

BIOPROTEKTIVNI AGENSI U KONTROLI ZDRAVSTVENE BEZBEDNOSTI

Pojava oboljenja izazvanih hranom – trovanja hranom, predstavljaju i danas značajan rizik po zdravlje ljudi. Više od 200 poznatih bolesti se prenosi putem hrane. Uročnici trovanja hranom obuhvataju viruse, bakterije, parazite, toksine, metale i prione a simptomi ovih oboljenja variraju od blagih gastrointestinalnih smetnji do životno opasnih neuroloških, hepatičnih i renalnih sindroma. Prevencija trovanja hranom predstavlja veoma ozbiljan zadatak za proizvođače hrane. Pored kontrole zdravstvene i higijenske ispravnosti, u svim fazama proizvodnje (prema konceptu od farme do trpeze), neophodno je razvijati nove tehnologije i tehnike koje doprinose trajnosti i bezbednosti hrane. Hrana fermentisana bakterijama mlečne kiseline se tradicionalno smatra bezbednom. Kao proizvod metaboličke aktivnosti ovih bakterija stvaraju se različite supstance koje doprinose poboljšanju trajnosti fermentisanih proizvoda, aktivnom supresijom rasta patogenih mikroorganizama uzročnika kvarenja hrane. Zbog toga se ove bakterije i produkti njihovog metabolizma smatraju bioprotektivnim agensima sa značajnom ulogom u kontroli zdravstvene bezbednosti hrane.

Rizici oboljenja izazvanih hranom prisutni su u svim zemljama sveta, kako nerazvijenim tako i u razvijenim. U istraživanju Motarjemi i sar. (1993) [1] je procenjeno da u tropskim regionima godišnje umire više od 13 miliona dece mlađe od 5 godina. Nakon respiratornih infekcija, hrana pripremljena u nehigijenskim uslovima i često kontaminirana patogenim mikroorganizmima, ima najveći udeo u smrtnosti dece. Značajan broj obolelih usled trovanja hranom, sa visokim procentom smrtnosti, zabeležen je i u SAD. U istraživanju Centra za kontrolu i prevenciju oboljenja (Centers for Disease Control and Prevention)[2] je procenjeno da se u SAD svake godine, prosečno registruje 76 miliona oboljenja prouzrokovanih hranom, od čega je za 325.000 slučajeva neophodna hospitalizacija a oko 5.000 slučajeva ima letalan ishod. *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia* i *Escherichia* predstavljaju najčešće uzročnike trovanja hranom ali i druge enterotoksigene vrste kao što su *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Aeromonas*, *Achromobacter* i *Flavobacterium*, mogu biti izazivači oboljenja [3].

Međutim, ova istraživanja su pokazala i to da se priroda trovanja hranom drastično menjala u poslednjih sto godina. Dok su razvoj tehnike pasterizacije i pravilno konzervisanje hrane doprinele eliminisanju pojave nekih oboljenja, savremene tehnike analitike i mikrobiologije su omogućile da se ustanovi prisustvo novih uzročnika trovanja hranom. Patogeni od najvećeg značaja danas (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Cyclospora cayetanensis* i dr.) do pre samo 20–tak godina nisu prepoznavani kao uzročnici trovanja hranom.

Prevencija trovanja hranom predstavlja veoma ozbiljan zadatak za proizvođače hrane. Pored kontrole

zdravstvene i higijenske ispravnosti, u svim fazama proizvodnje (prema konceptu od farme do trpeze), neophodno je razvijati nove tehnologije i tehnike koje doprinose trajnosti i bezbednosti hrane. Sa tog aspekta, biotehnologija pruža velike mogućnosti koje su proistekle iz mnogobrojnih istraživanja i nalaze sve veću primenu u praksi.

ZNAČAJ BIOTEHNOLOGIJE SA ASPEKTA BEZBEDNOSTI HRANE

Biotehnologija podrazumeva primenu tehnika korišćenja živih organizama (ili delova organizama) u cilju dobijanja ili modifikacije proizvoda, za poboljšanje biljaka i životinja kao i za razvoj mikroorganizama koji imaju specijalnu namenu. Imajući ovu definiciju u vidu, lako je videti da je biotehnologija dugo korišćena nauka koja utiče na naš svakodnevni život.

Istorija biotehnologije započinje kada je primitivni čovek počeo da se bavi gajenjem biljaka i životinja, procesiranjem bilja za dobijanje lekova, pravio hleb, vino i pivo, kreirao mnoge vrste fermentisane hrane uključujući jogurt, sir i različite proizvode od soje, kreirao septične sisteme za rukovanje otpadnim produktima metabolizma ali i vakcine za imunizaciju protiv oboljenja. Arheološka otkrića najstarijih primera primene mikroorganizama datiraju iz perioda između 5000 do 10000 godina pre NE.

Biotehnologija je poslednjih godina doživela ogroman napredak u proizvodnji hrane, uključujući poboljšanja u industrijskim procesima i sistemima kontrole, poboljšanja u sistemu gajenja sirovina (biljnih i animalnih), genetička poboljšanja organizama koji se koriste u proizvodnji hrane kao i razvoj novih tehnika za praćenje bezbednosti i kvaliteta hrane. Zbog toga se smatra da napredak biotehnologije ima veoma značajnu ulogu u snabdevanju hranom.

FERMENTACIJA KAO POSTUPAK ZA POVEĆANJE ZDRAVSTVENE BEZBEDNOSTI HRANE

Istorijski, hrana koja je pripremana i korišćena na tradicionalni način, uz primenu biotehnologije, smatra se

Adresa autora: S. Dimitrijević–Branković, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnedžijeva 4, 11000 Beograd; e-mail: suzana@vesta.tmf.bg.ac.yu

Rad saopšten na skupu "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Oktobar 10–11, 2003, Leskovac, kao sekcijско predavanje u okviru rada Sekcije za biohemijsko inženjerstvo.

bezbednom, na osnovu dugotrajnog iskustva, iako možda sadrži prirodne toksine ili antinutrijente. Svetska zdravstvena organizacija (WHO – World Health Organisation) koja se bavi bezbednošću hrane, pridaje visok stepen prioriteta fermentaciji kao tehnici za pripremu i povećanje trajnosti hrane. Prema definiciji koju je dao Campbell–Platt (1987) [4], fermentisana hrana je ona koja je podvrgnuta delovanju mikroorganizama ili enzima, što dovodi do korisnih biohemijskih promena i značajnih modifikacija hrane. Međutim, za većinu mikrobiologa, termin fermentacija se opisuje kao metabolički proces kojim mikroorganizmi stvaraju energiju. U tom procesu se organske supstance, obično ugljeni hidrati, delimično oksidišu a nastali proizvodi služe kao akceptori elektrona u odsustvu kiseonika [5]. Prema Adamsovoj definiciji, procesi koji uključuju produkciju etanola pomoću kvasaca, ili organskih kiselina pomoću bakterija mlečne kiseline, smatraju se fermentacijom ali ne i proizvodnja tempeha (od soje), koji se dobija delovanjem metabolizma plesni. Prema bilo kojoj od ovih definicija, hrana koja je podvrgnuta uticaju mikroorganizama koji stvaraju mlečnu kiselinu smatra se fermentisanom hranom.

MIKROFLORA FERMENTISANE HRANE

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su mikroorganizmi koji se najčešće koriste u fermentaciji hrane u cilju poboljšanja njene nutritivne vrednosti ali i u cilju produženja njene trajnosti tokom čuvanja [6,7]. Metabolička aktivnost ovih bakterija, tokom rasta u hrani, smatra se potpuno bezbednom i one imaju GRAS status (Generally Recognised As Safe) za humanu upotrebu [8]. "Bakterije mlečne kiseline", je opšti naziv za vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pedococcus* i *Streptococcus*, a u poslednje vreme se u ovu grupu svrstavaju i vrste roda *Bifidobacterium*.

BMK se mogu smatrati konstituentima hrane, pre svega mlečnih proizvoda ili se mogu smatrati dodacima hrani. One su, pored kvasaca, među najstarijim mikroorganizmima, u tradicionalnoj biotehnologiji, koji se koriste za pripremu hrane. Prirodna staništa ovih bakterija su sirovo mleko, meso i biljni proizvodi, a nalaze se i kao deo prirodne mikroflore gastro–intestinalnog trakta ljudi i životinja. Prirodna laktična mikroflora se i danas koristi u pripremi mlečnih i mesnih proizvoda na malim gazdinstvima. Ovako dobijeni proizvodi često sadrže i druge mikroorganizme, kao što su kvasci i plesni. Mešovita populacija mikroorganizama potiče od prirodne mikroflore sirovog materijala i takođe ima određenu aktivnost tokom fermentacije hrane.

U industrijskim uslovima se najčešće koriste starter kulture za bolju kontrolu procesa fermentacije. Starter kulture su dobijene selekcijom iz prirodne mikroflore mlečnih i drugih fermentisanih proizvoda. Mnoga mikrobiološka ispitivanja posvećena su identifikaciji organizama izolovanih iz različitih fermentisanih proizvoda [9,10,11,12]. Pored toga, metode rekombinantne DNK omogućavaju dizajniranje i razvoj starter kultura sa specijal-

nim svojstvima. U većini zemalja, procedure za prihvatanje novih sojeva, dobijenih tehnikom rekombinantne DNK nisu formalno regulisane, osim uslova da nisu štetne. Drugi kriterijumi obuhvataju produkciju mlečne kiseline, aromatičnih materija i ekstracelularnih polisaharida. U zemljama gde je korišćenje starter kultura formalno regulisano, BMK se obično smatraju netoksikogenim i nepatogenim. U nekim slučajevima, kao što je jogurt, pravilnici o hrani određuju minimalni broj živih ćelija BMK koji mora biti prisutan u finalnom proizvodu.

BIOPROTEKTIVNI AGENSI

Koncept bioprotektivnih kultura

Koji će mikroorganizmi dominirati u hrani, zavisi od više faktora, kao što su sastav, vlaga, prisustvo biotika i abiotika i sl., a često je u početku ukupan broj mikroorganizama veoma mali. Tokom vremena kompetitivne bakterije, kao što su BMK prerastaju ostale vrste i inhibiraju njihov rast.

Stvaranje sredine koja suprimira bakterijski rast je jedan od načina na koji biotehnologija može da pomogne u stvaranju bezbedne hrane. Istraživači koji se bave ovom problematikom pokušavaju da potpomognu rast korisnih bakterija u cilju sprečavanja razvoja patogenih bakterija koje izazivaju bolesti. Ovo se najčešće postiže dodatkom specifičnih nutrijenata (na pr. specifičnih šećera) kao izvora hrane za željene bakterije, pre svega BMK koje imaju dugu tradiciju u očuvanju hrane. U tabeli 1 su prikazani neki od njihovih produkata metabolizma koji imaju komercijalni značaj u prehrambenoj industriji.

Tabela 1. Komercijalni značaj metaboličkih produkata bakterija mlečne kiseline [13]

Table 1. The commercial importance of metabolic products of lactic acid bacteria [40]

Metabolit	Korisno dejstvo	Nepoželjno dejstvo
Mlečna kiselina	prezervacija, senzorno poboljšanje	acidifikacija
Sirćetna kiselina	aroma	nesvojstven ukus
Diacetil	aroma (mlečni proizvodi)	nesvojstven ukus (pivo)
CO ₂	prezervacija, obogaćivanje ukusa	produkcija gasa (nadimanje)
H ₂ O ₂	prezervacija	dekolorizacija
Biogeni amini	————	zdravlje (intoksikacija hranom)
Sluzi*	stabilizacija (na pr. jogurt)	senzorika
Metan–tiol, H ₂ S	aroma	nesvojstven ukus i miris
Bakteriocini	prezervacija	zdravlje, inhibicija korisnih BMK
Širok spektar antimikrobnih supstanci	inhibicija patogena i mikroorganizama kvarenja	zdravlje, rezistencija intestinalnih mikroorganizama

*egzopolisaharidi

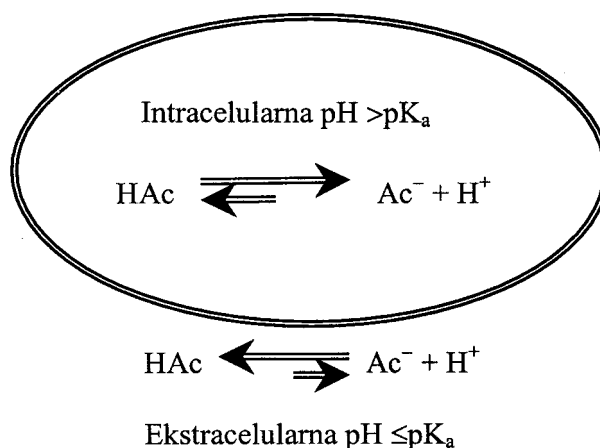
U novije vreme predloženo je da se BMK koriste kao čisto protektivne kulture u svežem mesu i vakumiranim proizvodima kao i u proizvodima koji se čuvaju na niskim temperaturama [13,14]. Protektivne kulture, za razliku od starter kultura, u principu ne snižavaju pH, ne utiču na boju, ukus i teksturu ali poboljšavaju sigurnost i produžavaju trajnost aktivnom supresijom patogena i mikroorganizama kvarenja. Neke bioprotektivne kulture pod određenim uslovima mogu proizvesti pozitivne organoleptičke promene u finalnom proizvodu [15].

Uticaj BMK na patogene i na mikroorganizme kvarenja hrane

Sniženje pH i smanjenje sadržaja ugljenih hidrata je primarni efekat ovih bakterija. Pored toga, BMK proizvode različite supstance sa antimikrobnom aktivnošću [16]. Produkcija antimikrobnih metabolita obezbeđuje preživljavanje ili dominaciju BMK u prirodnoj sredini u kojoj se nalaze. Ta jedinjenja su najčešće krajnji produkti primarnog metabolizma (organske kiseline, vodonik peroksid, diacetil, CO₂), sekundarnog metabolizma (jedinjenja slična antibiotičima) i baktericidni proteini – bakteriocini [17,18]. Adams (1990) [5] je pokazao da BMK deluju inhibitory prema mnogim patogenim mikroorganizmima kada rastu u udruženoj kulturi što je osnova produženju trajnosti i poboljšanoj mikrobiološkoj stabilnosti fermentisanih proizvoda. Inhibitorni efekat može biti uzrokovan kombinacijom različitih faktora prikazanih u tabeli 2.

Tabela 2. Antibakterijski metaboliti bakterija mlečne kiseline [19]
Table 2. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria [41]

Produkti	Glavne grupe mikroorganizama na koje deluju
Organske kiseline	
Mlečna kiselina	Truležne i Gram negativne bakterije, neke plesni
Sirćetna kiselina	Truležne bakterije, klostridije, neki kvasci i plesni
Vodonik peroksid	Patogeni i mikroorganizmi kvarenja posebno u hrani bogatoj proteinima
Enzimi	
Laktoperoksidazni sistem sa vodonik-peroksidom	Patogeni i mikroorganizmi kvarenja hrane
Lizozim (rekombinantna DNK)	Nepoželjne Gram pozitivne bakterije
Metaboliti male molekulske mase	
Reuterin	Širok spektar bakterija, kvasaca i plesni
Diacetil	Gram negativne bakterije
Masne kiseline	Različite bakterije
Bakteriocini	
Nizin	Neke BMK, Gram pozitivne i sporogene bakterije
Drugi	Gram pozitivne bakterije, različit inhibitory spektar prema tipu bakteriocina



Slika 1. Difuzija slabe organske kiseline u mikrobnu ćeliju i njena disocijacija na protone (H⁺) i potencijalno toksične anjone (A⁻) [5].
Figure 1. The diffusion of a weak organic acid into a microbe cell and its dissociation into protons (H⁺) and potentially toxic anions (A⁻) [5].

Inhibicija organskim kiselinama (mlečnom i sirćetnom) je uslovljena protonizovanom formom kiselina, koje nisu naelektrisane i mogu prolaziti biološke membrane (slika 1). Inhibicija rasta može biti posledica acidifikacije citoplazme i/ili akumulacije anjona unutar ćelije [5, 19].

Sposobnost kiseline da inhibira rast bakterija zavisi od vrednosti njene pKa: što je viši pKa, veći je udeo nedisosovanih molekula i ona ima jači inhibitory efekat. Na osnovu toga, za očekivati je da sirćetna kiselina (pKa = 4,75) bude efikasniji antimikrobni agens od mlečne kiseline (pKa = 3,86) [5].

Lactobacillus acidophilus i *L. bulgaricus* inhibiraju aktivnost širokog spektra Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija [20]. *Lactococcus lactis*, koji provodi L-laktat izomer, što umanjuje rizik od D-laktat acidoze u humanom telu, nije tako efikasan u inhibiciji patogena kao što je producent DL-laktata – *Lactobacillus plantarum*, a značajnu inhibiciju patogena pokazuje samo u slučaju kada je prisutan u velikom broju u odnosu na ostale bakterije (> 10⁵ : 1). Utvrđena minimalna inhibitory koncentracija (MIC) mlečne kiseline, prema *Listeria monocytogenes*, iznosi 5 mg/ml [21].

Neproteinske supstance male molekulske mase poseduju širok antimikrobni spektar prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Do sada su ove supstance slabo okarakterisane zbog teškoća u njihovom izolovanju i prečišćavanju [22]. Za neke je ustanovljeno da su hidrofobne heterociklične ili aromatične strukture slične benzoevoj kiselini (pKa=4,19), aktivne na niskoj pH i stabilne u termičkom tretmanu.

Diacetil proizvode neke *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Pediococcus* vrste u TCA (trikarbonske kiseline) ciklusu. CO₂ doprinosi smanjenju redoks potencijala i direktno je toksičan za određeni broj aerobnih truležnih bakterija, ali može potencirati rast drugih. Reuterin (3-hidroksipropionaldehid) proizvodi *Lb. reuteri*

iz glicerola. Ova supstanca pokazuje širok spektar antimikrobne aktivnosti i protiv G(-) i G(+) bakterija [23, 18].

Haikara i sar., 1994 [24] su izdvojili soj *Lb. plantarum* sa antifungalnim dejstvom prema *Fusarium sp.* i *Aspergillus niger*. U radu Haikara i Niku-Paavola, 1994, [25] je utvrđeno da *Lb. plantarum* VTT-E-78076 proizvodi supstancu koja sprečava rast *Fusarium sp.*, a nakon prečišćavanja vakuum-evaporacijom, gel-hromatografijom i jonoizmenjivačima, dokazano je da je aktivna inhibitorna supstanca organsko jedinjenje bogato kiseonikom, koje sadrži strukture tipa CH₃CO i CH₃O. Druge antifungalne supstance istog soja *Lb. plantarum*, determinisane pomoću GC/MS, su ciklične strukture male molekulske mase, koje su najaktivnije na pH 4 i deluju sinergistički jedna sa drugom i sa mlečnom kiselinom [25, 22].

Bakteriocini

Od 1976. godine, kada je postavljena klasična definicija bakteriocina, bazirana na kolicinu (bakteriocin *E. coli*) [26], do danas, otkriven je veliki broj novih tipova bakteriocina BMK. Za razliku od polipeptida, nastalih enzimskom kondenzacijom aminokiselina, koji pokazuju antagonistička svojstva (npr. gramacidin, bacitracin), pod bakteriocinima se podrazumevaju samo oni proteini koje ćelije bakterija sintetisaju na ribozomima, transkripcijom određenih gena. Oni, najčešće, imaju uzan spektar baktericidnog delovanja na blisko srodne bakterije, iz istih ili sličnih ekoloških sistema, mada neki pokazuju i šire delovanje [17].

Bakteriocini BMK su efikasni protiv nekih G(+) bakterija uključujući mnoge uzročnike kvarenja i patogene bakterije. Antimikrobna aktivnost ovih proteina je va-

žna u procesima fermentacije i zaštite. Njihov uzan antimikrobni spektar i proteinska struktura razlikuje ih od hemijskih zaštitnih supstanci. Korišćenje bakteriocina za inhibiciju patogena je od posebnog interesa u svežim ili minimalno procesiranim proizvodima od mesa, koji se čuvaju na niskim temperaturama i kod kojih je nepoželjna acidifikacija [13, 27].

Mnogobrojna istraživanja su posvećena fiziologiji, genetici i načinu delovanja bakteriocina koje sintetisuje BMK, zbog njihove moguće upotrebe u konzervisanju hrane. Iako se, po kriterijumima za selekciju startera, producenti bakteriocina smatraju nepodesnim za proizvodnju sira, uglavnom zbog uticaja na razvoj ukusa i arome, neki radovi ukazuju na to da njihova primena može doprineti boljoj kontroli ukupne mikroflore sira i produženju očuvanja proizvoda [28,29], a kombinacijom sojeva producenata bakteriocina i sojeva rezistentnih na te bakteriocine, mogu se formirati starteri koji daju proizvod zadovoljavajućeg ukusa [30]. Ustanovljeno je, takođe, da proizvodnja sira, uz korišćenje producenata bakteriocina, znatno smanjuje koncentraciju biogenih amina. Ova jedinjenja nastaju delovanjem dekarboksilaza, uglavnom heterofermentativnih laktobacila (*Lb. buchneri*), koje transformišu aminokiseline u amine [31].

Biohemijska i genetička karakterizacija velikog broja ovih jedinjenja omogućile su upoznavanje njihovih mogućih struktura i načina delovanja, što je poslužilo kao osnov za grupisanje bakteriocina u četiri osnovne klase [32]:

I – Lantibiotici, mali membranski aktivni peptidi (<5 kDa) koji podležu posttranslacionoj modifikaciji i sadrže neuobičajene aminokiseline – lantionin, β-metil lantionin i dehidratirane ostatke aminokiselina. Pripadnici ove grupe su npr. nizin, lakticin 481, karnocin U149, laktocin S.

Tabela 3. Produkcija bakteriocina kod BMK [33].

Table 3. The product of bacteriocins in the case of lactic and bacteria [42]

BAKTERIOCINI RODA <i>Lactococcus</i> sp.				
Bakteriocin	Producent	Lokacija gena	Mol. masa (Da)	Svojstva
Nizin	<i>L. lactis ssp. lactis</i>	hromozom/plazmid	3.354	Lantibiotik
Lakticin 481	<i>L. lactis ssp. lactis</i>	ND	~1.500	Lantibiotik
Diplokokcin	<i>L. lactis ssp. cremoris</i>	54 Mda plazmid	~5.300	ND
Laktostrepcin	<i>L. lactis ssp. lactis</i>	ND	ND	Kiseli
Bakteriocin S50	<i>L. lactis</i>	plazmid	ND	ND
ssp. diacetylactis Lokacija gena				
BAKTERIOCINI RODA <i>Lactobacillus</i> sp.				
Bakteriocin	Producent	Lokacija gena	Mol. masa (Da)	Svojstva
ND	<i>L. fermenti</i> 466	ND	ND	Protein-lipokarbohidrat
Laktocin 27	<i>L. helveticus</i> 27	ND	>2.000.000	Protein-lipopolisaharid
Helveticin J	<i>L. helveticus</i>	hromozom	~37.000	R333 aminokiseline
Laktacin B	<i>L. acidophilus</i>	hromozom	~6.000-6.500	ND
Laktacin F	<i>L. acidophilus</i>	110-kb plazmid	~6.500	57 aminokiseline
Plantaricin A	<i>L. plantarum</i>	ND	>8.000	ND
Sakacin A	<i>L. sake</i> Lb 706	118-Mda plazmid	ND	ND
Laktocin S	<i>L. sake</i> L45	50-Kb plazmid	ND	33 aminokiseline
Kaseicin 80	<i>L. casei</i>	ND	40.000-42.000	ND
ND – nije determinisano				

II – Mali, termostabilni, membranski aktivni peptidi (<10 kDa) ne podležu posttranslacionoj modifikaciji i ne sadrže lantionin. Ova klasa je dodatno podeljena na tri grupe: IIa – *Listeria* – aktivni peptidi sa specifičnom N-terminalnom sekvencom (pediocin PA-1, leukocin A i dr.), IIb – bakteriocini za čiju aktivnost je potreban kompleks od dva peptida (laktokokcin G, laktokokcin M, laktacin F) i IIc – tiol-aktivni peptidi, za čiju aktivnost je neophodan redukovani cisteinski ostatak (laktokokcin B).

III – Veliki, termolabilni proteini (>30 kDa), kao što su helveticin J, acidofilucin A, laktacini A i B.

IV – Kompleksni bakteriocini, koji pored proteina sadrže lipidne i/ili ugljenohidratne ostatke, neophodne za njihovu aktivnost (plantaricin S, leukonocin S, laktocin 27 i dr.).

Producenti bakteriocina se mogu naći među svim rodovima BMK, mada su, u odnosu na bakteriocine laktokoka, posebno nizin, bakteriocini laktobacila i leukonostoka izučavani u manjem obimu. U tabeli 3 su prikazani neki od bakteriocina različitih vrsta BMK iz roda *Lactococcus* sp. i *Lactobacillus* sp.

Kod leukonostoka je poznat bakteriocin Mezentocin 5, koga proizvodi *L. mesenteroides*, izolovan iz Cheddar sira. To je relativno termostabilan peptid, veličine oko 4,5 kDa, koji ne pokazuje baktericidno delovanje prema bakterijama mlečne kiseline, a inhibira patogenu bakteriju *Listeria monocytogenes* [34, 35].

Bakteriocini grupe II su mnogo interesantniji za industriju mesa. Na primer, curvacin i sakacin A, P i K koje proizvode *L. curvatus* i *L. sake* sojevi, izolovani iz mesa, uglavnom su aktivni protiv drugih BMK i *L. monocytogenes* dok pediocin PA-1/Ach, koga proizvodi *P. acidilactici*, *P. parvulus* i *L. plantarum*, inhibiraju rast *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *Cl. perfringens*.

U suvim kobasicama korišćenje producenta bakteriocina *P. acidilactici* JD1-23, *P. acidilactici* PAC 1.0 i *Lb. plantarum* MSC, kao starter kulture, smanjilo je broj *L. monocytogenes* za 1,2 log jedinice po gramu suve kobasice u odnosu na kontrolnu kobasicu.

Generalno se smatra da bakteriocini, kod senzitivnih bakterija, mogu delovati pre svega na povećanje propustljivosti ćelijske membrane što utiče na gubljenje određenih elemenata ili jedinjenja neophodnih za metabolizam i rast bakterija (npr. K⁺ jona i ATP). Ovo je utvrđeno za mnoge bakteriocine, kao što su lantibiotici i veliki broj bakteriocina klase II koje proizvode laktokoke (laktostrepcin, diplokokcin, laktokokcin i dr.). Takođe, uočena je inhibicija sinteze DNK, RNK i proteina, kao sekundarni efekat, prouzrokovan inhibicijom transporta prekursora potrebnih za sintezu makromolekula i smanjenjem energije za obavljanje biosintetskih procesa [36,37]. Malo informacija postoji o načinu delovanja velikih, termolabilnih bakteriocina, za koje se pretpostavlja, da promena konformacije i sekundarna struktura mogu biti važne u ispoljavanju njihove baktericidne aktivnosti [38].

Za razliku od Gram-pozitivnih bakterija, Gram-negativne bakterije, kao što je *E. coli* O157:H7, poseduju

pored unutrašnje membrane jednu spoljašnju membranu kroz koju hidrofobni bakteriocini ne mogu da prođu. U ovom slučaju, prehrambeni permeabilizeri, kao što su mlečna i sirćetna kiselina, u kombinaciji sa bakteriocinima, bili bi idealni u inhibiciji Gram-negativnih bakterija u hrani.

Heterogenost ovih jedinjenja se ogleda i u različitim optimalnim uslovima u kojima pokazuju svoju aktivnost. Laktostrepcin, koga proizvode različiti sojevi *L. lactis* ssp. *lactis*, rezistentan je na temperaturu od 100°C, 10 minuta, a punu aktivnost postiže unutar pH opsega od 4.2-5. Povećanjem pH, aktivnost se smanjuje, da bi se na pH 8 potpuno izgubila. Ponovnim smanjenjem pH vraća se aktivnost ovog bakteriocina [36]. Povećana aktivnost na nižim pH (5 i niže) utvrđena je i za nizin, kao i za druge bakteriocine grupe II. Smatra se da je u ovim uslovima smanjena agregacija hidrofilnih peptida (bakteriocina), što doprinosi većem broju slobodnih molekula i povećanju njihovog kapaciteta da prođu hidrofilne oblasti ćelijskog zida senzitivnih ćelija. S druge strane, povećanje pH može inhibirati interakciju bakteriocina i specifičnih membranskih receptora. Neki bakteriocini roda *Lactobacillus* i *Lactococcus* pokazuju širi pH opseg za svoju aktivnost (npr. Brevicin 37: pH 2-10, Kazecin 80: pH 3-9, Bakteriocin S50: 2-11 i dr.) [32,39].

ZAKLJUČAK

Primena bakterija mlečne kiseline i njihovih proizvoda metabolizma, kao bioprotektivnih agenasa u hrani, danas ima sve veći značaj, kada se sagledavaju potencijalni štetni efekti hemijskih konzervanasa, s jedne strane, i rizici trovanja hranom, s druge strane. Međutim, i u ovoj oblasti je neophodno izvršiti još niz ispitivanja koja će ukazati na potencijalne interferencije konstituenata hrane i bioprotektivnih agenasa. Tako, na primer, bakteriocini BMK mogu da se vezuju za masti i proteine iz hrane ili ih aditivi iz hrane, prirodne proteaze i drugi inhibitori mogu inaktivisati. Posebno sadržaj soli može smanjiti aktivnost bakteriocina ili može sprečiti rast proizvedena bakteriocina. Takođe, njihov efekat se može uočiti samo u uskom opsegu pH vrednosti, što isključuje njihovu upotrebu u mnogim prehrambenim proizvodima.

Ohrabruje to što mnoge bioprotektivne kulture mogu proizvoditi više različitih antimikrobnih supstanci koje deluju u kooperaciji. Dosadašnji pokušaji da se BMK koriste kao prirodni konzervansi hrane uključuju i selekcionisane kulture koje ne proizvode bakteriocine, a koje kontrolišu neželjene bakterije nespecifičnom kompetitivnom inhibicijom, sa jedne strane, i bakteriocinogene kulture sa druge strane, za specifičnu kontrolu patogena i mikroorganizme kvarenja. Pored toga, sve se češće u koncept bioprotektivnih kultura uključuju i probiotičke kulture, koje, pored mogućeg protektivnog delovanja u hrani, pokazuju istovetni efekat i u samom intestinalnom traktu (kontrolišu ravnotežu intestinalne mikroflore), čime dodatno doprinose pozitivnom zdravstvenom efektu ishrane.

LITERATURA

- [1] Motarjemi Y., Käferstein F., Moy G. & Quevedo F., Contaminated weaning food: a major risk factor for diarrhoea and associated malnutrition. *Bulletin of the World Health Organization* **71** (1993) 79–92.
- [2] Paul S. Mead, Laurence Slutsker, Vance Dietz, Linda F. McCaig, Joseph S. Bresee, Craig Shapiro, Patricia M. Griffin, and Robert V. Tauxe; <http://www.cdc.gov/>, updated 11–09–02 Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA
- [3] Nout M.J.R., Rombouts F.M. & Havelaar A., Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **8** (1989) 351–361.
- [4] Campbell–Platt G., *Fermented foods of the world – a dictionary and guide*. London, Butterworths. ISBN: 0–407–00313–4 (1987)
- [5] Adams M.R., Topical aspects of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology* **1** (1990) 141–144.
- [6] Tršić–Milanović N., Dimitrijević–Branković S., Dakić G., Nikolić D., Inhibitory effects of starter lactic acid bacteria on pathogens of gastrointestinal tract – in vitro, VIII Conference of Yugoslav microbiologists, Vrnjačka Banja, September 19–22 (2000), Book of abstract (in Serbian)
- [7] Baras J., Dimitrijević–Branković S., Povrenović D., Investigation of production of multicomponent additive for the use in meat industry with antimicrobial effect, *Meat Technology* **42** (2001) 119–127
- [8] Aguirre M. & Collins M.D., Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* **75** (1993) 95–107.
- [9] Yusof R.M., Morgan J.B. & Adams M.R., Bacteriological safety of a fermented weaning food containing L–lactate and nisin. *Journal of Food Protection* **56** (1993) 414–417.
- [10] Banina A., Vukašinović M., Branković S., Fira D., Kojić M. and Topisrović L., Characterisation of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. *J. Appl. Microbiol.*, **84** (1998) 593–599
- [11] Dimitrijević–Branković I. Suzana, Banina–Ostojić Ana, Fira Đorđe, Characterization of natural isolates of lactic acid bacteria from white soft cheese from Sjenica. *Acta Periodica Technologica* (in Serbian), **31** (B) (2000) 599
- [12] Banina A., Branković S., Vukašinović M., Fira Dj., Kojić M., Topisirović L., Genetic, biochemical and technological properties of natural isolates of lactic acid bacteria for cheese production, Yugoslav dairy symposium 'Quality of milk and fermented milk products' Book of abstract (in Serbian), Zlatibor, (1997) 71.
- [13] Holzapfel, W., Geisen, R. and Schillinger, U.: Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food–grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, **24** (1995) 343–362
- [14] Dimitrijević–Branković S., Baras J., Turubatović L., Study on probiotic properties of potential bioprotective strains of *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. for meat product, *Meat Technology*, **44** (1–2) (2003) 17–31
- [15] Kroeckel L.: Lactic Acid Bacteria as Protective Cultures in The Preservation of Meat, *Actes du Ciloque LACTIC* **97**, (1997) 229–242
- [16] Hammes W.P., Bantleona A. and Min S., Lactic acid bacteria in meat fermentation, *FEMS Microbiol. Rev.*, **87** (1990) 165–174
- [17] Jack W. R., Tagg R. J., and Ray B., Bacteriocins of Gram–Positive Bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: (1995) 171–200
- [18] Lindgren E.S., and Dobrogosz J.W., Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.*, **87** (1990) 149–163
- [19] Breidt F. & Fleming H.P., Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technology* **51** (1997) 44–46.
- [20] Shahani K.M., Nutritional impact of lactobacillic fermented foods. *Nutrition and the Intestinal Flora*. ed. B. Hallgren ISBN 91 22 00593 5. (1983)
- [21] Oh D.H. & Marshall D.L., Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **20** (1993) 239–246.
- [22] Niku–Paavola M.–L., Latva–Kala K., Laitila A., Mattila–Sandholm T., Haikara A., Poster presentation at the Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, Veldhoven, The Netherlands. (1996)
- [23] Daeschel M.A.: Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in food and beverages. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Eds. D. Hoover and L. Steenson. p. 63–91, Academic Press, San Diego, CA. (1993)
- [24] Haikara H., Skyttä E., Raaska L., Minna L., Mattila–Sandholm T., The microbicidal activities of *Lactobacillus* and *Pediococcus* species in combination with other starters against process contaminants and pathogens. Poster presentation at Lactic '94, an international symposium on lactic acid bacteria, Caen, Normandy, France, (1994)
- [25] Haikara A., Niku–Paavola, M.–L., Fungicidal substances produced by lactic acid bacteria. *VTT Biotechnology and Food Research*, Espoo, Finland, (1994)
- [26] Tagg R. J., Dajani S. A., and Wannamaker W. L., Bacteriocins of Gram–Positive Bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40** (1976) 722–756
- [27] Abee T., Krockel L. and Hill C., Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning *Int. J. Food Microbiol.*, **28** (1995) 169–185
- [28] Ryan P.M., Rea C.M., Hill C., and Paul Ross R., An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad–Spectrum Bacteriocin, Lactacin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (1996) 612–619
- [29] Richard A.J., Use of Bacteriocin Producing Starters Advantageously in Dairy Industry. *NATO ASI Series, Vol. H98 Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications*, Edit by T. Faruk Bozoglu and Bibek Ray, Springer–Verlag Berlin Heidelberg, (1996) p. 137
- [30] Daeschel A. M., Applications and Interactions of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Food and Beverages. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Edited by Dallas G. Hoover. Academic Press, Inc., (1993) 63–91
- [31] Joosten M.L.H. and Nunez M., Prevention of Histamine Formation in Cheese by Bacteriocin–Producing Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (1996) 1178–1181
- [32] Klaenhammer R.T., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12** (1993) 39–86
- [33] Stiles E.M. and Hastings W.J., Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science & Technology*, **2** (1991) 247–251
- [34] Fleury Y., Dayem M. A., Montagne J. J., Chaboisseau E., Le Caer J. P., Nicolas P. and Delfour A., Covalent Structure, Synthesis, and Structure–Function Studies of Mesente-

- ricin Y 105³⁷, a Defensive Peptide from Gram-positive Bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. J.Biol. Chem., **271** (1996) 14421–14429
- [35] Stiles E.M., Bacteriocins from *Carnobacterium* and *Leuconostoc*. – Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Edited by Dallas G. Hoover. Academic Press, Inc. (1993), 211–218
- [36] Bruno E.C.M. and Montville J.T., Common Mechanistic Action of Bacteriocins from lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **59** (1993) 3003–3010
- [37] Kok J., Holo H., Van Belkum J.M., Haandrikman J.A., and Nes F.I., Nonnisin Bacteriocins in lactococci: Biochemistry, Genetics, and Mode of Action. – Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Edited by Dallas G. Hoover. Academic Press, Inc., (1993), 121–150
- [38] Klaenhammer R.T., Fremaux C., Ahn C., and Milton K., Molecular Biology of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus*. – Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Edited by Dallas G. Hoover. Academic Press, Inc. (1993), 151–180
- [39] Kojić M., Svirčević J., Banina A., and Topisirović L., Bacteriocin-Producing Strain of *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* S50. Appl. Environ. Microbiol., **57** (1991) 1835–1837
- [40] Holzapfel, W., Geisen, R. and Schillinger, U.: Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol., **24** (1995) 343–362
- [41] Breidt F. & Fleming H.P., Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. Food Technology **51** (1997) 44–46.
- [42] Stiles E.M. and Hastings W.J., Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. Trends in Food Science & Technology, **2** (1991) 247–251

SUMMARY

BIOPROTECTIVE AGENTS IN SAFETY CONTROL

(Review paper)

Suzana Dimitrijević-Branković

Faculty of Technology and Metallurgy Belgrade University, Beograd

Food poisoning is the one of the main health hazards even today. More than 200 known diseases are transmitted through food. The causes of foodborne illness include viruses, bacteria, parasites, toxins, metals, and prions, and the symptoms of foodborne illness range from mild gastroenteritis to life-threatening neurological, hepatic and renal syndromes.

The prevention of food poisonings represents very serious task for food manufacturers. Beside food control according to the concept "from the farm to the table", there is increased need for the development of new technology for longer shelf lives of food.

Food fermented by lactic acid bacteria (LAB) and traditionally considered to be safe. There are many substances produced by LAB that affect the shelf life of fermented food, by active suppression of poisoning microorganisms growth. Because of that, the LAB is recently considered as bioprotective agents that have important role in food safety.

Key words: Bioprotective agents • Safety • Food • Poisoning •
 Ključne reči: Bioprotektivni agensi • Kontrola • Bezbednost • Hrana • Trovanje •