001; *Diep i Nes*, 2002), dok dejstvo u odnosu na Gram-negativne bakterije, u uobičajenim okolnostima, nije zabeleženo (*Messens i De Vuyst*, 2002). Razlog delovanja bakteriocina na Gram-pozitivne bakterije, vrlo verovatno, leži u manje složenoj strukturi ćelijskih membrana u odnosu na Gram-negativne bakterije koje poseduju i dodatni sloj, spoljašnju membranu, koja je nepropustljiva za većinu makromolekula i hidrofobnih supstancija (*Nikaido i Vaara*, 1985). Sastavne komponente spoljašnje ćelijske membrane (fosfolipidi, proteini i lipopolisaharidi) uslovljavaju izvanrednu zaštitu od mnogih agenasa, pa i od bakteriocina.

Relativno uzak inhibicioni spektar dejstva bakteriocina uslovljen je filogenetskom bliskošću ćelija producenata i meta-ćelija; u literaturi je često prisutan termin „bliske ekološke niše“ kod opisivanja područja delovanja bakteriocina (*Klaenhammer*, 1993). Generalno, bakteriocini BMK pokazuju antimikrobnu aktivnost u odnosu na druge BMK, ali i prema *L. monocytogenes* koja je bliska rodu *Lactobacillus* (*Leroy i dr.*, 2002). S obzirom na osobine ovog, hranom prenosivog patogena, uticaj bakteriocina se smatra značajnim sa aspekta zdravstvene bezbednosti.

### **Mogućnosti primene bakteriocina BMK u industriji mesa – prikaz dela rezultata istraživanja iz oblasti izolacije, osobina i mogućnosti primene**

Povećane potrebe za prirodno sigurnom i zdravstveno bezbednom hranom, dovelo je do pojačanog interesa za upotrebom bakteriocin-produkujućih BMK, koje se kao protektivne kulture koriste za proizvodnju fermentisanih proizvoda u mesnoj industriji. Imajući u vidu izraženo baktericidno ili bakteriostatsko dejstvo bakteriocina BMK na pojedine patogene mikroorganizme, poslednjih godina se sve više razmatra mogućnost njihove primene u industriji hrane, radi obezbeđivanja potpune zdravstvene bezbednosti proizvoda.

S druge strane, direktni korisnici, potrošači ispoljavaju znatnu doslednost u pogledu negativnog stava kada je u pitanju upotreba hemijskih supstancija kao aditiva u proizvodnji hrane. Kao rezultat toga stvara se neodlučnost prilikom upotrebe, bilo kako tretirane hrane, izuzev sveže. Takav trend s jedne strane (tzv. „zelena tehnologija“ – *Ross i dr.*, 2002) i neprekidni razvoj savremenih, zaštitnih tehnologija XX i XXI veka uključuju eksploataciju i

primenu dostignuća iz oblasti biološke zaštite hrane upotrebom bakteriocina kao bioprotektora. Međutim, da bi bakteriocini, kao prirodni prezervativi, mogli da budu primenjeni u industriji hrane, moraju da budu prvenstveno odobreni kao legalni aditivi („GRAS“, supstancije generalno prihvaćene kao sigurne – „generally regarded as safe“). Kao što je ranije napomenuto, samo nizin ima ovaj status.

Laktobacili izolovani iz različitih vrsta fermentisanih kobasica (*Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* i *Lb. casei*), predstavljaju česte producente bakteriocina koji danas imaju veoma interesantan potencijal primene u industriji mesa. Zbog izražene antilisterijske aktivnosti, mnogi od ovih sojeva se koriste, kao deo starter kultura. Naravno, značajni laktobacili, koji poseduju izražena baktericidna svojstva u odnosu na patogenu *L. monocytogenes*, smatraju se *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* i *Lb. plantarum*.

*Slavica Vesković-Moračanin* (2005) ispitala je sposobnost stvaranja bakteriocina iz različitih sojeva *Lactobacillus sakei* i *Leuconostoc mesenteroides*, koji su izolovani iz tradicionalnih fermentisanih kobasica. Potencijalna bakteriocinska aktivnost *Lb. sakei* i *Ln. mesenteroides* utvrđivana je metodom agar-difuzije („Agar well assay“). Kao test-mikroorganizam u radu je korišćena patogena *Listeria monocytogenes* NCTC 10527. Radi odvajanja suprenatanta, bujonske kulture *Lb. sakei* i *Ln. mesenteroides* (MRS bujon sa sojem BMK, inkubiran je na temperaturi 37°C u toku 24 časa) centrifugovane su 10 minuta na 10.000 obrtaja/min. Da bi se obavila neutralizacija nastalih kiselih produkata metabolizma ispitivanih sojeva BMK, u supernatant je dodavan 0,1 M KOH. Potencijalna antibakterijska aktivnost nastalog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminisana je dodavanjem katalaze (5 mg/mL), a potvrda samog ogleada izvedena je proteinaza testom (proteinaza u količini od 50 µL i jačine 10–25 mg/mL, dodata je u 50 µL ispitivane i neutralisane bujonske kulture BMK). Nakon predviđenog vremena termostiranja supernatanta i proteolitickog enzima (1 čas na 37°C), autor je količinu od 100 µL prebacivala u levkasta udubljenja, koja su napravljena u agar-podlozi sa test mikroorganizmom. Posle osnovne difuzije (30 minuta na 4°C), ploče su termostatirane preko noći na temperaturi od 30°C. U odnosu na diferencijalne i potvrdne testove bakteriocinske aktivnosti, ispitivani sojevi BMK imali su profil koji je karakterističan za bakteriocin – producenta (bujonska kultura, neutralisani bujon i katalaza test – pozitivna antilisterijska reakcija; proteinaza – negativan test).

Danas, savremena analitika poznaje i koristi tri glavne metode za izolovanje i prečišćavanje bakteriocina BMK. Prva metoda purifikacije bazirana



je na konvencionalnom postupku koji obuhvata seriju uzastopnih precipitacija amonijum-sulfatom, postupke izmene jona u hidrofobnim interakcijama, gel-filtraciju i tečnu hromatografiju (povratno-faznu, pod visokim pritiskom). Drugi vid prečišćavanja predstavlja jednostavan analitički princip koji se sastoji iz tri koraka: precipitacije amonijum-sulfatom, ekstrakcije ili precipitacije hloroformom ili metanolom i povratno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom. Treći oblik izolacije bakteriocina se obavlja preko adsorpcije pomoću hidrofobnog gela, nakon čega sledi određivanje najvećeg mogućeg titra biorasploživih bakteriocina. U optimalizaciji ovoga postupka stoji podešavanje pH vrednosti medijuma u uslovima u kojima se odvija fermentacija.

*Slavica Vesković-Moračanin* (2005, 2008a) izolovala je bakteriocin iz *Lb. sakei* (sakacin) kao i iz *Ln. mesenteroides* (mesenterocin), metodom zasićene precipitacije amonijum-sulfatom. Navedeni protokol u radu bio je baziran na osnovama metode dobijanja bakteriocina iz BMK koje su postavili *Schilling* i *Lücke* (1989), ali koji je prilagođen laboratorijskim uslovima rada autora. Postupak izolovanja bakteriocina u poluprečišćenom obliku obuhvatao je višednevne aktivnosti s ciljem umnožavanja željene kulture *Lb. sakei* i *Ln. mesenteroides* do potrebne koncentracije biomase, koja je davala maksimalnu produkciju bakteriocina, i samog postupka izolacije bakteriocina.

Ista autorka (2005, 2007) je, ispitujući svojstva bakteriocina BMK izolovanih iz *Ln. mesenteroides* E 131 i iz različitih sojeva *Lb. sakei*, potvrdila njihovu proteinsku prirodu, čime je otvorila vrata njihovim daljim istraživanjima, kao potencijalnih bioprotektora, u proizvodnji fermentisanih kobasica. Autorka je ispitivala uticaj proteolitičkih enzima (Pepsin – TS, jačine 1:10000, Papain  $\geq$  30000 i Proteinaze K, 600 m Ansou U/mL) na aktivnost izolovanih bakteriocina. Rezultati su pokazali da bakteriocini, posle tretiranja navedenim proteolitičkim enzimima, gube svoju aktivnost, čime izostaje i antilisterijski efekat. Autorka je enzimske preparate dodavala, pojedinačno, u koncentraciji od 1 mg/mL. Nakon inkubacije, jedan čas pri temperaturi od 37°C, koja je obavljena radi ispoljavanja potencijalne aktivnosti proteolitičkih enzima, izostala je antilisterijska aktivnost kod oba izolovana bakteriocina. Na ovaj indirektan način potvrđena je njihova proteinska priroda.

Proteinska priroda predstavlja veoma značajnu osobinu bakteriocina, koja određuje njihovu sudbinu u organizmu ljudi, kao krajnjih korisnika proizvoda u čijoj se izradi koriste dodati bakteriocini, ili pak BMK kao sigurni producenti bakteriocina. Bilo ka-

kva druga mogućnost, vezana za metaboličku sudbinu bakteriocina u organizmu čoveka (akumulacija, delimična razgradnja, resorpcija i druge), ne bi bila poželjna. Ovo svojstvo uliva optimizam za nastavak daljih istraživanja i navodi na mogućnost njihove češće primene, u okviru kompleksnog sistema zaštite hrane od dejstva nepoželjnih mikroorganizama.

Još jedan od značajnih činilaca koji određuje mogućnost primene bakteriocina BMK u tehnološkim procesima industrije mesa, je, svakako, njihova termorezistentnost. Sposobnost bakteriocina da prežive procese termičke obrade, predstavlja jedan od najznačajnijih kriterijuma za njihovu primenu.

*Slavica Vesković-Moračanin* (2008, 2008a) je ispitivala uticaj povišenih do visokih temperatura na ispoljavanje antilisterijske aktivnosti sakacina i mesenterocina. Izbor temperatura je bio adekvatan onima koje se, inače, primenjuju u industriji mesa, kao obavezni deo tehnološkog procesa proizvodnje određenih proizvoda. Po 1 mL izolovanog poluprečišćenog bakteriocina, autorka je izložila dejstvu sledećih temperatura: 65°C, 80°C, 90°C i 100°C, kao i dejstvu visokih temperatura (121°C) i povišenog pritiska (1,2 Ba), u procesu autoklaviranja. Kivete sa bakteriocinima su izlagane dejstvu temperatura u toku 10 i 30 minuta. Uticaj temperature od 100°C je određivan posle ekspozicije od 10, 30 i 60 minuta, a efekat visoke temperature (121°C) i povišenog pritiska (1,2 Ba) posle 15 minuta. Rezultati ovih istraživanja su pokazali izuzetnu termostabilnost ispitivanih bakteriocina. Naime, njihovo antilisterijsko svojstvo se zadržalo čak i posle procesa autoklaviranja, što u uslovima industrijske proizvodnje odgovara efektima sterilizacije.

Jačina izolovanih bakteriocina koji potiču iz BMK određuje se principom kritičnog dilucionog razblaženja (*Barefoot* i *Klaenhammer*, 1983). Suština reakcije zasniva se na pronalaženju najvećeg, maksimalnog razblaženja bakteriocina koje, u podlozi sa izabranim test-mikroorganizmom, daje antimikrobni efekat. Naime, izolovani bakteriocin, u količini od 50  $\mu$ L, tzv. bakteriocinska porcija, razblažuje se određenim dilutentom (destilovana voda, fiziološki rastvor, Ringerov rastvor) do onog stepena koji obezbeđuje inhibiciju rasta test-mikroorganizma (*L. monocytogenes*) veću od 2 milimetra. Jačina bakteriocinske aktivnosti se iskazuje arbitarnim jedinicama i izražava se kao AU/mL. Ispitivana vrednost se dobija korišćenjem formule:  $AU/mL = 2^n \times (1000 \mu L / 50 \mu L)$ , gde  $n$  predstavlja navedeni stepen razblaženja.

*Slavica Vesković-Moračanin* (2005, 2007a) je, ispitujući osobine sakacina, bakteriocina izolovanog iz *Lb. sakei* I151, koji potiče iz tradicionalne fermentisane kobasice, utvrdila da njegova jačina

iznosi cca 640 AU/mL. Drugim rečima, maksimalno razblaženje bakteriocina koje je davalo antilisterijski efekat, je bilo 1:32 ( $2^5$ ). Ista autorka (2005) je određivala i jačinu mesenterocina, bakteriocina izolovanog iz *Leuconostoc mesenteroides* E131. Utvrđena njegova jačina je bila cca 2560 AU/mL.

Zbog svojih fizioloških osobenosti (stvaraju sluz, tj. egzopolisaharide, kao i druge neatraktivne metaboličke produkte – acetoin, diacetat, etanol itd.), koji su sa aspekta kvaliteta neprihvatljivi u industriji mesa, tehnološka primena bakterija *Leuconostoc* vrsta je, uglavnom, ograničena na direktnu aplikaciju sintetisanih i prečišćenih bakteriocina (Vesković Moračaniin Slavica, 2005, 2007).

Slavica Vesković-Moračaniin (2005) je ispitivala antilisterijsko dejstvo pomenutih bakteriocina u toku proizvodnje domaće sremske kobasice. Ogljed je izveden u industrijskim, kontrolisanim uslovima uz primenu odgovarajućih mera zaštite. *L. monocytogenes* NCTC 10527 je inokulisana na način koji obezbeđuje da finalna koncentracija ovog patogena bude  $10^4$ – $10^5$  ćelija/g nadeva. Autorka je izolovane poluprečišćene bakteriocine dodavala u nadev sremske kobasice sa inokulisanom *L. monocytogenes*, u količini da jačina mesenterocina bude 2560 AU/g, a sakacina 640 AU/g pripremljenog nadeva. Od početne vrednosti, koja je bila zajednička za sve ogledne partije uzoraka (približno  $\log_3$ ), broj *L. monocytogenes* se smanjivao u toku procesa zrenja kobasice. Na osnovu promene broja inokulisane *L. monocytogenes* autorka je dobila direktan odgovor o uticaju dodatih bakteriocina na rast i preživljavanje ovog patogena. U toku procesa zrenja i fermentacije sremske kobasice, bakteriocin izolovan iz *Ln. mesenteroides* E131, pokazao je izražen antilisterijski efekat, pri čemu je 14. dana ispitivanja broj ovoga patogena bio manji od 50. Dinamika redukcije broja *L. monocytogenes* u ogledu sa dodatim bakteriocinom izolovanim iz *Lb. sakei* I154 je bila postepena i duža, u odnosu na prethodno dodati bakteriocin. Utvrđeni broj *L. monocytogenes* 14. dana fermentacije bio je znatno veći ( $>\log 2$ ), ali je 28. dana zrenja uočen znatan stepen redukcije. Broj inokulisane *L. monocytogenes* je bio manji od 100.

## Literatura

- Altena K., Guder A., Cramer C., Bierbaum G., 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2565–71.
- Barefoot S. F., Klaenhammer T. R., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environmental Microbiology*, 45, 1808–1815.

## Zaključak

Povećane potrebe za prirodno sigurnom i zdravstveno bezbednom hranom, dovele su do pojačanog interesa za upotrebom bakteriocin-produkujućih BMK, koje se kao starter kulture koriste za proizvodnju fermentisanih proizvoda u industriji mesa (Schillinger i Lücke, 1989; Hugas, 1997). Poslednjih godina značajno je porastao interes za nove metode biološke zaštite hrane, koje su prihvaćene kao savremeni i naučno zasnovani principi obezbeđivanja zdravstvene ispravnosti namirnica.

Bez obzira što civilizacija dobrobit od bakteriocina koristi hiljadama godina unazad, jedino je upotreba nizina, kao bioprotektora hrane, danas dozvoljena. Saznanja da postoje i drugi bakteriocini BMK čiji je antimikrobni efekat isti, ako ne i veći, od efekta nizina, dovodi do preispitivanja zašto se i drugi bakteriocini ne koriste u istom obimu u procesu zaštite hrane. Odgovor leži u postojanju izvesnih poteškoća, koje se odnose na njihovu širu industrijsku primenu i implementaciju na tržištu hrane, a ne na manjku objektivnih naučnih dokaza i istina koje opravdavaju njihovu primenu.

Naivno bi bilo verovati da bakteriocini predstavljaju rešenje za sve probleme iz oblasti bezbednosti hrane. Njihovu primenu treba posmatrati sa aspekta dobre alternative, naročito u kombinaciji sa drugim prirodnim protektorima.

Nastavak daljih kontinualnih istraživanja svakako će doprineti boljem shvatanju njihove prirode, aktivnosti, mogućnosti primene, ali i otkrivanju novih grupa bakteriocina, koji upotrebljeni na kontrolisani način mogu da predstavljaju prirodne prezerative ili bioprotektore hrane.

Ispoljena antilisterijska aktivnost bakteriocina, izolovanih iz *Lactobacillus sakei* i *Leuconostoc mesenteroides*, interesantan je potencijal zaštite koji može da se iskoriste u industriji mesa, kod proizvodnje fermentisanih kobasica. Prilikom direktne aplikacije bakteriocina (kao aditivi), moraju da se dobro prouče i usaglase ostali tehnološki faktori u proizvodnji (pH, temperatura, so i nitriti) sa njihovim funkcionalnim svojstvima.

- Benerjee S., Hansen J. N., 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *Journal Biological Chemistry*, 263, 9508–14.
- Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O. P., Sahl H., de Kruijff B., 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286, 2361–2364.

- Chen H., Hoover D. G., 2003.** Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2, 82–100.
- Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., Chikindas M. L., 2001.** Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71, 1–20.
- Davis D. B., Dulbecco R., Eisen N. H., Ginsberg S. H., 1990.** Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. J. P. Lippincott Company, E. Washington Square, Philadelphia. PA.
- Diep D. B., Havarstein L. S., Nes I. F., 1996.** Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. Journal of Bacteriology, 178, 4472–4483.
- Diep D. B., Nes I. F., 2002.** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. Current Drug Targets 3: 107–122.
- Dufour A., Rince A., Uguen P., LePennec J. P., 2000.** IS1675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon. Journal of Bacteriology 182, 5600–5.
- Eijsink V. G. H., Skeie M., Middelhoven P. H., Brurberg M. B., Nes I. F., 1998.** Comparative studies of class Ia bacteriocins of lactic acid bacteria. Applied Environmental Microbiology, 64, 3275–81.
- Eijsink V. G. H., Axelsson L., Diep D. B., Havarstein L. S., Holo H., Nes I. F., 2002.** Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek, 81, 639–654.
- Engelke G., Gutowski-Eckel Z., Hamelmann M., Entian K. D., 1992.** Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. Applied Environmental Microbiology, 58, 3730–3743.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A., 2000.** Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Review, 24, 85–106.
- Fox P. F., 1993.** Cheese: an overview. In: Fox, P.F. (Ed.), Cheese; Chemistry, Physics and Microbiology. Chapman & Hall, London, England, 1–36.
- Geisen R., Holzapfel W. H., 1996.** Genetically modified starter and protective cultures. Food Microbiology, 30, 315–324.
- Gratia A., Fredericq P., 1946.** C R Seanc Soc. Biol., 140:1032–1033, in Mayr-Harting and others, 1972.
- Hansen J. N., 1993.** Antibiotics synthesized by post translational modification. Annual Review of Microbiology, 47, 535–564.
- 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, Vol. 108, 2, 169–177.
- Hastings J. W., Sailer M., Johnson K., Roy K. L., Vederas J. C., Stiles M. E., 1991.** Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. Journal of Bacteriology, 173, 7491–500.
- Henderson J. T., Chopko A. L., van Wassenaar P. D., 1992.** Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Archives of Biochemistry and Biophysics, 295, 5–12.
- Holzapfel W., 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.
- Hugas, M., 1997.** Biopreservation of meat and meat products. Actes du collage lactique, Caen, France, 213–227.
- Hurst A., 1981.** Nisin. Adv. Appl. Microbiol., 27, 85–123.
- Jacob F., Lwoff A., Siminovitch L., Wallman E., 1953.** Definition de quelques termes relatifs a la Pysogenie. Ann Inst. Pasteur Paris, 84, 222–4.
- Joerger M. C., Klaenhammer T. R., 1986.** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. Journal of Bacteriology, 167, 439–46.
- Klaenhammer T. R., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, FEMS Microbiology Review, 12, 39–85.
- Klein C., Kaletta C., Schnell N., Entian K. D., 1992.** Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin published erratum appears in Applied and Environmental Microbiology 1992, May, 58, 5, 1795. Applied and Environmental Microbiology, 58, 132–142.
- Konisky J., 1982.** Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Annu Review Microbiology, 36, 125–44.
- McAuliffe O., Ross R. P., Hill C., 2001.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbial Review 25, 285–308.
- Messens W., De Vuyst L., 2002.** Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. International Journal of Microbiology, 72, 1–2, 31–43.
- Moll G. N., Konings W. N., Driessen A. J. M., 1999.** Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie Van Leeuwenhoek, 76, 185–98.
- Nes I. F., Diep D. B., Havarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V., Holo H., 1996.** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70, 113–128.
- Nes I. F., Holo H., 2000.** Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolymers, 55, 50–61.
- Nikaido H., Vaara M., 1985.** Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability in Microbiology Review, 49, 1–32.
- Nilson T., 1999.** Novel enterococcal bacteriocins; optimisation of production, purification, biochemical and genetic characterisation. PhD thesis, Agricultural University of Norway, As, Norway.
- Obradović D., Vesković Moračanin S., 2007.** Funkcionalne fermentisane kobasice – sadašnje stanje i perspektive. Tehnologija mesa, 48, 1–2, 93–98.
- O’Keffee T., Hill C., Ross R. P., 1999.** Applied and Environmental Microbiology, 65, 1506.
- Rauch P. J., de Vos W. M., 1992.** Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. Journal of Bacteriology, 174, 1280–1287.
- Ross R. P., Morgan S., Hill C., 2002.** Preservation and fermentation: past, present and future. International Journal of Food Microbiology, 79, 3–16.
- Ryan M. P., Jack R., Josten W., Sahl H.-G., Jung G., Ross R. P., Hill C., 1999.** Extensive post-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. Journal of Biological Chemistry, 274, 37544–37550.
- Schillinger U., Lücke F. K., 1989.** Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology, 55, 1901–1906.
- Tagg J., Dajani A., Wannamaker L., 1976.** Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacterial Review, 40, 722–756.
- Tichaczek P. S., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Vogel R. F., Hammes W. P., 1992.** Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. Systematic and Applied Microbiology, 15, 460–468.

- Van Kraaij C., de Vos W. M., Siezen R. J., Kuipers O. P., 1999. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Natural Product Report*, 16, 575–87.
- Vesković S., 2005. Uticaj bakteriocina izolovanog iz *Leuconostoc mesenteroides* E 131 i *Lactobacillus sakei* I154 na *Listeria monocytogenes* u toku proizvodnje Sremske kobasice. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Vesković-Moračanin S., 2007. Uticaj *Lactobacillus sakei* I151, bakteriocina *Leuconostoc mesenteroides* E 131 i MAP na održivost Sremske kobasice. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Vesković-Moračanin S., Obradović D., Škrinjar Marija, Stjepanović A., 2007a. *Lactobacillus sakei* as bioprotector in production of safe Sremska sausage. International Congress on „FOOD TECHNOLOGY, QUALITY, AND SAFETY“ November 13-15, Novi Sad, 129–136; Technology, quality and safety in pork production and meat processing. XI Symposium „NODA 2007“, Novi Sad, November 14–15, 2007.
- Vesković-Moračanin S., Turubatović L., Škrinjar M., Obradović D., 2008. Ispitivanje antilisterijskog efekta bakteriocina *Lactobacillus sakei* I154 u različitim uslovima. *Tehnologija mesa*, 49, 5–6, 175–180.
- Vesković-Moračanin S., Turubatović L., Obradović D., 2008a. Influence of temperature and pH on anti-listerial activity of bacteriocin isolated from *Leuconostoc mesenteroides* E131. [www.icomst.helsinki.fi/icomst2008](http://www.icomst.helsinki.fi/icomst2008).
- Worobo R. W., VanBelkum M. J., Sailer M., Roy K. L., Vederas J. C., Stiles M. E., 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Journal of Bacteriology*, 177, 3143–9.

## Lactic acid bacteria bacteriocins as natural food protectors – possibilities of application in meat industry

Vesković-Moračanin Slavica

*S u m m a r y:* Lactic Acid Bacteria (LAB) play an essential role during the production of fermented meat products. By their metabolic activity, they influence the ripening process, which leads to the creation of desired sensory properties of the product and at the same time inhibit undesirable microflora. Due to its dominant number during the fermentation process as well as long-term tradition in utilization of these microorganisms, LAB are designated as “safe microflora”. Bio-protective action of LAB whether naturally present and/or selected, and intentionally added to the meat products, is achieved through the production of non-specific metabolites (lactic acid, acetic acid and other organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, etc) or specific metabolites, bacteriocins.

Bacteriocins are extracellular released peptides or protein molecules, produced by some LAB that shows certain antibacterial properties towards some microorganisms, usually congenial to the producing bacteria. Bacteriocins production by LAB enables selective and competitive effect on microflora present in the product that may contain spoilage or pathogenic microorganisms.

Today, bacteriocins, as naturally produced antimicrobial peptides or proteins, have rather interesting potential of application in food industry and act as a factor in humans' health preservation with the additional effect on increase of shelf-life of food.

This paper presents the results of long standing extensive research of the author, carried out in laboratory conditions as well as in meat processing facilities, with the aim of creating prerequisites for application of protective cultures and/or bacteriocins in meat processing industry for the production of fermented sausages.

**Key words:** Fermentation, Lactic acid bacteria (LAB), Bacteriocins, Food safety, Fermented sausages.

Rad primljen: 07.06.2010.

Rad prihvaćen: 11.06.2010